

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA



ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2023

ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV

eŠVK
PRIF UK
2023

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA**



**ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ
KONFERENCIA PriF UK 2023**

Zborník recenzovaných príspevkov

**26. apríl 2023
Bratislava, Slovenská republika
Univerzita Komenského v Bratislave
ISBN 978-80-223-5608-4 (tlač)
ISBN 978-80-223-5609-1 (online)**

PREDESDA ŠVK PriF UK

RNDr. Mária Chovancová, PhD.

ODBORNÝ VÝBOR

RNDr. Petra Švábová, PhD.
doc. RNDr. Hana Drahovská, CSc.
RNDr. Regina Sepšiová, PhD.
doc. Mgr. Andrej Ficek, PhD.
doc. RNDr. Peter Kabát, CSc.
Mgr. Renáta Švubová, PhD.
Mgr. Dominik Kostoláni, PhD.
RNDr. Nora Tóth Hervay, PhD.
doc. RNDr. Tomáš Derka, PhD.
doc. Mgr. Peter Mikulíček, PhD.
doc. Mgr. Ľuboš Molčan, PhD.
RNDr. Katarína Stebelová, PhD.
RNDr. Igor Matečný, PhD.
doc. Mgr. Marcel Horňák, PhD.
prof. Mgr. Radovan Šebesta, DrSc.
prof. RNDr. Michal Galamboš, PhD.
RNDr. Monika Jerigová, PhD.
doc. RNDr. Andrea Vojts Staňová, PhD.
RNDr. Soňa Nagyová, PhD.
Mgr. Lenka Šikulíncová, PhD.
RNDr. Malvína Čierniková, PhD.
prof. RNDr. Agáta Fargašová, DrSc.
doc. RNDr. Katarína Pavličková, CSc.
doc. Mgr. Tomáš Lánczos, PhD.
prof. RNDr. Daniela Reháková, CSc.
RNDr. Tatiana Durmeková, PhD.
prof. RNDr. Otília Lintnerová CSc.
RNDr. Jana Fridrichová, PhD.
doc. RNDr. Renáta Fláková PhD.

PODPREDESDA ŠVK PriF UK

Mgr. Táňa Sebechlebská, PhD.

doc. RNDr. Eva Viglašová, PhD.

ORGANIZAČNÝ VÝBOR

RNDr. Michaela Dörnhöferová, PhD.
RNDr. Kamila Koči, PhD.
RNDr. Adela Joanna Hamerníková
Mgr. Dominik Kostoláni, PhD.
Mgr. Ivana Ďurovcová, PhD.
MSc. Olena Rybníková
Mgr. Benediková Beáta
Mgr. Matej Jandík
Mgr. Dagmara Gajanová
Mgr. Kristína Huszárová
Mgr. Dominik Šmida
Mgr. Richard Hluško
Mgr. Alexandra Molnárová
Mgr. Dominik Juračka
Mgr. Alexander Kmet'
Mgr. Silvia Ihnačáková
Bc. Michaela Kardohelyová
Bc. Matej Choreň
Bc. Martina Bugriová
Alexandra Chrenová

OBSAH

Plenárna prednáška.....	7
Biológia.....	8
Chémia.....	666
Geológia.....	845
Geografia.....	924
Didaktika.....	996
Environmentalistika.....	1043
Sponzori.....	1091
Register príspevkov.....	1093

PREDSLOV



Milé kolegyně, vážení kolegovia, ctení účastníci ŠVK PriF UK 2023,

keď pred vyše dvomi tisícročiami prenikol veľký Herodos z Halikarnassu svojimi myšlienkami a sprostredkovanými informáciami ďaleko na sever od vtedajšej kolisky civilizácie, ostal len pri skromných slovách: „Ako hovoria Tráci, v tom kraji za Dunajom žije toľko včiel, že sa cez ne nedá ani krok ďalej dostať.“ A tak trochu úsmevne dostávame my prírodovedci o tom našom kraji slovami naozaj prvého významného geografického kompendia do vienka tradíciu prírodovedného vzdelávania. Tradíciu, ktorú v neskorších dobách budovali v tomto regióne mnohí velikáni myslenia a poznávania. Možno v tejto súvislosti aj slávny Johannes Müller von Königsberg, inak slovný profesor našej bratislavskej Istropolitany, jednej z najstarších stredoeurópskych univerzít, ktorého prelomové prírodovedné diela *De triangulis omnimodus libri quinque* s nádychom heliocentizmu dávno pred Kopernikom si pre svoje zámorské objavné cesty objednal aj sám Kolumbus.

Dnes na Regiomontanovom odkaze a tradícií stoja aj základy Univerzity Komenského v Bratislave. Iste sa príliš nevzdialim od pravdy, keď zdôrazním, že

jej Prírodovedecká fakulta patrí k tým najprestížnejším vedecko-pedagogickým inštitúciám, na ktoré sme na Slovensku právom hrdí. Áno, i napriek 8 desatinám HDP, ktoré naša republika ročne deliminuje na vedu a výskum, čo predstavuje na obyvateľa štyrikrát menšiu dotáciu ako priemer EÚ a sedemkrát nižšiu ako je tomu v susednom Rakúsku. Ale dovoľte mi zároveň podčiarknuť tézu, že v dobe keď sa k nám míľovými krokmi približujú skvalitnením svojej publikačnej činnosti aj naše sesterské inštitúcie (počet vedeckých publikácií na Slovensku na obyvateľa vzrástol za posledných 10 rokov nevidane dvojnásobne), no počet citácií na ne stagnuje a predstihol len Rumunsko, ostáva jasnou víziou dôraz na kvalitu publikačných výstupov. Ste na správnom mieste s tou najvyššou koncentráciou inventívneho potenciálu, intelektu, talentu a objaviteľského entuziazmu v prírodných vedách na našom území. Na mieste, ktoré sa napriek nepriazni doby a tak trochu až zvrátenému rebríčku hodnôt a priorít spoločnosti, v ktorom sa úcta k múdrosti a vzdelaniu prepadla takmer na jeho samé dno, drží prísnych a nekompromisných štandardov vedy a výskumu. Pokiaľ ste si ho vybrali pre prezentovanie svojich iste cenných a zaujímavých výsledkov, držíte sa tej pravej cesty. Študentská vedecká konferencia na našej fakulte ne nesporne prestížnym podujatím pre prestížnych študentov. Aj tento rok zaznamenalo vysoký záujem zo strany 186 účastníkov, z ktorých 100 aktívne vystúpi na našej akademickej pôde, aby príslušné tematické fórum informovali o podnetných výstupoch svojej práce. Veľmi ma teší, že popri domácich študentoch prijalo naše pozvanie aj viacero účastníkov z externého prostredia, predovšetkým zo Slovenskej akadémie vied, Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Slovenskej technickej univerzity v Bratislave, Masarykovej Univerzity v Brne či Mendelovej zemiedelskej a lesnickej univerzity v Brne. A prakticky v intenciách minulých rokov zavítali na našu fakultu aj

stredoškolskí účastníci podujatia. Tematický profil jednotlivých príspevkov už tradične definuje najmä biológia (114) a chémia (32) s nezanedbateľným podielom geografie, geológie, environmentalistiky a didaktiky prírodných vied. Úprimne sa teším z každého podujatia, ktoré spája talent mladých ľudí a predznamenáva trendy napredovania prírodných vied do najbližších rokov, veď v dnešnom uponáhľanom čase si prírodovedci nedokážu už odkrojiť veľa momentov na

vzájomne motivačnú diskusiu. Možno aj z tohto dôvodu by som rád poďakoval osobitne organizačnému výboru ŠVK s vierou, že všetci účastníci nájdu na tomto podujatí mnoho inšpirácie a prírodovedného entuziazmu. Majú totiž na čom stavať.

**DOKÁŽEME „NAHLIADNUŤ“ POD POVRCH ZEME (?)
ALEBO
FYZIKA V SLUŽBÁCH ARCHEOLÓGIE**

prof. RNDr. Roman Pašteka, PhD.

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra inžinierskej geológie,
hydrogeológie a aplikovanej geofyziky, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
roman.pasteka@uniba.sk*

Existujú v Cheopsovej pyramíde doteraz neobjavené dutiny? Nachádza sa pod kryptou v Devínskom kostole hrobka vierozvestca Metoda? Aké záhady skrýva opustené smetisko v tureckom meste Iznik? Existujú na Slovensku praveké astronomické a kultové miesta, podobné známemu Stonehenge? A čo podstatné dokáže k týmto témam povedať fyzika? Čudovali by ste sa, ale veľa...

Pri vyhľadávaní a detekcii archeologických objektov (pochované základy budov, priekopy, hroby, hrobky, krypty, pece, a pod.) môžu archeológom vo významnej miere pomôcť aj nedeštruktívne metódy, ktoré sú schopné tieto štruktúry rozpoznávať zo zemského povrchu na základe merania fyzikálnych polí bez potreby kopania alebo sondovania. Prítomnosť takýchto objektov deformuje prirodzené a umelé fyzikálne polia (ťažové, magnetické, elektrické), ktoré vieme pomocou moderných prístrojov merať a interpretovať. Prednáška prináša prehľad geofyzikálnych metód, používaných v nedeštruktívnom archeologickom prieskume, spolu s množstvom príkladov ich použitia u nás i v zahraničí.

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA



eŠVK
PRIF UK
2023

BIOLÓGIA

ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2023
ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV

Návrh a tvorba plazmidového konštruktu pre produkciu Lon proteázy z uropatogénneho kmeňa *Escherichia coli* KL53

Kristína Alföldiová¹, Miroslav Dolník¹, Eva Struhárňanská¹, Zdenko Levarski^{1,2}, Stanislav Stuchlík^{1,2}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; kristina.alfoldiova@uniba.sk

²Univerzita Komenského v Bratislave, Vedecký park, Ilkovičova 8, 842 16 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Design and creation of a plasmid construct for the production of Lon protease from the uropathogenic strain *Escherichia coli* KL53

Lon protease is an essential proteolytic enzyme that is responsible for maintaining cellular proteostasis by degrading damaged and misfolded proteins and it also controls a variety of cellular processes by degrading regulatory proteins. Recently, the remarkable ability of this enzyme to suppress the growth of tumor cells by degrading the c-Myc oncoprotein is the focus of interest. The mentioned oncoprotein is involved in the pathogenesis of many cancer diseases, which makes it a suitable therapeutic target for new approaches to cancer treatment. In this work, our main goal was to successfully design and create plasmid construct containing the gene encoding the Lon protease. We were able to prepare PCR product of the Lon protease gene from uropathogenic strain *E. coli* KL53 in adequate quantity and quality. Using the obtained insert gene, we created a plasmid construct pET28a-Lon for subsequent expression in *E. coli*.

Keywords: Lon protease; *Escherichia coli*; heterologous expression

Úvod a formulácia cieľa

Proteázy, označované aj ako proteinázy alebo peptidázy, predstavujú veľkú skupinu enzýmov, ktoré katalyzujú hydrolýzu peptidových väzieb proteínov a polypeptidov. Tieto enzýmy nachádzajú široké uplatnenie v mnohých priemyselných odvetviach a v súčasnosti tvoria viac ako 60 % globálneho trhu predaja enzýmov [1]. Na základe proteolytického mechanizmu možno proteázy klasifikovať do šiestich základných skupín – serínové proteázy, treonínové proteázy, cysteínové proteázy, asparágové proteázy, metaloproteázy a glutamátové proteázy.

Lon proteázy, patriace do skupiny ATP-dependentných serínových proteáz, sú zodpovedné za udržiavanie bunkovej proteostázy vo všetkých troch doménach života – v archeónoch, baktériách a eukaryotoch. Okrem degradácie nesprávne zbalených foriem proteínov sa podieľajú aj na degradácii regulačných proteínov, prostredníctvom ktorej môžu ovplyvňovať bunkový cyklus, prenos bunkových signálov alebo samotnú génovú expresiu [2]. Súčasná štúdia poukazuje na schopnosť Lon proteáz degradovať proteín c-MYC, čo

podmieňuje potlačenie rakovinového bujnenia [3]. Spomínané skutočnosti podporujú terapeutický potenciál použitia Lon proteázy pre účely alternatívnej liečby rakoviny.

V prvej časti našej práce sme sa zamerali na dizajn a prípravu plazmidového konštruktú obsahujúceho gén pre Lon proteázu získaný amplifikáciou z genomickej DNA uropatogénneho kmeňa *E. coli* KL53 pomocou metódy PCR. Naším ďalším cieľom bola transformácia buniek kmeňa BL21(DE3) *E. coli* vytvoreným plazmidovým konštruktom a následná realizácia expresie v Erlenmayerových bankách.

Materiál a metódy

Bakteriálne kmene

Pracovali sme s bakteriálnymi kmeňmi *E. coli* uvedenými v (Tab. 1).

Tab. 1. Použité bakteriálne kmene.

Kmeň <i>E. coli</i>	Genotyp	Zdroj
KL53	<i>CmR, TcR, TeR, clinical isolate</i>	[4]
DH5α	<i>F – endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK –mK +), λ–</i>	Invitrogen
BL21(DE3)	<i>E. coli str. B F– ompT gal dcm lon hsdSB(rB –mB –) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λS)</i>	NEB

Plazmidy

Pre tvorbu nového plazmidového konštruktú bol použitý plazmid pET28a s veľkosťou 5 369 bp, do ktorého bol cez štiepne miesta XhoI a NotI vložený gén pre Lon proteázu získaný amplifikáciou z chromozomálnej DNA kmeňa KL53 *E. coli* pomocou PCR metódy s využitím primerov obsahujúcich príslušné štiepne miesta (Tab.2).

Primery

Tab. 2. Primery využívané v tejto práci. Oranžovou farbou je označené štiepne miesto pre XhoI, žltou farbou je označené štiepne miesto pre NotI.

Primery	Sekvencia
Lon_FWD	AATTGCGGCCCGCATGAATCCTGAGCGTTCTGAACGCAT
Lon_REV	AATTCTCGAGTTTTCAGTCACAACCTGCATACCAGACG

Reakcie pre PCR a štiepenie boli pripravené na uvedených rozpisov (Tab.3-5).

Tab. 3. Zloženie PCR reakcie (50 µl).

<i>Reagencia</i>	<i>Finálna koncentrácia</i>	<i>Objem</i>
5x Q5 reakčný pufor	1x	10 µl
10 mM dNTP	200 µM	1 µl
10 µM FWD primer	0,5 µM	2,5 µl
10 µM FWD primer	0,5 µM	2,5 µl
Templátová DNA	-	2 µl
Q5 High-Fidelity DNA polymeráza	0,02 U/µl	0,5 µl
5x Q5 Enhancer	1x	10 µl
PCR voda	-	21,5 µl

Tab. 4: Teplotný program

<i>Krok</i>	<i>Teplota</i>	<i>Čas</i>	<i>Počet opakovaní cyklu</i>
Počiatočná denaturácia	98°C	2 min.	1x
Denaturácia	98°C	10 s	5x
Anelácia	56°C	20 s	
Polymerizácia	72°C	1 min. 30 s	
Denaturácia	98°C	10 s	25x
Anelácia	69°C	20 s	
Polymerizácia	72°C	1 min. 30 s	
Finálna polymerizácia	72°C	2 min.	1x

Enzýmy

Tab. 5. Enzýmy využívané v tejto práci.

<i>Enzým</i>	<i>Zdroj</i>
<i>XhoI</i>	NEB
<i>NotI</i>	NEB
<i>T4 DNA ligáza</i>	NEB
<i>Q5 High-Fidelity DNA Polymeráza</i>	NEB

Izolácia plazmidovej a chromozomálnej DNA

Plazmidovú a chromozomálnu DNA sme izolovali pomocou dostupných izolačných kitov QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) a Genomic DNA Mini kit (Geneaid). Pri práci s nimi sme postupovali podľa odporúčaných postupov výrobcu.

Konštrukcia plazmidu pET28a-Lon

Vektor, plazmid pET28a, sme štiepili pomocou restriktčných endonukleáz *XhoI* a *NotI* a následne prečisťovali prezrážaním etanolom. Ako inzert nám slúžil gén kódujúci Lon

proteázu, PCR produkt o veľkosti 2 355 bp, získaný amplifikáciou z genómu kmeňa *E. coli* KL53. Získaný fragment sme prečist'ovali totožným spôsobom a následne štiepili rovnakými restriktívnymi endonukleázami a opäť prečist'ovali. Ligovali sme T4 DNA ligázou pri 37 °C po dobu 2 hod. s následnou inaktiváciou enzýmu na 10 min. pri 65 °C. Bunky *E. coli* kmeňa DH5α boli transformované pomocou teplotného šoku takto pripravenou ligáciou a selektované na LB médiu s prídavkom 1 % glukózy a kanamycínu s koncentráciou 100 µg/ ml.

Elektroforéza v agarózovom géli

Overovanie štiepenia plazmidu pET28a, rovnako ako aj samotnú analýzu rekombinantov sme realizovali pomocou elektroforézy v 1% agarózovom géli. Parametre prístroja sme nastavili na 110 V, 300 mA a 45 min., pričom ako štandard molekulovej hmotnosti sme použili GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (ThermoFisher).

Expresia v Erlenmeyerových bankách

Samotnej baničkovej expresii predchádzala príprava kompetentných buniek kmeňa *E. coli* BL21(DE3) opracovaním ľadovým chloridom vápenatým a následná transformácia buniek teplotným šokom. LB médium (50 ml) s prídavkom 0,1 % glukózy a príslušného selektívneho markeru sme následne inokulovali nočnou kultúrou buniek *E. coli*, obsahujúcich plazmid pET28a-Lon, v pomere 1:100. Takto pripravenú kultúru sme nechali rásť do výsledného OD₆₀₀ = 0,4 – 0,6. Po dosiahnutí požadovanej optickej hustoty sme indukovali expresiu pridaním 1 mM IPTG. Expresia prebiehala 24 h s odoberaním vzoriek z 0.-4. a 24. h, pričom tieto sme následne centrifugovali 3 min, pri 13400 ot.min⁻¹ na centrifúge MiniSpin (Eppendorf).

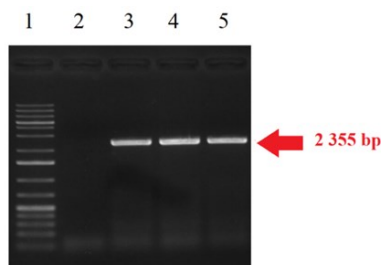
SDS-PAGE analýza

Vzorky na SDS-PAGE sme pripravili pridaním 40 µl 2x koncentrovaného vzorkového tlmivého roztoku a 40 µl TE roztoku, a následným zahriatím na 95 °C na 10 min. Separácia bola realizovaná v 12 % SDS-polyakrylamidovom géli a 4 % nanášacom géli, pričom prebiehala pri prúde 17 mA, pri maximálnom napätí. Ako veľkostný štandard sme použili Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard.

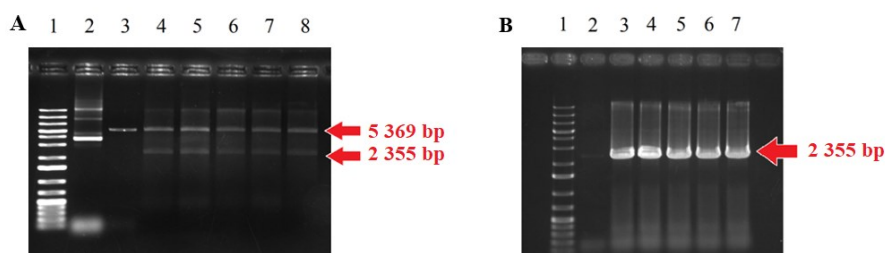
Výsledky a diskusia

V prvej časti práce sa nám podarilo úspešne amplifikovať gén kódujúci Lon proteázu z uropatogénneho kmeňa *E. coli* KL53 s využitím nadizajnovaných primerov so štiepnymi miestami pre *XhoI* a *NotI* (Obr. 1).

V druhej časti práce sa nám podarilo skonštruovať plazmid pET28a-Lon, ktorým sme transformovali bunky kmeňa DH5α *E. coli*. Správnosť klonov sme overili restriktčnou analýzou a metódou PCR pomocou primerov Lon_FWD a Lon_REV. (Obr. 2).

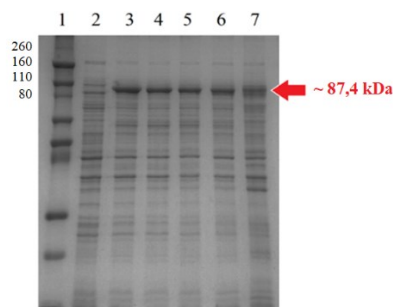


Obr. 1. Amplifikácia génu pre Lon proteázu (2 355 bp). Dráha 1: Štandard molekulovej hmotnosti (GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder), dráha 2: Negatívna kontrola, dráha 3: Amplifikácia s využitím neriedeného templátu, dráha 4: Amplifikácia s využitím 10x riedeného templátu, dráha 5: Amplifikácia s využitím 100x riedeného templátu.



Obr. 2. (A) Štiepna analýza vybraných rekombinantov. Dráha 1: Štandard molekulovej hmotnosti (GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder), dráha 2: Neštiepený plazmid pET28a, dráha 3: Štiepený plazmid pET28a, dráha 4-8: Štiepený plazmid pET28a-Lon. **(B) Overovacia PCR reakcia.** Dráha 1: Štandard molekulovej hmotnosti (GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder), dráha 2: Negatívna kontrola, dráha 3-7: 50 µl PCR reakcia s využitím vyizolovaného plazmidu pET28a-Lon ako templátovej DNA.

Po transformácii plazmidového vektora pET28a-Lon do expresného kmeňa *E. coli* BL21(DE3) sme realizovali baničkovú expresiu v LB médiu s prídavkom 0,1 % glukózy a príslušného selekčného markeru pri 37 °C. Úspešnosť transformácie potvrdila analýza SDS-PAGE preukazujúca prítomnosť cieľového proteínu Lon proteázy o veľkosti 87,4 kDa (Obr. 3).



Obr. 3. Expresia génu pre Lon proteázu v kmeni *E. coli* BL21(DE3). 12% SDS-PAGE baničkovej expresie génu pre Lon proteázu. Dráha 1: Štandard molekulových hmotností; dráha 2-6: 0.-4. h; dráha 7: 24. h.

Záver

V našej práci sa nám podarilo úspešne skonštruovať plazmid pET28a-Lon nesúci gén pre Lon proteázu. V ďalšom kroku sme realizovali úspešnú produkciu formou baničkovej expresie v kmeni *E. coli* BL21(DE3).

PodĎakovanie

Príspevok je výsledkom realizácie projektov APVV-21-0215 a LISPER (ITMS2014:313011V446) na základe podpory operačného programu Integrovaná infraštruktúra financovaného z ERDF.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Ningthoujam D. S., Kshetri P., Sanasam S., Salam N. (2009). World Applied Sciences Journal. 7, p. 907
- [2] Gur E. (2013). Sub-Cellular Biochemistry 66, p. 35
- [3] Butler D. S. C., Cafaro C., Putze J., et al. (2021) Nature Biotechnology 39 (6), p. 754
- [4] Burian J., Tu N., Klucar L., et al. (1998) Folia Microbiol.43, p. 589

Optimalizácia izolácie exozomálnej miRNA z ľudskej plazmy

Kristína Alföldiová¹, Eva Struhárňanská^{1,2}, Martin Šafranek^{2,3}, Juraj Bugala^{2,4}, Ivan Juráš²,
Regina Lohajová^{2,5,6}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Ilkovičova 6, 84215 Bratislava, Slovenská republika; kristina.alfoldiova@uniba.sk

²Lambda Life, a. s., Levočská 3, 851 01 Bratislava, Slovenská republika

³Centrum biológie rastlín a biodiverzity Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Botanický ústav, Dúbravská cesta 9, 845 23 Bratislava, Slovenská republika

⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Vedecký park, Ilkovičova 8, 84104 Bratislava, Slovenská republika

⁵Slovenská zdravotnícka univerzita, Lekárska fakulta, Ústav genetiky a molekulovej medicíny, Limbová 12, 833 03 Bratislava, Slovenská republika

⁶Onkologický ústav Svätej Alžbety, Heydukova 10, 812 50 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Optimization of exosomal miRNA isolation from human plasma

Cancer refers to a group of diseases characterized by the uncontrolled growth and spread of abnormal cells in the body. Cancer diagnosis typically involves a combination of medical history review, physical examination, and various tests. Early diagnosis of cancer is very important, therefore there is need for novel biomarkers in noninvasive diagnosis. Exosomes are small membrane-bound vesicles that are secreted by cells, can be found in various bodily fluids and can be easily collected and analyzed for cancer-related biomarkers. MicroRNAs are small RNA molecules that regulate gene expression and can be also found in exosomes. They have been found to be dysregulated in many types of cancer and may be used as biomarkers for cancer diagnosis. In our study we focused on optimization of isolation of exosomal miRNA for which we used two different kits and we obtained 5 – 10 ng RNA from 0,5 ml of plasma. We determined the absolute quantification of selected miRNA in healthy individuals and oncology patients using RT-qPCR.

Keywords: cancer; novel biomarkers; exosomes; miRNA; RT-qPCR

Úvod a formulácia cieľa

Onkologické ochorenia sú komplexné, systémové, genetické ochorenia, pričom malígna transformácia bunky je viacstupňový proces spojený s akumuláciou mnohých molekulárnych zmien [1]. Tieto molekulárne zmeny ovplyvňujú funkcie buniek v nádore a jeho mikroprostredí. Výsledkom malígnej transformácie je nekontrolovateľná proliferácia, poruchy na úrovni apoptózy, angiogenéza, invázia a metastázovanie atď. Početné génové/genómové alterácie (mutácie, strata heterozygoty, delécie, inzercie, aneuploidia atď.) sú spojené s karcinogénou a všetky uvedené genetické zmeny v konečnom dôsledku vedú k aberantnej génovej expresii. Epigenetické zmeny na úrovni génovej expresie ovplyvňujú fenotyp nezávisle od sekvencie DNA [2]. Tieto epigenetické mechanizmy zahŕňajú metyláciu DNA, remodeláciu chromatinu, nekódujúce RNA (ncRNA), väzbu regulačných proteínov a sú zásadným mechanizmom podieľajúcim sa na malígnej transformácii bunky [3].

Exozómy sú membránou obalené extracelulárne vezikuly (EV), ktoré sú produkované väčšinou eukaryotických buniek [4]. Exozómy hrajú dôležitú úlohu v komunikácii medzi bunkami tým, že nesú svoj obsah vrátane proteínov, metabolitov, RNA (mRNA, miRNA, dlhé nekódujúce RNA), DNA (mtDNA, ssDNA, dsDNA) a lipidov. Medzibunková komunikácia sprostredkovaná exozómami sa podieľa nielen na regulácii normálnych fyziologických procesov, ale aj na patologických procesoch mnohých chorôb, vrátane onkologických. Exozómy a iné EV sa nachádzajú v biologických tekutinách vrátane slín, krvi, moču a cerebrospinálnej tekutiny [5]. Práve miRNA zo skupiny malých nekódujúcich RNA predstavujú sľubný biomarker v diagnostike ako aj liečbe onkologických ochorení. Je známe, že deregulácia expresie rôznych typov miRNA je priamo spojená so vznikom a vývojom mnohých nádorových ochorení [6]. Neinvazívna detekcia cirkulujúcich exozomálnych miRNA a sledovanie ich expresie môže poskytnúť cenné informácie v diagnostike, v určení prognózy ochorenia ako aj v predikcii k cielenej liečbe onkologických pacientov. Napriek tomu sa exozomálna miRNA zatiaľ ako biomarker nevyužíva, pretože sa v krvi nachádzajú aj voľne cirkulujúce miRNA a na hladiny oboch typov môžu mať vplyv tiež rôzne environmentálne faktory [7], preto je základný výskum dôležitý pre ich ďalšie využitie v neinvazívnej diagnostike a personalizovanej medicíne.

Naším cieľom bolo optimalizovať izoláciu exozomálnej miRNA zo vzoriek ľudskej plazmy a metódou absolútnej kvantifikácie na platforme RT-qPCR stanoviť vybrané typy miRNA v zdravých a chorých jedincoch.

Materiál a metódy

Vzorky: Na izoláciu miRNA sme využívali periférnu krv od dobrovoľníkov odoberanú do skúmaviek BD Vacutainer® s prídavkom EDTA proti zrážaniu krvi. Po odobratí sa krv nechala stáť pri laboratórnej teplote 30 minút. Nasledovala centrifugácia pri 300 g/ 4 °C/ 10 min na oddelenie plazmy od krviniek. Plazmu sme prepipetovali do čistých skúmaviek a centrifugovali pri 5000 g/ 4 °C/ 20 min na sedimentovanie doštičiek a apoptických teliesok. Opätovne sme plazmu prepipetovali do čistých skúmaviek a centrifugovali pri 16000 g/ 4 °C/ 30 min na sedimentovanie väčších extracelulárnych vezikúl. Odoberatý supernatant sme rozdelili na alikvóty po 500 µl a uskladnili na -80 °C do ďalšieho použitia.

Izolácia exozómov: Na izoláciu exozómov sme využili Exo-spin™ Exosome Kit (Cell Guidance Systems) a postupovali podľa priloženého postupu. V prípade, ak sme v ďalšom postupe potrebovali pelet exozomov, získaný eluát z kitu sme prezrážavali s 10 % PEG8000 a 1 M NaCl pri 0 °C cez noc, následne sme suspenziu centrifugovali pri 20000g/ 4 °C/ 30 min

a pelety uchovali pri -80 °C.

Izolácia miRNA: Pred izoláciou miRNA sme k vzorkám plazmy pridali exogénnu kontrolu syntetickej ath-miR-159 v množstve 1 pmol. Na izoláciu miRNA z exozómov získaných z Exo-spin™ Exosome Kit sme použili PureLink™ miRNA Isolation Kit (Invitrogen). Alternatívne sme exozomálnu miRNA izolovali priamo z plazmy pomocou Plasma/Serum Exosome Purification and RNA Isolation Mini Kit (Norgen). Získaným vzorkám miRNA sme stanovili koncentráciu použitím Qubit™ microRNA Assay Kit (ThermoFisher Scientific) a uskladnili sme ich na -80 °C do ďalšieho použitia.

Prepis do cDNA: Na prepis miRNA do cDNA sme použili TaqMan™ Advanced miRNA Assays (ThermoFisher Scientific). K vzorkám sme pred prepisom pridali druhú exogénnu kontrolu cel-miR-39 a postupovali sme podľa priloženého protokolu, ktorý zahŕňa polyadenyláciu, ligáciu adaptérov, reverznú transkripciu a predamplifikáciu miRNA. Získané vzorky sme uskladnili na -20 °C do ďalšieho použitia.

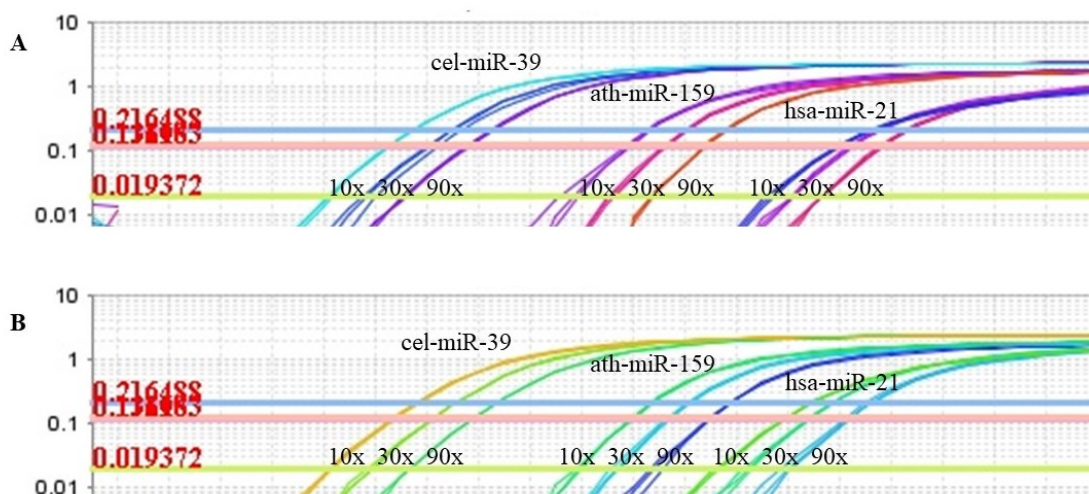
Real-time qPCR: Pri absolútnej kvantifikácii exozomálnej miRNA real-time PCR sme využili TaqMan™ Advanced miRNA Assays (ThermoFisher Scientific) na prístroji Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System. Vzorky sme po predamplifikácii nariedili najskôr 10x (na nariedenie inhibítorov reakcie) a potom sme vzorku nariedili 30x a 90x, a každá vzorka bola analyzovaná v triplikátoch.

Výsledky a diskusia

Plazmu dobrovoľníkov sme spracovali dvoma spôsobmi. V prvom prípade sme najskôr izolovali exozómy a následne sme izolovali miRNA, v druhom prípade sú oba kroky zahrnuté v jednom izolačnom sete. V takto získaných vzorkách sme stanovili koncentráciu miRNA na 0,1 – 0,2 ng/μl, pričom podľa dostupných informácií celkové množstvo malých RNA izolovaných z exozómov predstavuje 6 – 12 ng [8, 9], čomu zodpovedajú aj naše výsledky. Malé odchýlky v koncentráciách neboli spôsobené použitím rozdielnych postupov, pretože rozdiely sa objavili aj pri izolácii rôznych vzoriek rovnakým spôsobom. Rozdiely mohli súvisieť buď so zdravotným stavom (je predpoklad, že onkologický pacient má vyššie množstvo exozómov a teda aj exozomálnej miRNA), prípadne s pohlavím, vekom a pod.

Na verifikáciu zistenia, či izolácia a prepis prebehli správne, sme využili absolútnu kvantifikáciu pomocou RT-qPCR. Vždy sme porovnávali vzorku zdravého dobrovoľníka s pacientom, pričom vzorky boli spracované rovnakým spôsobom a boli použité v triplikách s rovnakými riedeniami. Využili sme pritom exogénne kontroly nie ľudského pôvodu (ath-

miR-159 pochádza z rastliny *Arabidopsis thaliana* a cel-miR-39 pochádza z nematódy *Caenorhabditis elegans*). Na obr. 1 môžeme vidieť, že pri porovnaní exogénnych kontrol zdravého a pacienta nie je badať rozdiely v ct hodnotách, preto predpokladáme, že izolácia aj prepis do cDNA s predamplifikáciou prebehli správne.



Obr. 1. Analýza vzoriek použitím RT-qPCR. A) Zdravý jedinec, B) Pacient. V oboch prípadoch použité exogénne kontroly pred izoláciou a prepisom do cDNA a testovacia hsa-miR-21.

Mnoho štúdií popisuje diagnostický potenciál hsa-miR-21 v spojitosti s rôznymi ochoreniami [10, 11, 12], okrem toho je jedným zo sľubných biomarkerov pri diagnostike onkologických pacientov, pretože je veľmi často upregulovaná, čo súvisí s jej aktivitou – napomáha proliferácii, invázii a rezistencii na terapiu karcinómových buniek [13]. Kvôli týmto skutočnostiam sme sa rozhodli využiť hsa-miR-21 pri absolútnej kvantifikácii pri porovnávaní medzi zdravým jedincom a pacientom (Tab. 1), výsledky však nepreukázali štatisticky významné rozdiely. Napriek nejednoznačným výsledkom vieme podľa účinnosti RT-qPCR (97 – 103 %) určiť, že metóda je nastavená správne a zmeny je potrebné urobiť v iných krokoch, okrem iného bude dôležité stanovenie endogénnych kontrol, na základe ktorých sa bude dať vyhodnotiť aj prípadná zmena v expresii miRNA spojených s onkologickými ochoreniami.

Tab. 1. Porovnanie ct hodnôt pri absolútnej kvantifikácii miRNA z rôznych druhov vzoriek. Pre zjednodušenie tabuľky uvádzame len riedenie 30x.

vzorka	ct		
	ath-miR-159	cel-miR-39	hsa-miR-21
Zdravý jedinec; izolácia miRNA cez Plasma/Serum Exosome Purification and RNA Isolation Mini Kit	21,44	15,15	28,77
Pacient; izolácia miRNA cez Plasma/Serum Exosome Purification and RNA Isolation Mini Kit	21,30	15,09	30,41
Pacient; izolácia miRNA cez Exo-spin™ Exosome Kit a PureLink™ miRNA Isolation Kit	-	15,29	29,75

Ďalšou z úprav môže predstavovať prečistenie vzorky po predamplifikácii – tento krok je využívaný na namnoženie produktu, na druhej strane reakčná zmes obsahuje inhibítory RT-qPCR, preto je vzorky potrebné riediť. Ak by sme dokázali vzorky prečistiť od takýchto inhibítorov, je možné, že by sa nám podarilo získať presnejšie informácie.

Záver

Podarilo sa nám izolovať exozomálnu miRNA zvolenými postupmi, napriek tomu sú doteraz získané dáta z absolútnej kvantifikácie miRNA nejednoznačné, preto sa do budúcnosti zameriame nielen na optimalizáciu predamplifikácie a zníženia koncentrácie inhibítorov RT-qPCR ale aj odhalenie endogénnych kontrol, ktoré by mali slúžiť pri relatívnej kvantifikácii miRNA spojených s onkologickými ochoreniami.

PodĎakovanie

Príspevok je výsledkom realizácie projektu LISPER (ITMS2014:313011V446) na základe podpory operačného programu Integrovaná infraštruktúra financovaného z ERDF.

Zoznam použitej literatúry

- [1] WHO [Citované: 22.3.2023] <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>
- [2] Lu Y., Chan Y. T., Tan H. Y., et al. (2020) Mol. Cancer. 19, p. 16
- [3] Cheng Y., He C., Wang M., et al. (2019) Signal. Transduct. Tar. 4(1), p. 62
- [4] Théry C., Witwer K. W., Aikawa E., et al. (2018) J. Extracell. 7(1), 1535750
- [5] Nonaka T., Wong D. T. (2022) Annu. Rev. Anal. Chem. 15, p. 107
- [6] Galvão-Lima L. J., Morais A. H., Valentim R. A., et al. (2021) Biomed. Eng. Online. 20,

p. 1

- [7] Panico A., Tumolo M. R., Leo C. G., et al. (2021) *Epigenomics*. 13(02), p. 145
- [8] Cheng L., Sharples R. A., Scicluna B. J., et al. (2014) *J. Extracell.* 3(1), 23743
- [9] Liang M., Yu S., Tang S., et al. (2020) *Front. Genet.* 11, 449
- [10] Ahmed F.E., Amed N.C., Vos P.W., et al. (2012) *Cancer Genom. Proteom.* 9, 179
- [11] Schee K., Boye K., Abrahamsen T.W., et al. (2012) *BMC Cancer*. 12
- [12] Kanaan Z., Rai S.N., Eichenberger M.R., et al. (2012) *Ann. Surg.* 256, p. 544
- [13] Sun L.H., Tian D., Yang Z.C., et al. (2020) *Sci. Rep.* 10(1), 8271

Optimalizácia bioinformatickej analýzy genomickej sekvencie bakteriofágov

Andrea Andrésová¹, Tomáš Talač¹, Peter Ďurovka^{1,3}, Michal Kajsík^{1,2,3}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
ada.andresova@gmail.com

²Univerzita Komenského v Bratislave, Vedecký park, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava, Slovenská republika

³Medirex Group Academy n.o. Novozámocká 1/67, 949054 Nitra, Slovenská republika

Abstract

Optimization of bioinformatic analysis of a genomic sequence of bacteriophages

Bacterial infections are following humanity from the beginning. At the moment the standard of bacterial infection treatment is antibiotics. However, there is a rising trend of resistance of microorganisms against antibiotics, so there rises the inability to the treatment of bacterial infections by recommended antibiotics. Phages used in phage therapy must be characterized either on proteomic and genome levels or by the level of interaction with the host. Bioinformatic analysis can predict the characteristics of phages in a short period. This can simplify the designing and manufacturing of phage cocktails. Since the amount of sequenced phage genomes is rising, there is a need to put great emphasis on assembling and annotation of phage genomes. The main objective of this study is the bioinformatic analysis of the genomic sequence of bacteriophages. We have accomplished the main objective by annotating and assembling the genome of bacteriophage.

Keywords: bacteriophages; bioinformatic analysis; assembly; annotation

Úvod a formulácia cieľa

Infekcie spôsobené baktériami sprevádzajú ľudstvo už od nepamäti. Aktuálnou štandardnou liečbou pre bakteriálne infekcie sú antibiotiká. Avšak mikroorganizmov rezistentných voči antibiotikám pribúda, a teda vzniká neschopnosť vyliečiť niektoré bakteriálne infekcie odporúčanými antibiotikami. Podľa predikcie Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) sa do roku 2050 situácia ešte zhorší a multirezistencia spôsobí až 10 miliónov úmrtí. To vyvoláva potrebu hľadať alternatívne metódy v boji s patogénmi rezistentnými na antibiotiká. Hľadanie alternatívnych stratégií sa v posledných rokoch zameralo na bakteriofágy ako na potenciálne terapeutiká. Avšak pôvodná myšlienka využiť fágy ako liečivo je stará viac ako 100 rokov [1,2].

Fág použitý na fágovú terapiu musí byť charakterizovaný či už na proteomickej a genómovej úrovni alebo na úrovni interakcie s hostiteľom. Možnosťou, ako tieto procesy urýchliť, je analýza in silico. Bioinformatická analýza dokáže rýchlo predpovedať vlastnosti fágov. Čo zjednodušuje návrh a výrobu fágových koktejlů [3].

Obnovený záujem o výskum bakteriofágov, ktorý je spojený s dostupným sekvenovaním, vedie k rastúcemu počtu známych fágových genómov. Keďže počet fágových genómov pribúda, zvyšuje sa aj potreba dôkladného skladania a anotácie fágových genómov. Existuje množstvo nástrojov a platforiem, ktoré umožňujú zostavenie a anotáciu fágových genómov [4].

Cieľom práce bola bioinformatická analýza genomickej sekvencie bakteriofága schopného infikovať zástupcov rodu *Cronobacter*, ktorý bol izolovaný z čističky odpadovej vody v Senici. Čiastočnými cieľmi práce boli izolácia a purifikácia bakteriofága z čističky odpadovej vody, úprava krátkych čítaní z vysokoparalelného sekvenovania, poskladanie genomickej sekvencie bakteriofága, anotácia genómu a následne porovnanie použitých bioinformatických nástrojov.

Materiál a metódy

Izolácia a purifikácia

Bakteriofág sme izolovali z čističky odpadových vôd v Senici. Fág sme opakovane odpichovali z jednotlivých plakov a amplifikovali na indikátorovom kmeni. Následne sme ho koncentrovali v roztoku polyetylén glykolu a NaCl, a purifikovali pomocou ultracentrifugácie v gradiente chloridu cézneho. Po dialýze sme z purifikovanej zmesi fágov izolovali DNA prostredníctvom Phage Isolation Kit- Norgen Biotek Corp. Postupovali sme podľa návodu, ktorý poskytol výrobca, s výnimkou modifikácie objemu elučného pufru. Purifikovanú DNA sme sekvenovali pomocou prístroja MiSeq (Illumina, USA) s použitím v2 300 cyklovej chémie a Nextera XT protokolu na prípravu knižnice krátkych čítaní.

Bioinformatická analýza

Kvalitu krátkych čítaní sme skontrolovali cez nástroj FastQC v0.11.9. Surové čítania sme upravovali pomocou nástroja Trimmomatic v0.39 s nasledujúcimi parametrami: slidingwindow:5:20, headcrop:20, minlen:36 a trailing:20. Následne sme deduplikovali nástrojom FastUniq v.1.1 s predvolenými nastaveniami. Po strihaní a deduplikácii sme opäť skontrolovali kvalitu v nástroji FastQC. Krátke čítania sme skladali pomocou 3 rôznych assemblerov: SPAdes, MEGAHIT a Velvet. Nástrojom SPAdes v.3.15.5 sme skladali s predvolenými nastaveniami + --careful flag, na zredukovanie mismatchov a krátkych indelov. Nástrojom MEGAHIT v.1.2.9 sme skladali s predvolenými nastaveniami. Pri skladaní genómu s nástrojom Velvet v.1.2.10 a VelvetOptimiser v.2.2.6 sme použili nasledovné parametre: VelvetOptimiser.pl -s 31, VelvetOptimiser.pl -e 251. Najdlhšie kontigy zo všetkých assemblerov sme porovnali cez Average Nucleotide Identity (ANI) calculator a BLAST.

Skladanie genomickej sekvencie použitím 3 rôznych assemblerov, sme vyhodnotili pomocou nástroja QUAST vo verzii 5.2.0. Na ďalšiu analýzu sme použili genomickú sekvenciu vo formáte fasta, poskladanú nástrojom SPAdes.

Proteín kódujúce gény sme identifikovali cez server RAST a nástroje Prokka v1.14.5 a MetaGeneAnnotator. Funkciu hypotetických proteínov sme overili cez BLAST a InterPRO. Na identifikáciu tRNA génov v genomickej sekvencii bakteriofága sme použili programy ARAGORN vo verzii 1.2.41.c a tRNAScanSE 2.0. Platforma Phage AI nám poskytla taxonomické zaradenie bakteriofága a odhalila životný cyklus bakteriofága. Fylogenetický strom sme zhotovili pomocou online programu VICTOR.

Hostiteľská špecificita bakteriofága

Na vrchný agar obsahujúci príslušnú bakteriálnu kultúru sme nakvapkali bakteriofága a misky sme kultivovali cez noc v termostate pri teplote 37° C. Ak bakteriofág baktérie špecificky lyzoval, na ďalší deň sme pozorovali vznik plakov.

Výsledky a diskusia

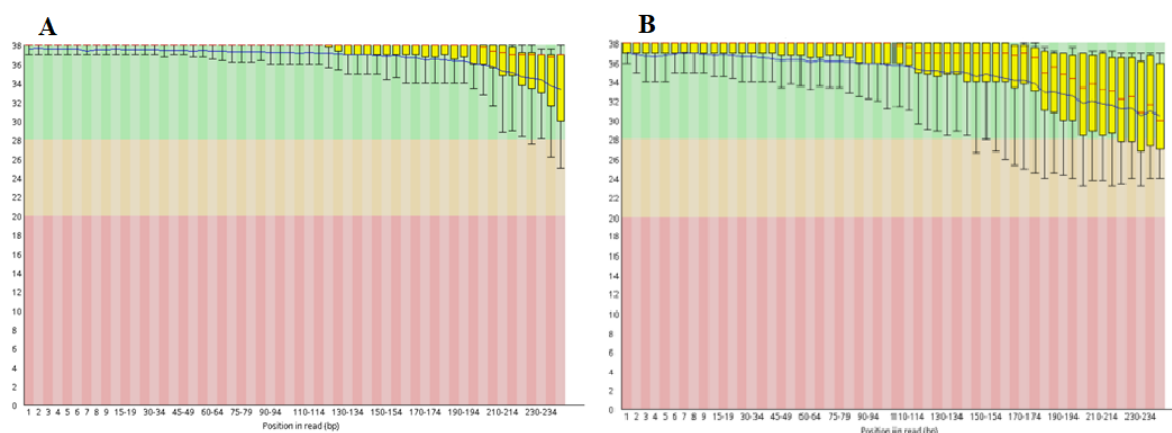
Z čističky odpadových vôd sa nám podarilo izolovať bakteriofága vB_Cdub_VP22. Izolovali a amplifikovali sme ho na indikátorovom bakteriálnom kmeni *Cronobacter dublinensis* LMG 23825. Informácie o izolovanom bakteriofágu sú zhrnuté v tabuľke 1.

Tab. 1. Základné informácie k izolovanému bakteriofágu

Názov bakteriofága	vB_Cdub_VP22
Zdroj	Čistička odpadových vôd v Senici
Indikátorový kmeň	<i>Cronobacter dublinensis</i> LMG 23825
Titer po purifikácii	4×10^{10} PFU/ml
Taxonomické zaradenie	čelad' Autographiviridae, rod Cronosvirus
Najbližší príbuzný	<i>Cronobacter sakazakii</i> fág GAP227

Hostiteľskú špecificitu bakteriofága sme overili na 36 kmeňoch patriacich do rodu *Cronobacter* (19), *Escherichia* (5), *Citrobacter* (6) a *Enterobacter* (5). Bakteriofág vB_Cdub_VP22 infikoval 44% kmeňov zo všetkých testovaných a špecificky lyzoval baktérie rodu *Cronobacter*.

Krátke čítania sme upravili strihaním tak, aby priemerné skóre kvality báz bolo nad 30.



Obr. 1. Kontrola kvality čítaní po trimmovaní a deduplikácii. V časti A je zobrazená kvalita forward čítaní, v časti B je zobrazená kvalita reverse čítaní. Priemerné skóre kvality báz sa pohybuje nad 30. Výstup z nástroja FastQC.

Nástroj SPAdes poskladal 4807 kontigov s veľkosťou menšou ako 500 bp a iba 4 kontigy s veľkosťou väčšou ako 1000 bp. Do kontigov namapoval najviac čítaní z použitých assemblerov. V assembly cez MEGAHIT bolo celkovo zostavených 162 kontigov s veľkosťou menšou ako 500bp a 1 kontig s veľkosťou väčšou ako 1000 bp. Velvet celkovo zostavil iba 1 kontig s veľkosťou 41879 bp. Do kontigu namapoval najmenej čítaní z použitých assemblerov. Všetky assemblery vyskladali obdobne dlhý najväčší kontig. Obsah GC párov sa pohyboval od 55,04% do 55,79%. Porovnanie použitých assemblerov uvádzame v tabuľke 2.

Najdlhšie kontigy zo všetkých assemblerov sme porovnali cez ANI Calculator a BLAST. Najdlhší kontig poskladaný cez MEGAHIT bol na 99,92% identický s kontigom vyskladaným cez SPAdes, E hodnota = 0. Najdlhší kontig poskladaný cez Velvet bol na 99,93% identický s kontigom vyskladaným cez SPAdes, E hodnota = 0. Všetky najdlhšie kontigy boli otočené rovnako.

Tab. 2. Porovnanie použitých assemblerov

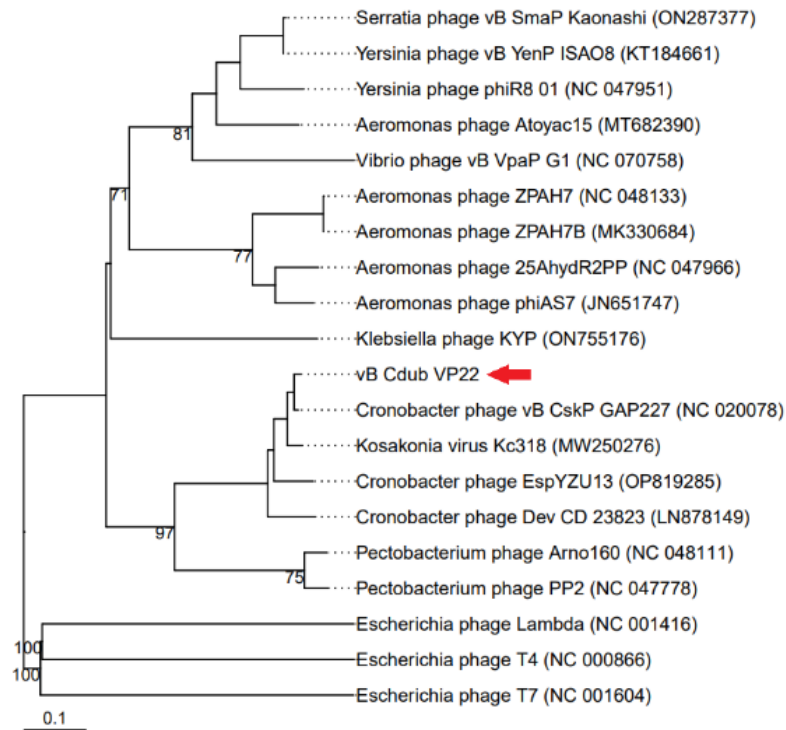
<i>Parameter</i>	<i>SPAdes</i>	<i>MEGAHIT</i>	<i>Velvet</i>
<i>Počet kontigov >= 500 bp</i>	68	25	1
<i>Dĺžka najdlhšieho kontigu (bp)</i>	41742	41830	41879
<i>Obsah GC párov (%)</i>	55,79	55,04	55,71
<i>Namapované čítania (%)</i>	99,26	96,62	93,70
<i>L50</i>	1	1	1

Na ďalšiu analýzu sme použili najdlhší kontig poskladaný cez SPAdes, ktorý predstavoval celogenómovu sekvenciu nášho bakteriofága.

Platforma Phage AI nám taxonomicky zaradila bakteriofág vB_Cdub_VP22 do triedy *Caudoviricetes*, čeľade *Autographiviridae*, podčeľade *Melnykvirinae* a rodu *Cronosvirus*. Z pohľadu životného štýlu bol náš bakteriofág klasifikovaný s 96% presnosťou ako lytický.

Najviac proteín kódujúcich génov identifikovala platforma RAST, až 50. MetaGeneAnotator našiel 49 takýchto génov a program Prokka iba 47 génov. RAST a Prokka priradili funkciu niektorým génom, no väčšina proteínov bola hypotetická. Funkciu týchto hypotetických proteínov sme overili cez BLAST a InterPRO. Pomocou programov sa nám podarilo priradiť funkciu 38% proteínom, 62% bolo hypotetických. Ani jeden z programov na identifikáciu tRNA (ARAGORN a tRNAScanSE) nedetekoval v genóme bakteriofága tRNA gény.

Pomocou BLASTu sme našli najbližších príbuzných izolovaného bakteriofága. Úplne najbližším príbuzným je *Cronobacter sakazakii* fág GAP227, zdieľajú medzi sebou 96% podobnosť. Ako môžeme vidieť na obrázku 2, najbližší príbuzní patria spolu do jedného clustra. Zaujímavosťou je, že *Cronobacter* fág Dev-CD-23823, ktorý bol izolovaný na našom pracovisku pred niekoľkými rokmi, nie je úplne najbližším príbuzným nášho bakteriofága. Zdieľajú medzi sebou 81% podobnosť.



Obr. 2. Strom príbuznosti zostavený pomocou online nástroja VICTOR

Záver

Z čističky odpadových vôd sa nám podarilo izolovať bakteriofág, ktorý je schopný infikovať zástupcov rodu *Cronobacter*. Izolovaného bakteriofága sme bioinformaticky analyzovali, spracovali sme surové čítania z vysokoparalelného sekvenovania, poskladali sme celogenómovú sekvenciu, ktorú sme následne anotovali. Použili sme rôzne nástroje a platformy, ktoré sme medzi sebou porovnali.

PodĎakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Výskum a vývoj využiteľnosti autonómnych lietajúcich prostriedkov v boji proti pandémie spôsobenej COVID-19, kód ITMS: 313011ATR9, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Tan S. Y., Tatsumura Y. (2015) SINGAP. MED. J. 56(7), p. 366
- [2] Brussow H. (2012) Virology. 434(2), p. 138
- [3] Myelnikov D. (2018) J. Hist. Med. Allied. Sci. 73,4 p. 385
- [4] Turner D., Adriaenssens E. M., Tolstoy I., et al. (2021) *PHAGE*. p. 170

Využitie celogenómového sekvenovania pri detekcii profágov v kmeňoch čelade *Lactobacillaceae*

Michal Andrežál¹, Zuzana Rešková², Tomáš Kuchta², Hana Drahovská¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
michalandrezal@gmail.com

²Výskumný ústav potravinársky, Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Priemyselná 4, 821 08 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Application of whole genome sequencing for prophage screening of *Lactobacillaceae* strains

Bacteria from family *Lactobacillaceae*, are members of lactic acid bacteria (LAB). These bacteria are able to produce lactic acid, thus playing a key role in souring raw milk. It is necessary to study strains that will be used as starter cultures, for presence of prophages in their genomes. After induction, prophages could slow or completely stop fermentation reaction. In this study we analysed 16 strains, belonging to family *Lactobacillaceae*, for presence of prophage regions. We managed to detect prophage regions in all analysed strains, although many of them were too short or didn't contain genes required for proper morphogenesis of phage particle or genes necessary for host cell lysis. Using program PhiSpy we were able to detect 69 prophage regions, by manual curation in Geneious program 59 prophage regions and using program VirSorter2 55 prophage regions. Out of these, 40 sequences were identified as prophage regions by two or more programs, and were selected for further analysis.

Keywords: *Lactobacillaceae*, whole genome sequencing, prophage

Úvod a formulácia cieľa

Zástupcov čelade *Lactobacillaceae* radíme medzi baktérie mliečneho kvasenia (LAB), ktoré sa vyznačujú zvýšenou toleranciou na nižšie pH. Sú schopné produkovať kyselinu mliečnu pomocou procesu degradácie hexózových sacharidov, vďaka čomu sa často využívajú v potravinárskom priemysle [1, 2]. Práve vďaka ich dlhodobému a nezávadnému využívaniu, ich radíme medzi mikroorganizmy označované ako „GRAS“ (generally regarded as safe – všeobecne považované za bezpečné) [2, 3].

Prítomnosť bakteriofágov v procese fermentácie predstavuje v mliekarenskom priemysle závažný problém, nakoľko môže viesť ku spomaleniu alebo zastaveniu fermentačnej reakcie [4]. Negatívny vplyv môžu mať taktiež profágy, ktoré sú inkorporované priamo do genómov baktérií a po ich indukciu a vstupe do lytického cyklu, môžu spomaliť alebo zastaviť fermentáciu. To vedie k zvýšeniu finančných nákladov, čo má celkovo negatívny vplyv na samotnú výrobu. Profágy tiež môžu niesť gény zvyšujúce virulenciu hostiteľských buniek alebo gény, ktoré môžu mať negatívny vplyv na organoleptické vlastnosti finálneho produktu [5, 6]. Preto je nevyhnutné vopred skúmať obsah profágov u produkčných kmeňov pred ich

komerčným využitím v mliekarenskom priemysle [4].

Cieľom práce bola detekcia profágov v kmeňoch patriacich do čeľade *Lactobacillaceae*, ktoré sú určené na tvorbu špecifických štartovacích kultúr pre výrobu bryndze.

Materiál a metódy

Izolácia a kultivácia bakteriálnych kmeňov

Bakteriálne kmene boli izolované zo srvátkových kultúr na VÚP Bratislava. Kmene boli kultivované v médiu MRS pri teplote 37°C.

Izolácia DNA a príprava knižníc na NGS

Na izoláciu bakteriálnej DNA sme použili Higher Purity™ Bacterial Genomic DNA Isolation Kit (CanvaxBiotech; Cordoba, Spain). Množstvo izolovanej DNA sme kvantifikovali pomocou Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific; Eugene, Oregon USA). Na prípravu knižníc na celogenómové sekvenovanie sme použili protokol Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina; SanDiego, California USA). Knižnice boli prečistené pomocou magnetických guľôčok AMPure XP (Beckman Coulter Life Sciences; Indianapolis, Indiana USA). Dĺžku fragmentov jednotlivých knižníc sme overili metódou elektroforézy na čipe (High Sensitivity DNA chip) na prístroji 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent Technologies; Santa Clara, California USA). Sekvenovanie prebehlo na platforme Illumina – MiSeq (Illumina; SanDiego, California USA).

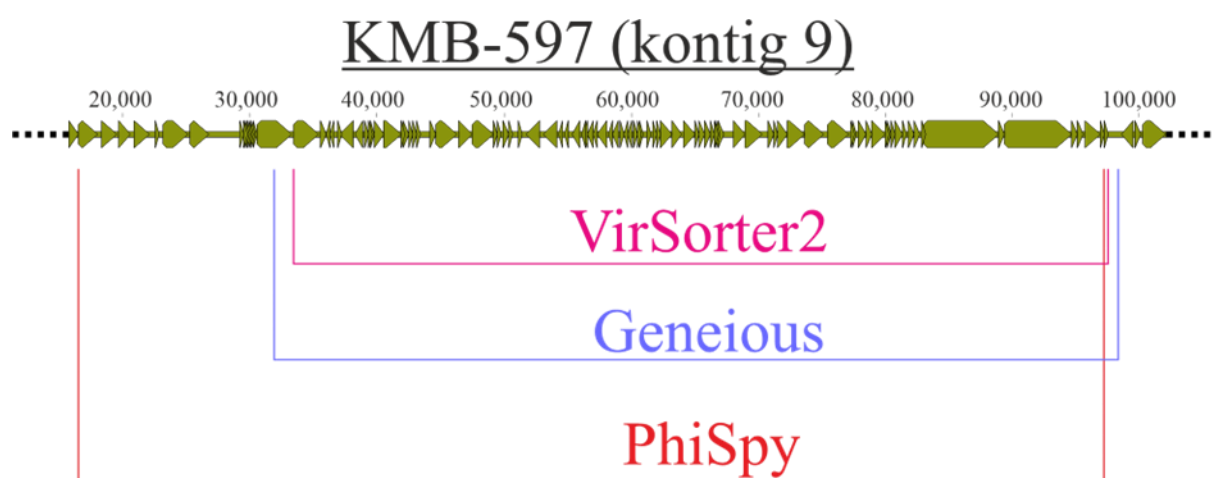
Bioinformatické spracovanie a analýza genómov a metagenomických dát

Párové čítania sme zložili pomocou programu SPAdes (Center for Algorithmic Biotechnology; St. Petersburg State University, Russia). Následne sme tieto genómy anotovali pomocou online programov PATRIC (Pathosystem Resource Integration Center) a RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology). Profágy sme vyhľadávali priamo v anotovaných sekvenciách pomocou programu Geneious (Biomatters; Auckland, New Zealand) alebo sme využili programy PhiSpy (Edwards Bioinformatics Lab; Flinders University, Australia) a VirSorter2 (Sullivan Lab; The Ohio State University, USA), ktoré sú priamo určené na vyhľadávanie profágov.

Výsledky a diskusia

Celogenómovo sme sekvenovali celkovo 16 kmeňov čeľade *Lactobacillaceae*.

Konkrétne sa jednalo o kmene *L. plantarum/paraplantarum* (n=6), *L. casei/paracasei* (n=5), *L. fermentum* (n=2), *L. brevis* (n=2) a *L. parabuchneri* (n=1). Pomocou manuálneho prehľadávania anotovaného genómu v programe Geneious sme detekovali profágové sekvencie vo všetkých analyzovaných kmeňoch. Získané výsledky sme porovnali s vyhľadávaním profágov pomocou špecializovaných programov PhiSpy a Virsorter2. Príklad detekcie profágového regiónu v kmeni KMB-597, je znázornený na obr. 1. Detegovaná sekvencia vykazovala podobnosť s profágom ctUZT2. Počty získaných profágových regiónov a ich priemerné dĺžky sú uvedené v tab. 1.



Obr. 1. Profágový región detekovaný programami VirSorter2, PhiSpy a manuálnym prehľadáváním anotácie v programe Geneious. Na obrázku je znázornená časť kontigu deväť, v ktorej bol detekovaný profág príbuzný k ctUZT2.

Tab. 1. Základné údaje o počte detekovaných profágových regiónov v analyzovaných kmeňoch

Program	Počet detekovaných regiónov	Priemerná dĺžka (bp)
Geneious	59	34 613
PhiSpy	69	15 821
VirSorter2	55	22 281

Následne sme pomocou programu BLAST týmto fragmentom určili najbližšieho príbuzného profága. Pracovali sme len s regiónmi, ktoré boli identifikované aspoň dvoma metódami (Tab. 2).

Tab. 2. Lokalizácia profágových fragmentov detekovaných v kmeňoch z čeľade *Lactobacillaceae*.
V tabuľke sú znázornené len kontigy, ktoré obsahovali profágové sekvencie, rovnako identifikované pomocou dvoch alebo viacerých spôsobov vyhodnotenia. Najbližší príbuzný profág bol určený pomocou algoritmu BLASTn. Viacero* značí, že každý z fragmentov nachádzajúcich sa na daných kontigoch mal iného najbližšieho príbuzného profága

Program →	Geneious		PhiSpy		VirSorter2	
Kmeň ↓	Kontig/y	Najbližší príbuzný	Kontig/y	Najbližší príbuzný	Kontig/y	Najbližší príbuzný
Lactiplantibacillus plantarum / paraplantarum						
KMB-597	9	ctUZT2	9	ctUZT2	9	ctUZT2
KMB-614	17	ctevG3	17	ctevG3	17	ctevG3
	44, 57, 62	Sha1	35, 36, 38, 46	Viacero*	35, 36, 38, 44, 46, 57, 62	Viacero*
KMB-618	1	ctu0P1	1	ctu0P1	1	ctu0P1
			21	ct97I3	21	ct97I3
			24	ctUZT2	24	ctUZT2
KMB-619	14, 17, 122, 177	ctzJ01	14	ctLCL3, ctzJ01	14	ctyPQ2
			103	ctevG3	103	ctu0P1
KMB-621	11, 32	ctjnQ4	11, 32, 58, 66	Viacero*	11, 32, 58, 66	Viacero*
KMB-599	42	Phig1e	42	ctUZT2	42	ctUZT2
			11	ctyPQ2	11	ctyPQ2
Lacticaseibacillus casei / paracasei						
KMB-598	1	PLE3	1	PLE3	1	PLE3
KMB-616	22	PLE2	13	ctG1U4	13	ctYhx1
	28, 92, 105	gtGXo3	22	PLE2	22	PLE2
29, 92			ctdjh1	29	ctlk33	29
64	ctxtv2	92, 64	Viacero*			
KMB-623	3, 22	ct6N81	3	ct6N81	3	ct6N81
			22	R3.1	22	R3.1
KMB-1135	18, 23	Lrm1	18	ctZby4	18	ctlQ610
			23	P7.1	23	P7.1
Limosilactobacillus fermentum						
KMB-612	27	ctrpA1	27	ctrpA1	27	ctrpA1
KMB-613	1	ct6kx1	1	ct6kx1	1	ct6kx1
	5	JNU P5	5	JNU P5	5	JNU P5
Levilactobacillus brevis						
KMB-615	20	LBR48	20	LBR48	20	LBR48
			36	ctyPQ2	36	ctyPQ2
KMB-620	24, 51, 63	ctyPQ2	24,51,63	Viacero*	24	ctyPQ2
Lentilactobacillus parabuchneri						
KMB-1134	20	ctkN83	20	ctkN83	20	ctkN83
	25	ctkuu1	25	ctkuu1	25	ctkuu1
			57	ctkuu1		

Vo všetkých kmeňoch sme detekovali fragmenty obsahujúce fágové gény, avšak častokrát to boli nekompletné profágy. Niektoré profágové oblasti neobsahovali gény zapojené do morfogénézy fágových častíc a gény zapojené do lýzy hostiteľskej bunky. To môže naznačovať, že sa jedná o zvyšky pôvodne funkčného profága [7]. Väčšina profágov, ktoré boli určené ako blízko príbuzné nepokrývala celú časť identifikovaných fragmentov, čo mohlo byť spôsobené neúplným osekvenovaním danej oblasti. Taktiež to môže znamenať, že sa jedná o nové, zatiaľ nepopísané profágy. Porovnanie dĺžok identifikovaných profágov, ako aj

pokrytie najbližším príbuzným profágom, je uvedené v tab. 3. V tabuľke sú uvedené len regióny, ktoré boli identifikované ako fágové pomocou všetkých troch metód.

Tab. 3. Porovnanie dĺžok profágových segmentov identifikovaných v analyzovaných kmeňoch.
Znázornené sú len také fágové regióny, ktoré boli identifikované pomocou všetkých troch metód rovnako.
*Kontigom boli rôznymi metódami priradené odlišné, navzájom veľmi podobné profágy

Kmeň ↓	Kontig (fágový región)	Dĺžka fragmentu (kbp)			Najbližší príbuzný				
		Geneious	PhiSpy	Virsorter2	Názov	Dĺžka (kbp)	Pokrytie		
							Geneious	PhiSpy	VirSorter 2
<i>Lactiplantibacillus plantarum / paraplantarum</i>									
KMB-597	9	67,7	80,7	64,1	ctUZT2	52	61%	50%	62%
KMB-614	17	18,9	21,1	22	ctevG3	29	81%	75%	75%
KMB-618	1	39,9	33,4	37,7	ctu0P1	45,4	53%	48%	46%
KMB-619	14	19,3	24,3	46,6	ctzJ01*	30,5	68%	56%	57%
KMB-621	11	29,5	32,2	34,8	ctjnQ4*	42,9	67%	67%	51%
	32	6,2	18,8	29,2	ctyPQ2*	46	46%	59%	61%
KMB-599	42	-	47	46,6	ctUZT2	52	-	30%	30%
	42	40,3	-	-	Phig1e	42,2	36%	-	-
<i>Lactocaseibacillus casei / paracasei</i>									
KMB-598	1	38,9	41,5	39,9	PLE3	41	68%	62%	65%
KMB-616	22	30,8	28	33,2	PLE2	35	81%	89%	79%
KMB-622	29	27,9	32	34,4	ctlk33	40,6	49%	44%	41%
KMB-623	3	21,1	21,6	22,6	ct6N81	40,9	73%	74%	71%
	22	15,5	10	19,3	ct6N81*	40,9	16%	60%	36%
KMB-1135	18	33,7	24,6	38,4	Lrm1*	39,9	41%	64%	44%
	23	4,9	32,3	34,5	Lrm1*	39,9	30%	73%	74%
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>									
KMB-612	27	29,8	23,4	27,9	ctrpA1	27,1	81%	97%	82%
KMB-613	1	19,1	58,9	40,2	ct6kx1	17,7	76%	24%	36%
	5	44,6	56,6	45,7	JNU P5	58,2	46%	49%	60%
<i>Levilactobacillus brevis</i>									
KMB-615	20	35,3	38,1	42,8	LBR48	48,2	60%	45%	50%
KMB-620	24	14	9,9	9,9	ctyPQ2	46	66%	75%	75%
<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>									
KMB-1134	20	43,1	24,4	47,3	ctkN83	50	56%	48%	56%
	25	37,3	26	36,9	ctkuu1	42,9	67%	72%	74%

Celkovo najviac profágových oblastí sme detekovali pomocou programu PhiSpy avšak pri bližšej analýze sme zistili, že väčšina identifikovaných fragmentov obsahovala výlučne bakteriálne gény, a preto bola nesprávne určená. Analýza programom VirSorter2 obsahuje krok, v ktorom sa odstraňuje práve takéto chybné určené sekvencie, čo výrazne urýchlí identifikáciu profágových regiónov.

Okrem počtu identifikovaných profágových regiónov sa výsledky líšili medzi metódami aj v kontigoch, v ktorých boli profágové regióny identifikované. Taktiež väčšina referenčných profágov uvedených v tab. 2 a 3, pochádzala z rovnakej štúdie zaoberajúcej sa detekciou profágov skríningom tisícok genómov [8]. To môže znamenať, že fágové regióny,

ktoré boli identifikované na rovnakých kontigoch, ale bol im určený odlišný najbližší príbuzný profág, sú v skutočnosti vysoko príbuzné.

Záver

V práci sme pomocou celogenómového sekvenovania analyzovali prítomnosť profágov v kmeňoch čeľade *Lactobacillaceae*. Tieto kmene boli vybrané na základe ich potenciálneho využitia pri tvorbe štartovacích kultúr špecificky určených pre tvorbu bryndze. Je nevyhnutné analyzovať prítomnosť profágov v kmeňoch štartovacích kultúr, pretože profágy by po indukcii mohli viesť k spomaleniu alebo úplnému zastaveniu fermentácie. Využitím troch rôznych spôsobov detekcie profágov sme analyzovali 16 kmeňov LAB, pričom sme vo všetkých detekovali regióny obsahujúce profágové gény. V niektorých prípadoch sa jednalo o profágové oblasti, ktoré neboli kompletne a chýbali im niektoré esenciálne gény. Na základe toho sa domnievame, že sa jedná o už nefunkčné profágy, ktoré by nemuseli mať negatívny vplyv na fermentačnú reakciu. Nevýhodou použitých metód môže byť aj využitie vopred zostavenej databázy fágových sekvencií, na základe ktorej sú profágy detekované. To má za následok uprednostňovanie detekcie už známych profágov voči doposiaľ nepopísaným fágom. Na druhú stranu, využitie špecializovaných programov je rýchlejšie ako manuálne prehľadávanie anotovaných genómov.

Schopnosť indukcie detekovaných profágov bude overená v najbližšom období.

PodĎakovanie

Tento príspevok je výsledkom realizácie projektu APVV-20-0001.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Alakomi H. L., Skytta E., Saarela M., et al. (2000) Appl. Environ. Microbiol. 66(5), p. 2001
- [2] Bernardeau M., Vernoux J. P., Henri-Dubernet S., et al. (2008) Int. J. Food Microbiol. 126, p. 278
- [3] Alvarez-Ordóñez A., Bolton D., Bover-Cid S., et al. (2020) BIOHAZ 18(2), p. 1
- [4] Garneau J. E., Moineau S. (2011) Microb. Cell. Fact. 10(1), p. 1
- [5] Ambros C., Ehrmann M. (2022) BMC Microbiol. 22(1), p. 1
- [6] Guo T., Zhang C., Xin Y., et al. (2016) JIMB 43(5), p. 681
- [7] Aucoeur A., Chain F., Langella F., et al. (2018) Front. Microbiol. 9, p. 1
- [8] Tisza M. J., Buck Ch. B., (2021) Microbiology 118(23), p. 1

Prvé záznamy o faune ovadov (Diptera: Tabanidae) na lokalite Ornitologický stacionár Drienovec

Attila Balogh

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra zoológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; balogh26@uniba.sk

Abstract

First records about horseflies fauna (Diptera: Tabanidae) of Ornithological Centre at Drienovec

During the field works in 2022, a total of 13 species of tabanids were recorded in Ornithological Centre at Drienovec (Slovak karst region): *Atylotus* sp., *Haematopota italica*, *H. pluvialis*, *Hybomitra solstitialis*, *Chrysops caecutiens*, *Philipomyia graeca*, *Tabanus bromius*, *T. glaucopis*, *T. maculicornis*, *T. spodopteris*, *T. sudeticus*, *T. tergestinus*, *Theriopectes gigas*. Tabanids were captured once in June with an entomological net and once in August with a Manitoba trap. No new species was documented for the Slovak Karst. A total of ten individuals of tabanids were trapped into mist nets during the field trips. They were determined into four species and one genus: *Atylotus*, *Tabanus bromius*, *T. glaucopis*, *T. spodopteris*, *T. sudeticus*. The horseflies were caught in mist nets above water surface. Trapped tabanids in the mist nets were likely water-seeking individuals. Based on the recorded observation, it is possible to consider ornithological nets as a new type of ecological trap for tabanids.

Keywords: horseflies; mist nets; ecological trap; karst

Úvod a formulácia cieľa

Na Slovenska je známy výskyt 56 druhov ovadov. Vajíčka sú kladené v znáškach napríklad na vlhkú pôdu alebo na litorálnu vegetáciu. Larvy ovadov sú predátori. Dospelé samce sa živia rastlinnými šťavami, zatiaľ čo samice sú hematofágne. Pretože sa samičky živia krvou stavovcov, sú vektormi mnohých ochorení [1]. Poznať súčasný výskyt konkrétnych druhov ovadov na Slovensku je dôležité pri hodnotení ich medicínskeho a veterinárneho potenciálu. Úroveň poznania fauny ovadovitých, nielen na európskom kontinente, sa však vo všeobecnosti považuje za relatívne nízku [2]. Poznanie fauny ovadov Slovenska je založené na starších údajoch, pričom výsledky všetkých faunistických výskumov do roku 1995 zhrňajú tri práce [3, 4, 5]. V minulosti teda bola pozornosť venovaná aj faune ovadov východného Slovenska. Napríklad boli publikované práce zamerané priamo na ovady bývalého východoslovenského kraja [6, 7, 8]. V šesťdesiatich rokoch minulého storočia prebiehal v rámci Slovenského krasu pravidelný výskum na dvoch lokalitách: Ardovo a Zádiel [9]. Výskumu ovadov Slovenského krasu sa však recentne nevenuje žiadna pozornosť. Vzhľadom na bioindikačný potenciál ovadov by mohol výskum tejto skupiny v Slovenskom krase poskytnúť výsledky použiteľné pri ochrane biotopov cenných z hľadiska biodiverzity.

Príkladom takejto lokality je Ornitologický stacionár Drienovec, ktorý predstavuje významný migračný koridor vtákov [10]. Fauna ovadov tejto lokality však nebola doposiaľ študovaná.

Cieľom práce je priniesť prvé údaje o faune ovadov Ornitologického stacionára Drienovec a vyhodnotiť tieto výsledky v kontexte poznania fauny ovadov ako Slovenska tak aj Slovenského krasu.

Materiál a metódy

Ornitologický stacionár Drienovec (48.61631 N, 20.91520 E) je súčasťou katastrálneho územia obce Drienovec v Košickom okrese. Nachádza sa v nadmorskej výške 190 m n. m. v Košickej kotline a spadá pod ochranné pásmo Národného parku Slovenský kras. Na lokalite sú krovité zárasty (napr. *Cornus mas* Linnaeus, 1753), porasty makrofytov a stromová vegetácia (napr. *Salix alba* Linnaeus, 1753). Lokalitu tvoria podmáčané plochy, nachádzajú sa tu vyvieracky a v blízkosti stacionára je vodná nádrž [10]. Na skúmanej lokalite ako aj v jej blízkosti sa teda nachádza relatívne veľké množstvo potenciálnych larválnych mikrohabitatov ovadov. V bezprostrednej blízkosti skúmanej lokality sa nachádzajú plochy xerothermnej krasovej planiny, ktoré sa využívajú ako pastviny pre hovädzí dobytok. Okrem kráv sú príkladom ďalších potenciálnych hostiteľov ovadov na lokalite, resp. v jej blízkosti *Sus scrofa* Linnaeus, 1758, *Capreolus capreolus* Linnaeus, 1758 [10].

Nad vodnou hladinou toku vyvieracky boli ovady získané pomocou entomologickej sieťky, tzv. smýkaním. Ovady boli takýmto spôsobom odchyťované pol hodinu (od 13:00 do 13:30) dňa 17.6.2022. Zber bol realizovaný počas Slovenského vážkarského stretnutia 2022. Ovady boli dňa 18.8.2022 odchyťované hromadne pomocou Manitobskej pasce. Pod čiernou platovou guľou bol situovaný kvasinkový generátor CO₂. Hromadný odchyt prebiehal od 8:00 do 19:00. Po dobu exponovania Manitobskej pasce boli ovady získané aj z ornitologických sietí. Ovady získané počas vyššie uvedených dní boli preparované na sucho. Zachytené ovady, počas dní 20.8. a 21.8. 2022, v ornitologických sieťach, boli zbierané kolektívom realizátorov Ornitologického stacionára Drienovec. Takto získané ovady boli vložené do čistého 96% liehu.

Zber ovadov na lokalite bol teda nepravidelný a sporadický. Na základe výsledkov nie je možné vyhodnotiť kvantitatívne vlastnosti spoločenstva ovadovitých skúmanej lokality. Analyzované sú iba kvalitatívne charakteristiky cenózy ovadovitých. Na určovanie ovadov bola použitá publikácia [1].

Výsledky a diskusia

Počas sezóny roku 2022 bolo na území Ornitologického stacionára Drienovec

získaných celkom 51 jedincov ovadov, patriacich k 13 druhom: *Atylotus* sp. Osten-Sacken, 1876, *Haematopota italica* Meigen, 1804, *H. pluvialis* (Linnaeus, 1758), *Hybomitra solstitialis* (Meigen, 1820), *Chrysops caecutiens* (Linnaeus, 1758), *Philipomyia graeca* (Fabricius, 1794), *Tabanus bromius* Linnaeus, 1758, *T. glaucopis* Meigen, 1820, *T. maculicornis* Zetterstedt, 1842, *T. spodopterus* Meigen, 1820, *T. sudeticus* Zeller, 1842, *T. tergestinus* Egger, 1859, *Therioplectes gigas* (Herbst, 1787)

Lokalita Ornitologický stacionár Drienovec patrí v rámci oblasti Západné Karpaty do okrsku Slovenský kras (krasový) [3]. Počas sezóny roku 2022 nebol zaznamenaný žiadny prvonález pre túto oblasť. Táto skutočnosť poukazuje na relatívne dobrú preskúmanosť fauny ovadov Slovenského krasu ako okrsku, hoci recentné údaje absentujú úplne. Môžeme teda predpokladať, že v minulosti bolo získané relatívne veľké množstvo spoľahlivo porovnateľných dát.

Tab. 1. Ovady získané na lokalite Ornitologický stacionár Drienovec

Druh	Smýkanie 16.6.2022	Ornitologická sieť 18.8.2022	Ornitologická sieť 20. – 21. 8 2022	Manitobská pasca 18.8.2022
<i>Atylotus</i> sp.			1♀	
<i>Haematopota italica</i>	1♂			1♀
<i>Haematopota pluvialis</i>				2♀
<i>Hybomitra solstitialis</i>	1♀			
<i>Chrysops caecutiens</i>	1♀			
<i>Philipomyia graeca</i>	2♀			
<i>Tabanus bromius</i>	1♂	1♂	1♀	7♀
<i>Tabanus glaucopis</i>		1♀	3♀	10♀
<i>Tabanus maculicornis</i>	2♂			5♀
<i>Tabanus spodopterus</i>	1♀	1♂		1♀
<i>Tabanus sudeticus</i>	1♀		2♀	
<i>Tabanus tergestinus</i>				1♀
<i>Therioplectes gigas</i>	4♂			

Porovnanie získaných údajov počas sezóny 2022 s historickými záznamami naznačuje, že druh *Chrysops caecutiens* patrí v Slovenskom krase medzi prirodzene vzácne druhy. Prezencia druhu bola v rámci okrsku Slovenský kras zistená iba na lokalite Zádiel [3, 9].

V analyzovanom materiáli z roku 2022 bol druh zastúpený iba jednou samičkou (Tab. 1.). Tieto údaje sú zaujímavé, pretože v dvadsiatom storočí bol tento zástupca čeľade Tabanidae považovaný za najhojnejší druh rodu *Chrysops* na východnom Slovensku. Pričom sa *Chrysops caecutiens* recentne považuje za jedného z najrozšírenejších druhov v Európe [11]. Počas výskumu v roku 2022 nebola zistená na študovanej lokalite prezencia žiadneho druhu z rodu *Chrysops*. Vzhľadom na to, že Ornitologický stacionár Drienovec predstavuje významný migračný koridor pre vtáky, ide z parazitologického a ochranárskeho hľadiska o dôležitý údaj. Existujú totiž záznamy o útočení samičiek rodu *Chrysops* na vtáky [12]. Hostiteľsky najviac špecializované druhy ovadov na skúmanej lokalite sú tzv. boofilné druhy, napádajúce primárne hovädzí dobytok [1]. Táto skupina ovadov bola zastúpená celkom dvomi druhmi *Tabanus spodopterus* a *Tabanus sudeticus*. *T. spodopterus* bol zo všetkých zaznamenaných ovadov na študovanej lokalite zistený na najväčšom počte lokalít (8) v rámci Slovenského krasu [3]. *T. spodopterus* bol v roku 2022 zistený ako v júni, tak aj v auguste (Tab. 1.). Tieto záznamy resp. údaje potvrdzujú, že ide o teplomilný druh stepných oblastí [1].

Ďalší teplomilný druh zistený na lokalite je *Philipomyia graeca*. V miernom pásme je výskyt tohto zástupcu viazaný na vápencové biotopy [1]. Druh bol na lokalite zistený v júni a odchytené boli dve samice smýkaním nad vodnou hladinou (Tab. 1.). Vo svetle vyššie uvedených skutočností má zistenie výskytu druhu bioindikačný význam, pretože v bezprostrednej blízkosti skúmanej lokality sa nachádzajú plochy xerothermnej krasovej planiny [10]. Z bioindikačného hľadiska je taktiež významné aj zistenie prezencie druhu *Therioplectes gigas*. *T. gigas* je považovaný za xerothermný druh a svojím výskytom je viazaný na teplé a vápencové lokality [1]. Ak zoberieme do úvahy, že imága lietajú zvyčajne od mája do druhej polovice júna [1], odchytenie celkom štyroch samcov v priebehu polhodiny dňa 16.6.2022 (Tab. 1.) naznačuje, že na lokalite môže dlhodobo existovať prosperujúca populácia. V rámci Slovenského krasu však bola prezencia druhu v minulosti zistená iba na lokalite Zádiel [10]. Túto skutočnosť je možné najlepšie vysvetliť výzorom tohto zástupcu. Jedince *T. gigas* pripomínajú svojim vzhľadom čmeliaky [13], kvôli čomu mohol byť tento predstaviteľ skupiny Tabanidae prehliadnutý. Okrem vyššie uvedených troch teplomilných druhov na bioindikačný potenciál ovadov poukazuje aj skutočnosť, že s výnimkou druhu *Tabanus solstitialis* boli všetky druhy ovadov zistené aj na území pohoria Burda [14, 15]. Tento údaj je dôležitý, pretože sa v rámci pohoria Burda nachádzajú xerothermy, pričom v bezprostrednej blízkosti Ornitologického stacionára Drienovec sú plochy xerothermnej krasovej planiny [10, 16].

Z ornitologických sietí bolo získaných celkom 10 jedincov patriacich k piatim druhom *Atylotus* sp., *Tabanus bromius*, *T. glaucopis*, *T. spodopterus*, *T. sudeticus* (Tab. 1.). Najviac

exemplárov patrilo do druhu *Tabanus glaucopis* (Obr. 1.). Najväčšie ovady zachytené v sieťach boli určené do druhu *Tabanus sudeticus* a *T. spodopterus*. Do sietí sa však zachytili aj malé druhy, napríklad jeden exemplár rodu *Atylotus*. Počas odstránenia zo sieťky sa však determinačné znaky jedinca poškodili natoľko, že ho nebolo možné spoľahlivo určiť do druhu. Ostatné jedince však neboli poškodené vôbec. Údaje teda naznačujú, že ornitologické siete by mohli mať potenciálne využitie pri výskume ovadov. Ovady boli získané iba z tých sietí, ktoré boli natiahnuté nad vodnou hladinou. Zástupcovia skupiny Tabanidae sa do sietí zrejme zachytili kvôli tomu, že potrebujú značné množstvo vody, ovady totiž aktívne vyhľadávajú vodné plochy [1]. Zo sietí bolo získaných 8 samíc a 2 samce. Hoci sú potrebné ďalšie výskumy tieto údaje naznačujú, že do ornitologických sietí sa môže zachytiť viac samíc, pretože na rozdiel od samcov vyhľadávajú vodné zdroje nielen za účelom pitia či termoregulácie, ale aj kvôli nakladaniu vajíčok. Hoci sú nutné ďalšie pozorovania, výsledky potvrdzujú, že ornitologické siete predstavujú nový druh ekologickej pasce pre ovady.



Obr. 1. Ovad zachytený v ornitologickej sieti – Samička druhu *Tabanus glaucopis* je zachytená v ornitologickej sieti nad vodnou hladinou na lokalite Ornitologický stacionár Drienovec (18.8.2022). Fotografia je dôkazom toho, že ornitologické siete sú pre ovady ekologickou pascou.

Záver

Na lokalite Ornitologický stacionár Drienovec bola zistená prezencia celkom 13 druhov. *Atylotus sp.*, *Haematopota italica*, *H. pluvialis*, *Hybomitra solstitialis*, *Chrysops caecutiens*, *Philipomyia graeca*, *Tabanus bromius*, *T. glaucopis*, *T. maculicornis*, *T. spodopterus*, *T. sudeticus*, *T. tergestinus*, *Therioplectes gigas*. Získané výsledky potvrdili bioindikačný potenciál ovadov. Pre spoľahlivé poznanie fauny ovadovitých Ornitologického stacionára Drienovec je však nutné realizovať ďalšie výskumy zamerané na túto skupinu

hmyzu. Na základe pozorovaní je možné považovať ornitologické siete za nový druh ekologickej pasce pre ovady. Tento druh ekologickej pasce by mohol mať praktické využitie pri hromadnom zbere ovadov.

PodĎakovanie

Práca bola zrealizovaná s podporou projektu VEGA 2/0022/23. PodĎakovanie patrí kolektívu realizátorov Ornitologického stacionára Drienovec. Som veľmi vďačný Monike Gálffyovej, Martinovi Matejkovi a Martinovi Dolinskému za pomoc pri odstraňovaní ovadov z ornitologických sietí ako aj za spríjemnenie môjho pobytu v teréne. Taktiež ďakujem Ľubošovi Korytárovi za cenné postrehy. V neposlednom rade som vďačný aj Kornélii Tuhrinovej, ktorá so mnou zdieľa nadšenie z výskumu ovadov.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Chvála M., Hůrka K., Chalupský J., et al. (1980) Krevsajícímouchy a střechci – Diptera. Academia, Praha, p. 282
- [2] Baldacchino F., Desquesnes M., Mihok S., et al. (2014) Infection, Genetics and Evolution 28, p. 596
- [3] Gunárová V. (1984) Čelad' Tabanidae. In Čepelák J. (ed.): Diptera Slovenska I. (Nematocera, Brachycera – Orthorrhapha). Veda, Bratislava p. 153
- [4] Ježek J. (1992) Čas. Nár. muz. Řada přírodověd. 160, p. 112
- [5] Ježek J. (1995) Čas. Nár. muz. Řada přírodověd. 164, p. 124
- [6] Čepelák J., Gunárová V., Husárová A. (1971) Entomol. probl. 9, p. 38
- [7] Gunárová V. (1970) Ac. Rer. Natur. Mus. Nat. Slov. 16(2), p. 45
- [8] Gunárová V., Slamečková M. (1970) Ac. Rer. Natur. Mus. Nat. Slov. 16(1), p. 63
- [9] Gunárová V. (1967) Ac. Rer. Natur. Mus. Nat. Slov. 13(1), p. 73
- [10] Vatycha T. (2012) Porovnanie biometrických znakov druhu červienka obyčajná (*Erithacus rubecula* L.) počas jarnej a jesennej migrácie na Ornitologickom stacionári Drienovec. (Diplomová práca) Technická univerzita vo Zvolene
- [11] Dörge D. D., Sarah C., Sven K. (2020) Parasit. Vectors 13(1), p. 1
- [12] Bennett G. F. (1960) Can. J. Zool. 38(2), p. 377
- [13] Krčmar S., Hackenberger D. K., Hackenberger B. K. (2011) Period. Biol. 113, p. 1
- [14] Gunárová V. (1972) Sbor. Jihoč. muz. v Č. Bud. 12, p. 45
- [15] Straka V., Majzlan O. (2016) Ochrana prírody 27, p. 89
- [16] Tyrner P., Majzlan O. (2016) Ochrana prírody 27, p. 39

Vplyv aeróbného silového tréningu na denné rytmy aktivity u obéznych adolescentov (predbežné výsledky)

Michaela Balogová¹, Michal Zeman¹, Barbara Ukropcová², Jozef Ukropec², Juraj Staník³, Daniela Staníková³, Lucia Slobodová², Martin Schon², Valentína Sophia Rumanová¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; balogova64@uniba.sk

²Ústav experimentálnej endokrinológie Slovenskej akadémie vied, v.v.i., Biomedicínske centrum, Dúbravská cesta 9, 814 39 Bratislava, Slovenská republika

³Národný ústav detských chorôb, Limbová 1, 831 01 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Effects of aerobic endurance training on daily rhythms of activity in obese adolescents (interim data analysis)

Circadian rhythms optimize physiology and health by temporally coordinating cellular functions, tissue functions, and even behaviour. Chaotic eating habits can disrupt the time coordination of metabolism and physiology, which ultimately leads to the development of civilization diseases, such as obesity. Our aim was to determine whether exercise can improve circadian rhythms in obese adolescents (n=8). The activity of probands was monitored using an actigraphic device GENEActiv (Activinsights), before and after 12 weeks of aerobic endurance training. Rhythmic parameters (mesor, amplitude, acrophase) of daily rhythms were not affected by the intervention. In conclusion, aerobic-strength training was not able to improve and synchronize a temporal organization of activity in obese adolescents, probably the result of low treatment compliance.

Keywords: daily rhythms; adolescent; obesity; aerobic-strength training; exercise

Úvod a formulácia cieľa

Obezita je chronické progresívne ochorenie zapríčinené energetickou nerovnováhou medzi príjmom a výdajom energie, ktoré je charakterizované akumuláciou tuku. Obezita predstavuje závažné riziko pre rozvoj chronických pridružených civilizačných ochorení. Je zodpovedná za 60 % zvýšenie rizika rozvoja diabetu 2. typu, 20 % zvýšenie rizika rozvoja artériovej hypertenzie a ischemickej choroby srdca a za 10 až 30 % nárast rakovinových ochorení [1]. Tie významne ovplyvňujú ako morbiditu, tak aj kvalitu a dĺžku života obézneho jedinca. Ďalšie fyziologické komplikácie spojené s obezitou sú únava, dýchavičnosť, bolesti chrbtice, kŕčové žily, opuchy, spánkové apnoe, aterogénna dyslipidémia, steatóza pečene, hyperkoagulácia a pod. Navyše sa k nim pridávajú aj psychosociálne problémy, ako depresia, seba podceňovanie, izolácia, diskriminácia a ďalšie. Súčasným znepokojujúcim problémom je vzostup výskytu nadváhy a obezity u detí, ktorých zdravotné a psychické dôsledky sú ešte dramatickejšie ako u dospelých [1, 2].

Incidencia nadváhy a obezity neustále stúpa, a preto WHO označilo obezitu za hlavný problém verejného zdravia a formálne uznalo obezitu za globálnu epidémiu [6]. V roku 2016

malo v dospeljej populácii nadváhu 39% mužov a 40% žien a obezitu 11% mužov a 15% dospelých žien. [1]

Cirkadiánne rytmy ako už naznačuje názov (z latinského *circa* - približne, *dies* - deň) sú približne 24 hodinové oscilácie, ktoré sú prítomné prakticky na všetkých úrovniach organizácie biologických procesov, od molekulárnych, cez biochemické a fyziologické, až po behaviorálne [4]. Cirkadiánne rytmy optimalizujú fyziológiu tým, že časovo koordinujú jednotlivé procesy navzájom a aj s podmienkami prostredia, predovšetkým s cyklom svetla a tmy. S tým súvisí aj príjem potravy, ako aj jeho načasovanie, čo môže ovplyvňovať robustnosť denných biologických rytmov. Chaotické stravovacie návyky môžu narušiť časovú koordináciu metabolizmu a fyziológie, ktoré v celkovom dôsledku vedú k vývoju chronických chorôb, ktoré sú tiež charakteristikou starnutia. Naproti tomu pravidelné cykly príjmu potravy a hladovania alebo pôstu majú opačný efekt. Preto správnym načasovaním externých podnetov a definovanými stravovacími návykmi môžeme stabilizovať cirkadiánne hodiny, ktoré recipročne môžu zabrániť rozvoju chorôb a potenciálne zlepšiť ich prognózu [4]. Jedným takýmto experimentálnym zásahom je pravidelné cvičenie, ktoré pomáha zlepšovať energetickú rovnováhu zvyšovaním výdaja energie, ale aj synchronizovať cirkadiánny systém.

Cieľom predkladanej práce bolo sledovať parametre cirkadiánnych rytmov pohybovej aktivity mladých obéznych pacientov, ktorí boli zaradení do intervenčnej štúdie s kombinovaným cvičením pod vedením odborného cvičiteľa s frekvenciou trikrát týždenne po dobu 12 týždňov.

Materiál a metódy

Do experimentu vstúpilo 12 obéznych adolescentných probandov, z ktorých iba 8 probandov splnilo všetky inkluzívne a exkluzívne kritéria, zúčastnilo sa na primeranom počte cvičení a boli zahrnutí do výsledkov prezentovanej štúdie (vek: $16,3 \pm 0,5$; BMI >30 ; 5 mužov a 3 ženy). Participanti neužívali žiadne lieky a výživové doplnky a nemali diagnostikované žiadne iné pridružené ochorenia. Pokus prebiehal v období máj-júl 2018 alebo august-október 2018 v Biomedicínskom Centre Slovenskej akadémie vied (Bratislava, Slovenská republika). Participanti a ich zákonní zástupcovia boli informovaní o podmienkach a priebehu experimentu a všetci poskytli podpísaný informovaný súhlas.

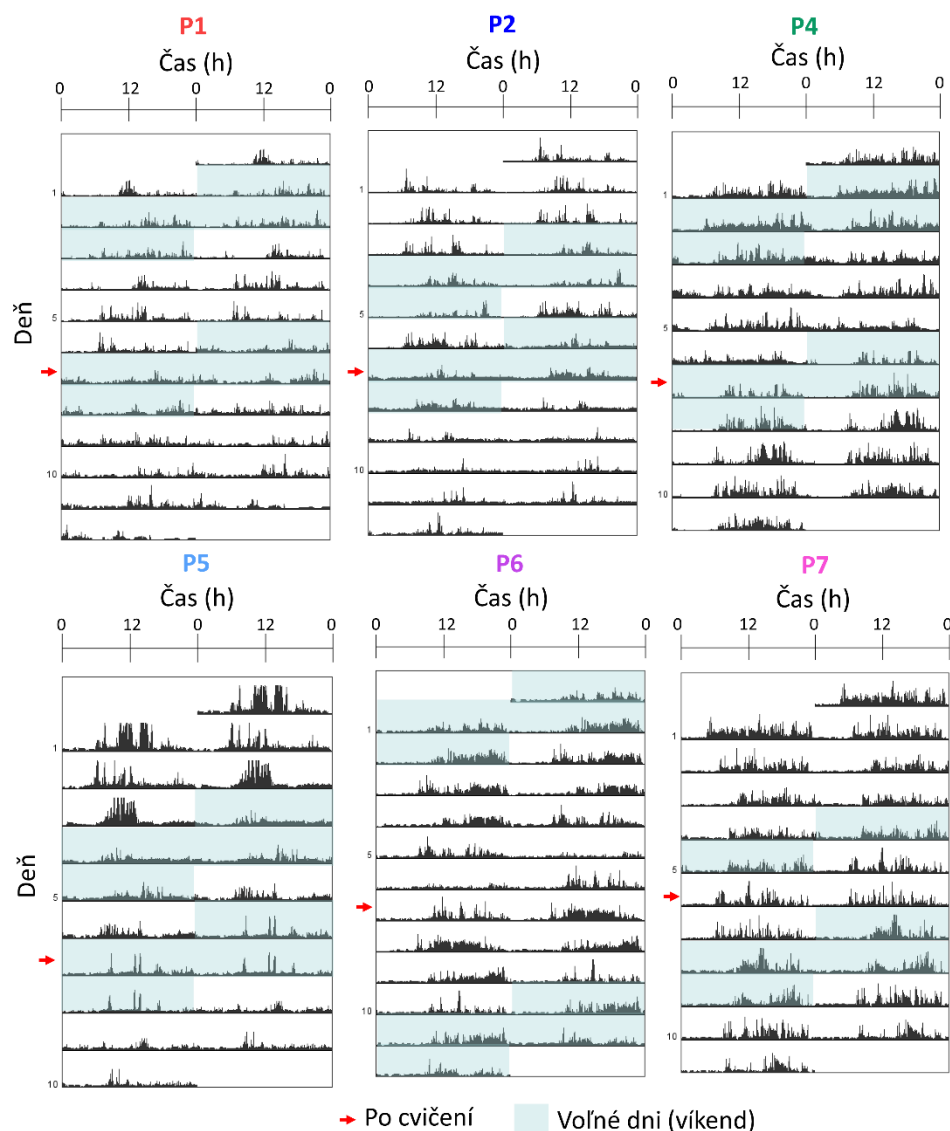
Týždeň pred začiatkom experimentu boli zaznamenané údaje o výške, váhe, obvode pásu a bokov. Počas týždňa boli merané bazálne údaje fyzickej aktivity akcelerometrom GENEActiv (Activinsights, Veľká Británia). Aktigrafické zariadenie bolo umiestnené na nedominantné zápästie a dáta boli zberané v 1-minutových intervaloch po dobu jedného

týždňa. Následne probandi absolvovali aeróbne-silový tréning pod vedením trénera počas 12 týždňov, 3x týždenne v skupinách po piatich. Ich každodenná rutina nebola počas experimentu nijako obmedzovaná a účastníci boli inštruovaní nemeniť svoje zvyklosti. Výživová intervencia nebola aplikovaná. Po ukončení 12-týždňovej tréningovej intervencie prebiehali merania aktivity a parametrov obezity na porovnanie s hodnotami získanými počas bazálneho týždňa.

Dáta sme analyzovali pomocou softvéru GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, USA). Kosínorová krivka bola nafitovaná do dát pomocou metódy najmenších štvorcov. Mezor (priemerná hodnota za 24 hodín), amplitúda (polovica rozdielu medzi maximálnou a minimálnou hodnotou v rámci jedného cyklu) a akrofáza (čas, kedy nafitovaná krivka dosahuje vrchol) signifikantných rytmov boli získané kosínorovou analýzou [5]. Zvlášť sme analyzovali údaje z pracovných dní a voľných dní (víkendy). Normálne rozdelenie dát sme overovali Shapiro-Wilkovým testom. Signifikantné rozdiely v dátach pred a po intervencii sme hodnotili párovým Studentovým *t*-testom alebo Wilcoxonovým *t*-testom pri hladine významnosti 5%.

Výsledky a diskusia

Cvičenie je veľmi dôležité pre správne časovanie metabolických rytmov a taktiež môže fázovo posunúť alebo posilniť denné rytmy fyzickej aktivity, čo môže byť prospešné pre obéznych jedincov [7]. Denné rytmy sledovaných obéznych adolescentných probandov sa vyznačovali dlhou fázou aktivity, ktorá častokrát presahovala do obdobia po lokálnej polnoci. Toto zistenie je v súlade s neskorším chronotypom adolescentov všeobecne [8] a táto charakteristika nebola významne zmenená po tréningovej intervencii (Obr. 1). Okrem toho sme pozorovali výrazné interindividuálne rozdiely v miere aktivity, ktoré sa nezlepšili vplyvom cvičenia.

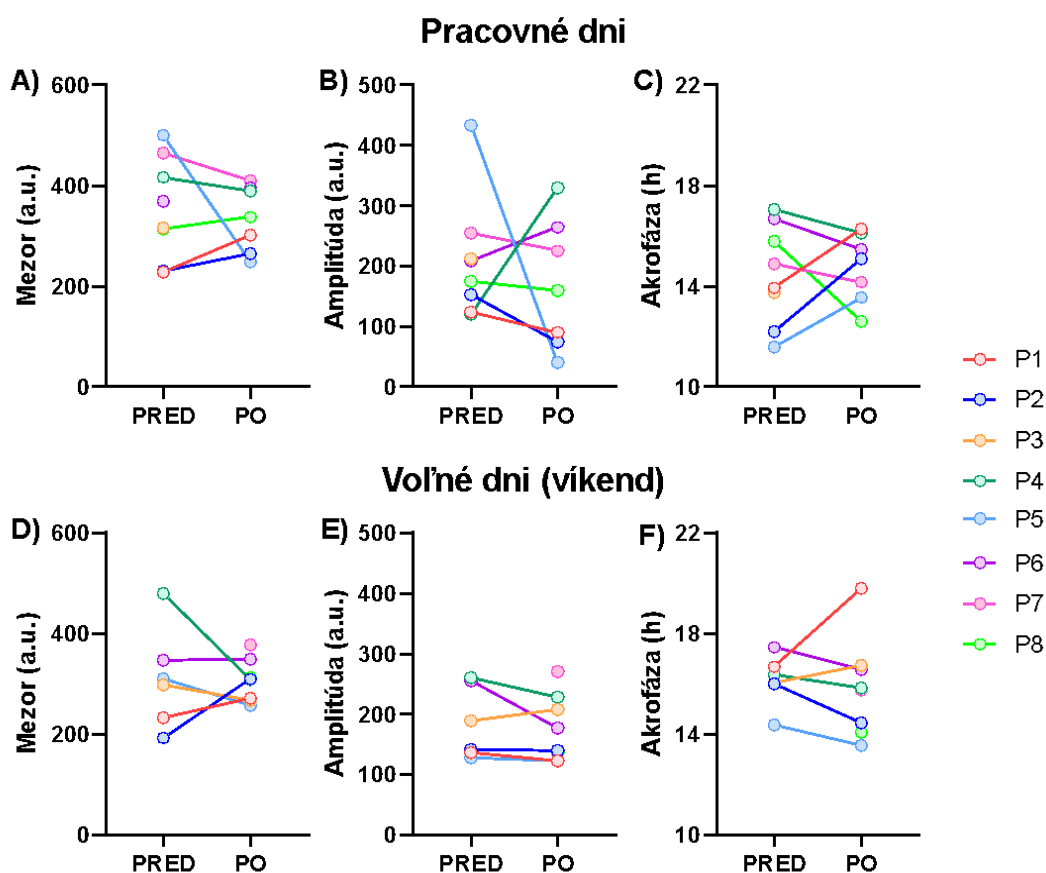


Obr. 1. Reprezentatívne aktogramy šiestich probandov (P). Prvý týždeň sa jedincom merali bazálna dáta minimálne päť dní. Probandom bola opätovne premeraná aktivita po troch mesiacoch aeróbne-silového tréningu (červená šípka). Voľné dni (víkend) sú vyznačené bledomodrou farbou. Čas je uvedených v astronomických hodinách so začiatkom o polnoci (0).

Ďalej sme analyzovali charakteristiky denných rytmov na zhodnotenie vplyvu cvičenia počas pracovných (Obr. 2A-C) a voľných dní na cirkadiánnu organizáciu probandov (Obr. 2D-F). Kosínorová analýza odhalila signifikantný rytmus fyzickej aktivity u všetkých probandov počas pracovných aj voľných dní ($p < 0,05$). Mezor (priemerná hodnota za 24 hodín) sa nelíšila po intervencii počas pracovných dní (Obr. 2A; $t_{(6)}=0,04$; $p = 0,97$), ani voľných dní (Obr. 2D; $t_{(5)}=0,43$; $p = 0,69$). Cvičenie nemalo signifikantný vplyv ani na amplitúdu (polovica rozdielu medzi maximálnou a minimálnou hodnotou v rámci jedného cyklu) fyzickej aktivity (pracovný deň: Obr. 2B; $t_{(6)}=0,23$; $p = 0,83$; voľný deň: Obr. 2E; $t_{(5)}=0,54$; $p = 0,61$). Akrofáza, ktorá odráža fázový posun rytmu, taktiež nebola zmenená počas pracovných (Obr. 2C; $t_{(6)}=0,15$; $p =$

0,88) ani voľných dní (Obr. 2F; $t_{(5)}=0,01$; $p = 0,99$).

V uvedených hodnotách sme nezistili signifikantné rozdiely pred a po absolvovaní pravidelného cvičenia a intervencia nemala vplyv na rytmické parametre fyzickej aktivity počas pracovných alebo voľných dní. Nesignifikantné zmeny parametrov časovej organizácie boli zároveň v súlade s nezmenenými biometrickými údajmi - hmotnosť tela ($t_{(7)} = 0,43$; $p = 0,20$), index telesnej hmotnosti ($W_{(8)} = 20,00$; $p = 0,20$), obvod pásu ($t_{(6)} = 0,88$; $p = 0,41$), obvod bokov ($t_{(7)}=0,28$; $p = 0,79$), pomer obvodu pásu a obvodu bokov ($t_{(6)}=4,41$; $p = >0,99$), pomer obvodu pásu a výšky ($t_{(6)}=0,82$; $p = 0,44$). Nesignifikantný vplyv cvičenia mohol súvisieť s nízkou adherenciou k pravidelnej účasti na cvičení, ktorá mala tendenciu korelovať so zmenami v obvode pásu ($r = 0,74$; $p = 0,10$). Limitáciu tejto štúdie je absencia kontrolnej skupiny bez intervencie, nakoľko ide len o pilotný pokus. Keďže intervencia nespôsobila významný pokles hmotnosti a nezlepšila významne charakteristiky biologických rytmov, v ďalších štúdiách bude potrebný komplexný manažment obezity, ktorý okrem cvičenia bude zahŕňať výživovú intervenciu a kognitívnu behaviorálnu terapiu.



Obr. 2. Porovnanie rytmických parametrov probandov (P) pred a po cvičení počas pracovných dní (A-C) a voľných dní (D-F). Mezor (A,D), Amplitúda (B,E), Akrofáza (C,E). Dáta sú uvedené ako priemer $\pm$ SEM. V skupine bolo 6-8 jedincov.

Záver

Aeróbne-silový tréning u obéznych adolescentov nemal signifikantný vplyv na časovú organizáciu denných rytmov aktivity. Zaznamenali sme veľmi výraznú inter-individuálnu variabilitu v celkovej aktivite, ako aj jej odpovedi na cvičenie, tak počas pracovných, ako aj voľných dní. Táto výrazná variabilita menšieho počtu zúčastnených probandov, spolu s relatívne nízkou adherenciou k pravidelnému cvičeniu, pravdepodobne prispela k nesignifikantným dôsledkom cvičenia na chronobiologické charakteristiky rytmu pohybovej aktivity, ako aj ukazovateľom obezity.

PodĎakovanie

Práca bola podporená grantom APVV-21-0223.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Grassi D., Ferri L., Desideri G., et al. (2013) Curr. Pharm. Des. 19(13), p. 2432
- [2] Seravalle G., Grassi G. (2017) Pharmacol. Res. 122, p.1
- [3] Caballero B. (2019) Adv. Nutr. 10, p. S4
- [4] Manoogian E. N. C., Panda S. (2018) Ageing Res. Rev. 39, p.59
- [5] Molcan, L. (2019). BioRxiv, 805960
- [6] WHO Consultation on Obesity & World Health Organization. (2000) Obesity: preventing and managing the global epidemic. World Health Organization, Ženeva, Švajčiarsko, p. 16
- [7] Kim H., Radak Z., Takahashi M., et al. (2022) S.M.H.S. 5(1), p. 50
- [8] Crowley S.J., Acebo C., Carskadon M.A. (2007) Sleep Med. 8(6), p. 602

Brain injury in influenza A virus infected Balb/c mice is associated with dysregulated immune response

Filip Baran¹, Karin Donátová^{1,2}, Miriam Mladá², Viktória Zezulová², Tatiana Betáková^{1,2}

¹*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Microbiology and Virology; Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak republic; baran39@uniba.sk*

²*Biomedical Research Center of Slovak Academy of Sciences, v. v. i., Institute of Virology, Department of Viral Immunology, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovak republic*

Abstract

Influenza viruses yearly affect 10% of human population causing acute respiratory infection. Even though influenza viruses affect mainly upper and lower respiratory tract, the viral particles can spread through the body and can affect different organs, such as brain, and can cause severe neuroinflammation. The non-structural NS1 protein of influenza A virus plays a role in antagonizing host antiviral response. In this study we used NS1 truncated virus NS80, lacking the effector and C-terminal tail domain, and human influenza A virus [A/WSN/33 (H1N1)]. The goal of our study was to determine how adaptation of viruses can affect its pathogenicity, if the influenza A viruses spread to brains of infected mice, and if the NS1 protein affects antiviral response in case of brain infection.

Keywords: *influenza A virus; NS1 protein; adaptation; antiviral response*

Introduction and Objectives

Influenza viruses belong to the family *Orthomyxoviridae*. To study influenza virus pathogenesis and immunology several animal models, including mice were established [1].

During the influenza infection the replication of viruses is almost exclusively restricted to respiratory tract. However, as the host immune system is trying to fight off the infection, it produces inflammatory cytokines and chemokines that are not tissue restricted. These circulating inflammatory regulators and activated immune cells can then induce damage throughout the body, such as neurological complications. We also recognize several neurotropic and non-neurotropic strains of influenza A viruses [2]. Neurotropic strains can enter the CNS through blood-brain barrier causing neuroinflammation, producing proinflammatory cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor α (TNF- α) etc. [3].

The multifunctional non-structural NS1 protein encoded by the eight segment of influenza A virus consists of a N-terminal domain, a linker, an effector domain, and C-terminal tail. The C-terminal tail domain and effector domain have a key role in antagonizing host antiviral responses and contributes to effective viral replication. To better understand the role of these domains during influenza A infection, NS1-truncated virus (NS80) was made, lacking

both domains [4].

The main goal of our study was to determine how adaptation of influenza A viruses to mice model could affect their pathogenesis, and in the case of NS80 virus how the missing domain affect the host antiviral response.

Materials and methods

Viruses and cells: WSN and NS1-truncated virus NS80, derived from human influenza A strains A/WSN/33 (H1N1). Both were also adapted to mice by serial lung passaging. Adherent epithelial Vero cells (ATCC® CCL-81™) were cultured in DMEM medium supplemented with 10 % FBS and maintained in 5 % CO₂ at 37 °C. NS1-truncated virus was prepared by transfection system described by Hoffmann et al., 2000 [5].

Experimental animals: As a susceptible *in vivo* model we used inbred line of BALB/c mice (Dobrá Voda, 360). Viral titers were determined in organ homogenates using ELISA method on Vero cells.

Adaptation of viruses: Anaesthetized mice were intranasally inoculated with 40 µl of WSN and NS80 virus. Infected animals were two days p.i. killed and lung were removed and homogenized in PBS with antibiotics. Homogenates were centrifugated and obtained supernatant was used to intranasally infect next mice. The procedure was performed till fifth passage.

Western blot and immunoprecipitation: Western blotting and immunoprecipitation were used for detection of IL-1β. As samples we used homogenized brain tissue obtained from infected mice. The protocol we used was previously described by Hanckova et al., 2023 [6].

Isolation of vRNA and RT-PCR: The RNA from brains was extracted using SV Total RNA Isolation System (Promega, Wisconsin, USA). RNA was reverse transcribed using random hexa-nucleotide primers and MuLV reverse transcriptase. Viral transcripts were detected by semi-quantitative PCR as described previously by Turianova et al., 2020 [4].

Histology: Brains from infected mice were obtained at day 3 p.i., embedded in paraffin and then sectioned. Sectioned samples were stained with hematoxylin and eosin.

Results and discussion

Adaptation and growth curve: NS80 virus (lack effector and C domain) is attenuated. To determine if the adaptation cause any differences in replicative properties of these viruses, we infected VERO cells with non-adapted WSN and NS80 and adapted WSNad and NS80ad viruses. The quantification of replicated viruses was measured by ELISA. As we can see from

the growth curve (Fig. 1) NS80 replicates in the Vero cell to lower titer than WSN virus. However, NS80ad replicated to the similar titer as wild type WSN virus after its adaptation. Adaptation did not influence replicative properties of WSNad virus.

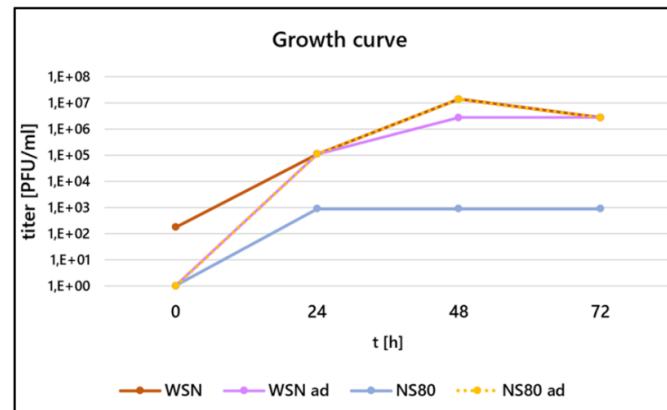


Fig. 1. Growth curve representing viral replication on VERO cells over 72h period.

Spread of the virus to the brain: The brains of infected mice were collected on the day 3 p.i. Homogenates were prepared, and the presence of viral RNA was detected by RT-PCR. The viral RNA was detected in three cases – WSN, NS80 and NS80ad by RT-PCR (Fig.2).

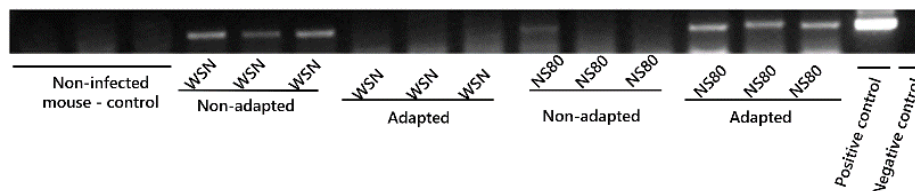


Fig. 2. Confirmation of effective spread of the influenza A viruses to mice brain. The viral RNA was detected using M2 constructed primers.

Activation of RIG-1 like receptor pathway: mRNA levels of selected genes in infected mice brains were determined by semi-quantitative PCR assay. NS80 and NS80ad viruses activated RIG-I signaling pathway more efficiently than the WSN and WSNad, which is showed by higher mRNA expression. Higher expression of RIG-I and overexpressed MDA5 pathways leads to higher expression of NF- κ B and IRF3 in brains of infected mice with NS80 and NS80ad than WSN viruses. Noticeable is also the significant difference between antiviral response in case of NS80 and NS80ad in case of MDA5, NF- β and IRF3 mRNA expression (Fig. 3).

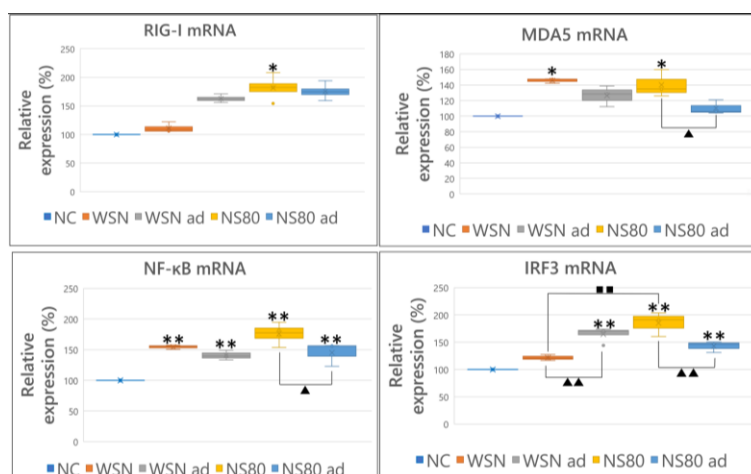


Fig. 3. Activation of RIG-1 like receptor signaling pathway. Statistically significant differences between mRNA expression in negative control (NC) and in infected mice are indicated as follows: *P<0.05; **P<0.001.

Transcribed protein IRF3: IRF3 play an important role as one of the first antiviral host response transcriptional factor. It regulates transcription of type I IFN genes and IFN-stimulated genes (ISG). In cells it's found as two different forms: inactive form and activated phosphorylated form upon infection. The graph shows percentual levels of translated IRF3 and IRF3-P proteins in the brains of infected mice. The level of IRF3-P increased in the brains infected with WSN, WSNad and NS80ad (Fig.4). Although the NS80 virus was detected in the brain of one infected mouse, the IRF3 pathway was not activated, and the level of IRF3-P was decreased.

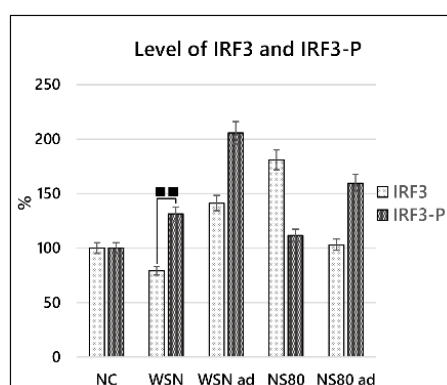


Fig. 4. Protein level of IRF3 and IRF3-P. The graph compares the levels of inactivated (asterisk) and activated (black circles) IRF3-P protein.

Levels of IFN- α were strongly overexpressed in infected brains in case of all four types of viruses (adapted and non-adapted). The expression of IFN- β was in case of WSN almost at the same level as the negative control. Significant difference compared to WSN is expression of IFN- β in case of WSNad and NS80 (Fig. 5).

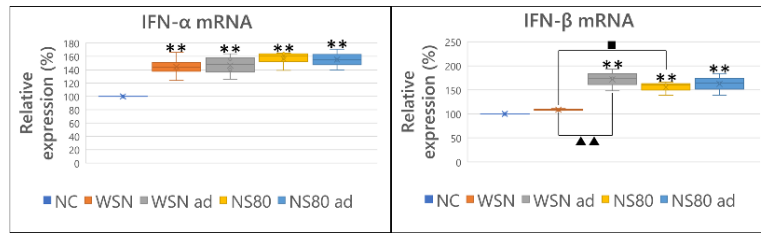


Fig. 5. Relative expression of interferons as the first antiviral response in brain cells. Statistically significant differences between NC and viruses are indicated as follows: *P<0.05; **P<0.001.

Like expression of IFN- α , the expression of inflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1 β) was almost the same in case of all four types of viruses, showing the stereotype nature of innate immunity mechanisms. The overexpression of IL-2 is more noticeable upon the infection with WSN and WSNad viruses. Among adapted viruses, strongest immune response occurred in case of WSNad (Fig. 6).

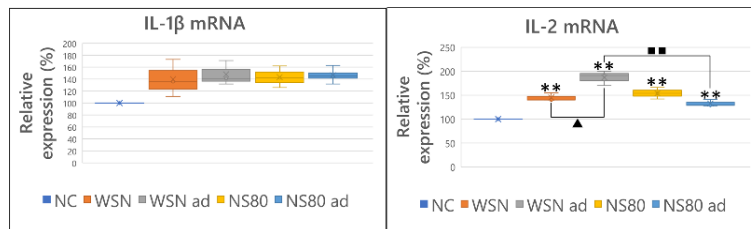


Fig. 6. Relative expression of interleukins IL-1 β and IL-2. Statistically significant differences between NC and viruses are indicated as follows: *P<0.05; **P<0.001.

Expresion of IL-1 β in the infected brains: The IL-1 β was detected in the brains infected with all viruses (Fig. 7). The amount of immunoprecipitated proteins was very low but higher level of IL-1 β was detected in the brains infected with WSN and NS80ad viruses.

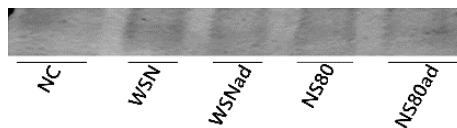


Fig. 7. Bands after detection of IL-1 β in the brain samples of infected mice.

Histology: The sign of virus infection was also visible in the infected brain tissue slices. (Fig. 8). In case of infected tissue, there are signs of apoptosis (black arrows). In case of NS80 and NS80ad there are also signs of perivascular cuffing due to inflammation (asterisk). In case of infected mice, the brain tissue seems looser, and the cell junctions were interrupted.

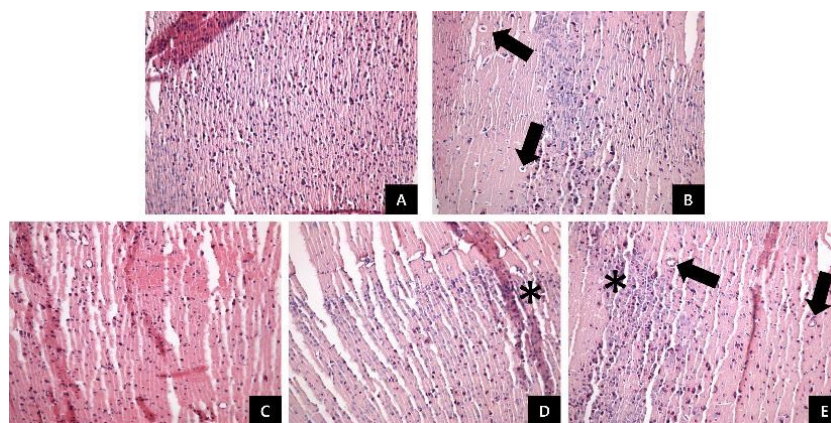


Fig. 8. Brain tissue samples stained with hematoxylin and eosine. A – normal brain tissue of non-infected mouse with neural and glial cells; **B** – infection with WSN; **C** – infection with WSNad; **D** – infection with NS80; **E** – infection with NS80ad.

Conclusion

Our study leads us to several conclusions. Even though the NS80 virus replication was compromised because of the lacking domains from NS1 protein, and NS80 is attenuated in the mice, the adaptation resulted in increased replication in Vero cells and loss of attenuation in Balb/c mice.

We confirmed the ability of influenza A viruses to spread into the brains by RT-PCR. All viruses activated the RIG-1-like signaling pathway, IFN response, and production of inflammatory proteins.

The viral effect on the brain was also determined by brain pathophysiology.

Acknowledgement

This research was funded by European Regional Development Fund and by the Slovak Research and Development Agency (grand No. VEGA 2/0031/20).

References

- [1] International Committee on Taxonomy of Viruses [Cited: March 22, 2023] <https://ictv.global/report_9th/RNAneg/Orthomyxoviridae>
- [2] Heather M. F., Nicholas S. H., (2022) The Febs. J. 289, p. 4038
- [3] Haeman J., David B., Jennifer Mc C., et al. (2012) J. of Neuros. 32 (5), p. 1545
- [4] Turianova L., et al. (2020) Acta. Virol. 64(01), p.cip78
- [5] Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y., et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, p. 6108
- [6] Hancková M., et al. (2023) Cytok. 164, p. 1

Vplyv tlmeného svetla v noci na zápalovú odpoveď a expresiu hodinových génov v pečeni a tukovom tkanive

Beáta Benediková, Viera Jerigová, Michal Zeman, Monika Okuliarová

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
benedikova10@uniba.sk*

Abstract

The effect of dim light at night on the inflammatory response and clock gene expression in the liver and adipose tissue

Dim light at night (ALAN) is considered a circadian disruptor affecting several physiological processes. In our study, we aimed to analyse the effect of ALAN on the expression of clock genes and inflammatory genes in the liver and adipose tissue after the immune stimulation at different times of the day. Wistar rats were exposed to ALAN regime for 2 weeks, then stimulated with lipopolysaccharide (LPS) in the active or passive phase. Three hours upon stimulation, the rats were decapitated. With qPCR we analysed the expression of clock genes *Rev-erba* and *Bmal1* and the genes involved in the immune response (*Il-1*, *Nfil3*, *Nfkb1*, *Nlrp3* and *RelA*). Exposure to ALAN suppressed the daily variation in immune response of *RelA* in adipose tissue, but not in the liver. The immune stimulation in the active phase enhanced the *Bmal1* and reduced the *Rev-erba* expression in both tissues. ALAN attenuated the daily variation in immune response of *Bmal1* in the liver. Our results indicate that the ALAN disturbed time-of-day-dependent immune response of metabolically active organs in a tissue-specific manner.

Keywords: *circadian; innate immunity; ALAN; metabolism; liver; adipose tissue; clock genes*

Úvod a formulácia cieľa

Cirkadiánnny systém je dôležitý pre synchronizáciu fyziologických procesov s podmienkami prostredia [1]. Molekulárny mechanizmus cirkadiánnneho systému spočíva v transkripčno-translačnej slučke hodinových génov, kde proteíny PER a CRY inhibujú svoju expresiu väzbou na BMAL1:CLOCK komplex [2]. Tento komplex stimuluje expresiu génov *Per* a *Cry* a tiež génov *Rev-erba* a *Ror*, ktoré tvoria aditívnu transkripčno-translačnú slučku. Hodinové transkripčné faktory zároveň regulujú mnohé iné gény zapojené v imunitnej odpovedi či metabolizme.

Medzi cirkadiánnym systémom a imunitnou reakciou existuje recipročný regulačný vzťah. Prítomnosť CLOCK v bunke zvýšila NFκB-mediovanú transkripciu cieľových génov [3]. REV-ERBα potlačil expresiu transkripčných faktorov *Nlrp3* a *RelA* podjednotky NFκB vo viacerých in vitro modeloch [4]. Mutácia v *Clock* géne redukovala produkciu cytokínov po stimulácii lipopolysacharidom (LPS) [5]. Zároveň, RelB podjednotka NFκB faktora potlačila BMAL1:CLOCK-mediovanú transaktiváciu *Per1* promótora. Podobné výsledky boli pozorované aj po stimulácii myši cytokínom TNFα, čo spôsobilo potlačenie expresie *Rev-erba*, *Per3* a *Dbp* v pečeni [6].

Svetlo je najdôležitejším externým synchronizátorom cirkadiálneho systému, preto narušenie svetelného režimu môže ovplyvniť rytmus hodinových génov a cirkadiálne riadených procesov. Tlmené svetlo počas noci (ALAN) je považované za cirkadiánnny disruptor a naše práce ukázali, že môže narušiť rytmickú expresiu hodinových génov a vazopresínu v centrálnom oscilátore v hypotalame a tiež denné rytmy expresie hodinových génov v pečeni, tukovom tkanive a slezine [7]. Cieľom našej štúdie bolo analyzovať vplyv ALAN na zápalovú odpoveď hodinových génov a génov zapojených do imunitnej odpovede v pečeni a tukovom tkanive v závislosti od fázy dňa.

Materiál a metódy

Na experiment sme použili 58 samcov potkanov kmeňa Wistar (vek 17 týždňov, 325 g) z chovnej stanice Ústavu experimentálnej farmakológie a toxikológie, CEM, SAV, Dobrá Voda. Potkany boli umiestnené v akreditovanom zverinci Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského (Prif UK). V karanténe boli jeden týždeň na kontrolnom režime 12 h svetlo (L; 150 lux) a 12 h tma (D; 0 lux) so začiatkom svetlej fázy o 10:00 (Zeitgeber time 0; ZT0) a s prístupom k potrave a vode *ad libitum*. Experiment bol schválený etickou komisiou Prif UK a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR.

Potkany boli rozdelené podľa svetelného režimu do dvoch skupín: 1) kontrolná skupina (CTRL) s režimom LD 12:12 h a 2) ALAN skupina s tlmeným osvetlením (~2 lux) počas noci. Po dvoch týždňoch bola polovica jedincov v každej skupine stimulovaná intraperitoneálnym podaním lipopolysacharidu (LPS) (*E. coli*, sérotyp 01111:B4; Sigma-Aldrich) v dávke 1 mg/kg hmotnosti tela. Nestimulovaným zvieratám bol aplikovaný sterilný fyziologický roztok (FR). Stimulácia prebiehala 2 hodiny po začatí svetlej fázy (ZT2) alebo 2 hodiny po začatí tmavej fázy (ZT14). Po deviatich dňoch bol potkanom v rovnakom čase opakovane podaný LPS alebo FR. Tri hodiny po druhej stimulácii boli potkany usmrtené dekapitáciou v izofluránovej anestézii. Tukové tkanivo a pečeň boli odoberaté, zmrazené v tekutom dusíku a uskladnené na -80 °C.

Na izoláciu RNA sme využili RNeasy Plus Universal Mini Kit (Quiagen, USA) a postupovali sme podľa návodu od výrobcu. Tkanivo pečene bolo homogenizované v lyzačnom reagente QIAzol (RNeasy, Quiagen, USA) a tukové tkanivo bolo homogenizované v TRI reagente (Molecular Research Center, Inc., USA) pomocou prístroja FastPrep (MP Biomedicals, USA). Koncentráciu izolovanej RNA a jej čistotu sme odmerali pomocou NanoDropu (Thermo Fisher Scientific, USA). Na reverznú transkripciu RNA do cDNA sme použili Maxima Reverse Transcriptase kit (EM0741; Thermo Fisher Scientific, USA). Na

amplifikáciu cDNA sme použili Maxima/ROX qPCR Master Mix (K0221, Thermo Fisher Scientific, USA). Real-time PCR prebiehala v detekčnom systéme CFX Connect Real-time System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Relatívnu expresiu génov sme prepočítali pomocou kalibračnej krivky a expresia cieľových génov bola normalizovaná na geometrický priemer ribozomálneho proteínu S29 (Rps29) a aktínu β (Actb) v pečeni a na Rps29 v tukovom tkanive. Zoznam primerov sa nachádza v Tab. 1. Štatistická analýza bola vypracovaná v programe Graphpad Prism 8 (GraphPad software, California, USA). Normálne rozloženie bolo overené pomocou Shapiro-Wilkovho testu. Relatívna expresia génov bola hodnotená dvojfaktorovou analýzou variancie (faktory LPS, ALAN) a Bonfferoniho post hoc testom. Odpoveď na LPS v závislosti od času stimulácie bola vypočítaná ako podiel expresie mRNA po LPS stimulácii a priemeru nestimulovanej skupiny na kontrolnom alebo ALAN režime a bola porovnaná nepárovým t-testom alebo Mann-Whitneyho test.

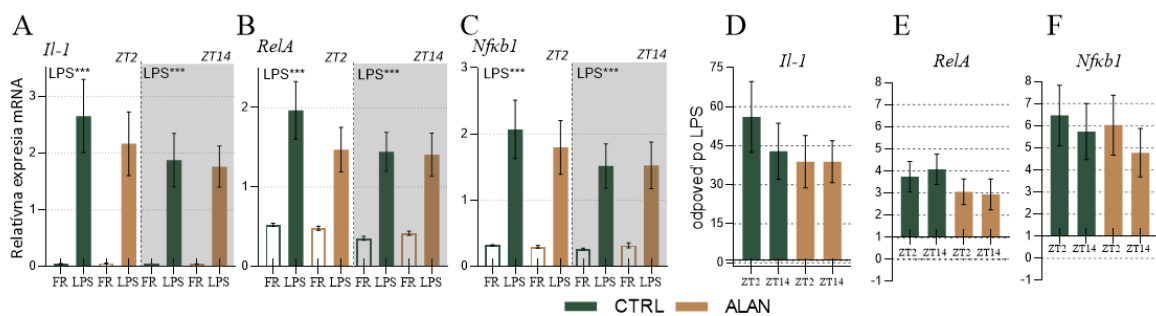
Tab. 1. Zoznam použitých primerov

Gén	Forward sekvencia	Reverse sekvencia
<i>Rps29</i> (NM_012876.1)	GCTGAACATGTGCCGACAGT	GGTCGCTTAGTCCAACCTAA TGAA
<i>Actb</i> (NM_031144.3)	GATCAAGATCATTTGCTCCTC CTG	AGGGTGTAACACGCAGCTCA
<i>RelA</i> (NM_199267.2)	ATTGTGTTCCGAACCTCCCC	TTTCTTCAATCCGGTGGCGA
<i>Nfil3</i> (NM_053727.2)	TTTGACCTGGAGAAGCATGG	GCCTCGGAAACCTTATAGCC
<i>Nfkb1</i> (NM_001276711.1)	TCAGCTTCGGAGAAAATCGG	CTCCTTGTCTTTGATTTCGGG
<i>Il-1</i> (NM_031512.2)	GCCAACAAGTGGTATTCTCC A	GCCGTCTTTCATCACACAGG
<i>Nlrp3</i> (NM_001191642.1)	TCCAGTGTGTTTTCCAGAC C	ACTTGAGAAGAGACCTCGGC
<i>Rev-erba</i> (NM_145775.2)	TCCCACATACTCCCACCAT CA	CACTCGGCTGCTGTCTTCCA T
<i>Bmal1</i> (NM_024362.2)	CACCTTGCGGAATGTCACAG	TACTTCCTTGGTCCACGGGT

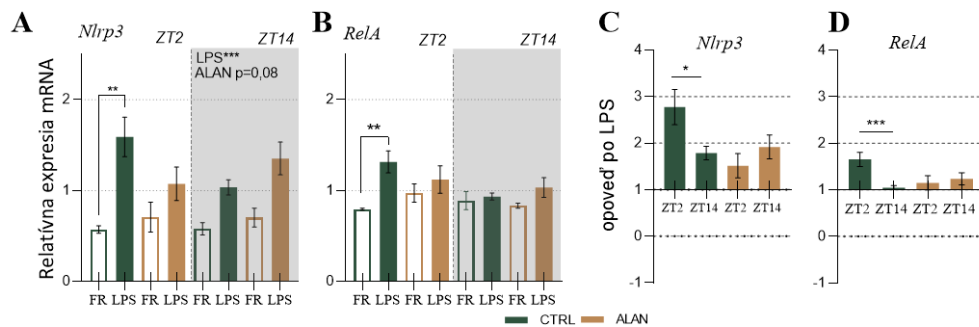
Výsledky a diskusia

V pečeni sme zistili zvýšenú expresiu *Il-1* (ZT2 $F_{(1, 25)} = 60,04$; $p < 0,001$ a ZT14 $F_{(1, 25)} = 78,90$; $p < 0,001$) (Obr. 1A) *RelA* (ZT2 $F_{(1, 25)} = 27,66$; $p < 0,001$ a ZT14 $F_{(1, 24)} = 31,92$; $p < 0,001$) (Obr. 1B) a *NFκB1* (ZT2 $F_{(1, 25)} = 34,15$; $p < 0,001$ a ZT14 $F_{(1, 25)} = 37,85$; $p < 0,001$) (Obr. 1C) po stimulácii s LPS v oboch fázach a bez ohľadu na svetelný režim. Nepozorovali sme žiadnu dennú variabilitu v LPS-indukovanej expresii týchto génov (Obr. 1D, E, F). V tukovom tkanive potkanov na CTRL režime sa expresia *RelA* zvýšila po stimulácii s LPS

v pasívnej fáze ($p<0,01$) pričom po stimulácii v aktívnej fáze sa expresia nemenila ($F_{(1, 25)}=2,521$; $p=0,12$) (Obr. 2B). U potkanov na ALAN režime sa expresia *RelA* v odpovedi na LPS nemenila ani v jednej fáze, čo viedlo k strate dennej variability pozorovanej na CTRL režime (Obr. 2D). Expresia *Nlrp3* sa po LPS stimulácii v pasívnej fáze zvýšila len v CTRL skupine ($p<0,001$) zatiaľ čo žiadnu odpoveď sme nezaznamenali v ALAN skupine ($p=0,25$). Stimulácia v aktívnej fáze zvýšila expresiu *Nlrp3* v oboch skupinách ($F_{(1, 25)}=25,62$; $p<0,001$) (Obr. 2A). Denná variabilita v stimulovanej odpovedi *Nlrp3* bola v ALAN skupine potlačená ($p=0,28$) (Obr. 2C). Tieto výsledky naznačujú že imunitná stimulácia v závislosti od fázy dňa môže vyvolať tkanivovo špecifický efekt odpovede imunitných komponentov.



Obr. 1. Relatívna expresia *Il-1* (A), *RelA* (B) a *Nfkb1* (C) v pečeni u kontrolnej skupiny (CTRL) a ALAN skupiny, 3 hodiny po stimulácii s lipopolysacharidom (LPS) alebo fyziologickým roztokom (FR), v čase ZT2 alebo ZT14 (ZT0 – začiatok svetlej fázy) a normalizovaná odpoveď na LPS pre *Il-1* (D), *RelA* (E) a *Nfkb1* (F). Dáta sú uvedené ako priemer $\pm$ SEM; * $p<0,001$.**

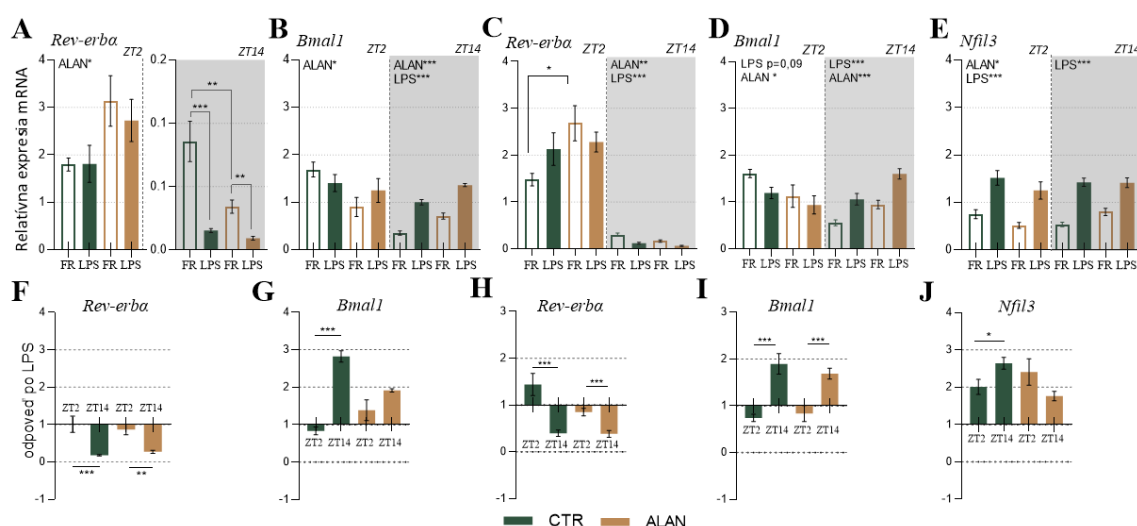


Obr. 2. Relatívna expresia *Nlrp3* (A) a *RelA* (B) v tukovom tkanive u CTRL a ALAN skupiny, 3 hodiny po stimulácii s LPS alebo FR v čase ZT2 alebo ZT14 a normalizovaná odpoveď na LPS pre *Nlrp3* (C) a *RelA* (D). Dáta sú uvedené ako priemer $\pm$ SEM; ** $p<0,01$, * $p<0,001$.**

Expresia *Nfil3* v pečeni sa zvýšila po LPS stimulácii v oboch fázach (ZT2: $F_{(1, 25)}=37,08$; $p<0,0001$ a ZT14: $F_{(1, 25)}=81,79$; $p<0,0001$) bez ohľadu na režim. ALAN znížil v porovnaní s CTRL režimom expresiu *Nfil3* iba vo svetlej fáze ($F_{(1, 25)}=4,662$; $p<0,05$) (Obr. 3E). Tento efekt môže súvisieť so zvýšením expresie *Rev-erba* vplyvom ALAN režimu vo svetlej fáze, keďže REV-ERBA negatívne reguluje expresiu *Nfil3* [4]. Denná variabilita

v odpovedi *Nfil3* po LPS stimulácii bola vplyvom ALAN režimu potlačená ($p=0,19$) (Obr. 3J). Tieto výsledky naznačujú že ALAN režim narušil rytmus jeho expresie indukovanej zápalom.

Expresia *Rev-erba* v pečeni a tukovom tkanive sa vplyvom ALAN režimu zvýšila v pasívnej fáze (pečeň: $F_{(1, 25)} = 7,629$; $p < 0,05$; tuk: $F_{(1, 25)} = 5,793$; $p < 0,05$) a znížila v aktívnej fáze oproti kontrole (pečeň: $F_{(1, 25)} = 15,99$; $p < 0,001$; tuk: $F_{(1, 25)} = 15,901$; $p < 0,001$) (Obr. 3A; 3C). Naopak, expresia *Bmal1* v pečeni a tuku sa vplyvom ALAN režimu znížila v pasívnej fáze (pečeň: $F_{(1, 25)} = 5,305$; $p < 0,05$; tuk: $F_{(1, 25)} = 4,449$; $p < 0,05$;) a zvýšila v aktívnej fáze (pečeň: $F_{(1, 25)} = 51,56$; $p < 0,001$; tuk: $F_{(1, 25)} = 21,63$; $p < 0,001$) v porovnaní s kontrolou (Obr. 3B; 3D). Tieto výsledky naznačujú že rytmická expresia hodinových génov v oboch tkanivách je vplyvom ALAN režimu narušená, čo koreluje aj s výsledkami nedávnej štúdie [8], kde bolo zistené fázové predbiehanie rytmu hodinových génov vplyvom ALAN. Po podaní LPS v aktívnej fáze sa expresia *Rev-erba* znížila (pečeň: $F_{(1, 25)} = 57,16$; $p < 0,001$; tuk: $F_{(1, 25)} = 35,32$; $p < 0,001$) (Obr. 3A; 3C) a expresia *Bmal1* zvýšila (pečeň: $F_{(1, 25)} = 169,1$; $p < 0,001$; tuk: $F_{(1, 25)} = 32,86$; $p < 0,001$) (Obr. 3B; 3D) v pečeni aj tukovom tkanive bez ohľadu na svetelný režim. Imunitná stimulácia v pasívnej fáze neovplyvnila expresiu týchto hodinových génov. Táto denná variabilita v expresii *Rev-erba* po LPS stimulácii bola pozorovaná v CTRL (pečeň: $p < 0,001$; tuk: $p < 0,001$) aj ALAN režime (pečeň: $p < 0,01$; tuk: $p < 0,001$) (Obr. 3F; 3H). V expresii *Bmal1* bola denná variabilita v zápalovej odpovedi potlačená v pečeni ALAN potkanov ($p=0,57$) (Obr. 3G).



Obr. 3. Relatívna expresia *Rev-erba* (A), *Bmal1* (B) a *Nfil3* (E) v pečeni a *Rev-erba* (C) a *Bmal1* (D) tukovom tkanive u CTRL a ALAN skupiny, 3 hodiny po stimulácii s LPS alebo FR v čase ZT2 alebo ZT14 a normalizovaná odpoveď na LPS pre *Rev-erba* (F), *Bmal1* (G) a *Nfil3* (J) v pečeni a *Rev-erba* (H) a *Bmal1* (I) v tukovom tkanive. Dáta sú zobrazené ako priemer $\pm$ SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$.**

Záver

Dvojťždňové vystavenie ALAN režimu nemalo vplyv na zápalovú odpoveď génov NFκB dráhy v pečeni a nezaznamenali sme ani rozdiel v ich zápalovej indukcii medzi aktívnou a pasívnou fázou. V tukovom tkanive ALAN režim potlačil dennú variabilitu v zápalovej odpovedi *RelA* podjednotky a *Nlrp3* transkripčného faktora. Vplyv ALAN režimu a aj od času závislej imunitnej stimulácie mali tkanivovo špecifický efekt. Režim ALAN narušil expresiu *Rev-erba* a *Bmall* v porovnaní s kontrolnou skupinou v oboch tkanivách, čo naznačuje posun rytmickej expresie hodinových génov. Zápalom vyvolaná odpoveď hodinových génov vykazovala v oboch tkanivách jasnú závislosť od fázy dňa, ktorá bola vplyvom ALAN režimu potlačená iba v expresii *Bmall* v pečeni. Narušenie rytmickej expresie hodinových génov ale aj potlačená denná variabilita odpovedi imunitných génov môže ovplyvňovať aj zápalovú adaptáciu metabolizmu, potrebnú pre správny priebeh imunitnej reakcie.

PodĎakovanie

Práca bola podporená grantmi APVV-21-0223 a VEGA 1/0565/22.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Takahashi J. S. (2017) Nat. Rev. Gen. 18, p. 164
- [2] Partch C. L., Green C. B., Takahashi J. S. (2014) Trends Cel Biol. 24(2), p.90
- [3] Spengler M. L., Kuropatwinski K. K., Comas M., et al. (2012) PNAS 109(37), E2457
- [4] Wang S., Lin Y., Yuan X. (2018) Nat. Commun. 9, 4246
- [5] Bellet M. M., Zocchi L., Sassone-Corsi P. (2012) Cell cycle 11(17), p. 3304
- [6] Cavadini G., Petrzila S., Kohler P., et al. (2007) PNAS 104(31), p. 12843
- [7] Okuliarová M., Dzirbiková Z., Rumanová V. S., et al. (2022) Neuroendocrinol. 112(11), p. 1116
- [8] Rumanová V. S., Okuliarová M., Foppen E., et al. (2022) Front. Physiol. 13, p. 973461

Preliminary crystallization of UL144 recombinants from different viral species and their binding to CD160 revealed by co-IP assay

Andrej Bitala, Mário Benko, Simona Lenhartová, Ivana Nemčovičová

Biomedical Research Center of Slovak Academy of Sciences, v. v. i., Department of Viral Immunology, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovakia; andrej.bitala@savba.sk

Abstract

UL144, a Human Cytomegalovirus (HCMV)-encoded transmembrane immunomodulatory glycoprotein, shares a high homology with the human ortholog HVEM. On the other site, CD160 is a GPI-anchored protein, a member of the immunoglobulin superfamily. It functions as a broad specificity receptor for MHC class I and related molecules and plays a crucial role in the activation of NK-cell cytotoxicity and cytokine production. It also modulates the immune system and is implicated in some pathologies, like cancer. Nevertheless, the mutual differences between UL144 and HVEM prevent its interactions with human CD160. Surprisingly, Rhesus Cytomegalovirus (RhCMV)-isolated UL144 interacts with human and rhesus CD160 with low affinity. Recent results revealed the ability of glycosylation mutants prepared from UL144 to interact with CD160 comparable to that of soluble HVEM. In addition, the crystals of UL144 recombinants from both RhCMV and HCMV alone have been prepared and crystallization in complex with CD160 was accessed too. The crystallization data of all protein crystals are being further optimized.

Keywords: HCMV UL144; receptor CD160; vapor diffusion crystallization; co-IP assay

Introduction and Objectives

The UL144 protein belongs to the type I transmembrane glycoproteins, which share the highest degree of similarity with the human herpes virus entry mediator (HVEM) [1]. HVEM plays a crucial role in innate and acquired immune responses related to defence against viral pathogens such as HCMV. It affects the inhibition and proliferation of T-lymphocytes by interactions with immunoglobulins (Ig) or TNF ligands [2]. HVEM is one of the binding partners of CD160. CD160 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane protein with a single IgV-like domain that belongs to the Ig superfamily. There are four distinct isoforms of CD160, but only two (those with an IgV-like domain) can bind to HVEM. It demonstrates that the Ig domain is essential for protein binding [3].

CD160/HVEM is an example of an immune checkpoint, a complex of signalling molecules able to regulate the immune system. In T-lymphocytes, for example, the interaction results in a co-inhibitory signal which suppresses CD4⁺ T cell proliferation and interferon- γ (IFN- γ) production [4 – 5]. In contrast, the CD160/HVEM complex provides costimulatory signals that boost cytokine production and promote lytic activity in NK cells [2]. CD160 and HVEM are the main regulators that exhibit multiple functional outcomes. It depends on several variables, including the competitive engagement of different ligands, expression

patterns at different cell types, *cis* versus *trans* interactions, and the context-dependent direction of signal transduction [6].

Here we focused on the assurance of the atomic and molecular structure of recombinant glycoproteins UL144, and its glycosylation mutants encoded in the U_L/b' genomic region of HCMV or RhCMV to reveal and characterize their mutual binding properties with CD160. A co-immunoprecipitation assay (co-IP) was used to create protein-protein complexes. The result was visualized by Western blot (WB) using specific antibodies against recombinant protein markers.

Materials and method

Protein purification and formation of protein-protein complexes

The baculovirus expression system in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells was used for the expression of recombinant proteins. All types of proteins UL144 contained an N-terminal hexa-histidine tag (HCMV UL144-His (WT), HCMV UL144-His (N91); HCMV UL144-His (DG), RhCMV UL144-His) and C-terminal of human CD160 fused with IgG-Fc tag (HuCD160-Fc). Soluble His-tagged recombinant proteins were purified by affinity chromatography using a HisTrap™ Fast Flow, 1 mL column (GE Healthcare). Also, recombinant protein Fc-fusion CD160 was purified by affinity chromatography using HiTrap™ Protein A HP, 1 ml column (GE Healthcare). After concentration to a final volume by centrifugation on an AmiconR Ultra (Merck Millipore), all proteins have been analyzed using denaturing SDS-PAGE (12.5% SDS-polyacrylamide gel at 140V; 145mA; 40W; 90 mins) and measured on a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). A pull-down assay, applying commercially available Dynabeads™ His-Tag Isolation & Pull-down Kit (Invitrogen), was used for co-immunoprecipitation (co-IP) and formation of protein-protein complexes between recombinant proteins. The workflow using Dynabeads was performed according to the manufacturer's instructions. Protein complexes have been transported by wet Western Blot (WB) to an Immobilon-P PVDF membranes and detected by specific antibody. The work procedure, instructions and solution composition described in the general protocol for WB (Bio-Rad) were followed. On the first membrane, HRP Anti-6X His tag® antibody (ab1187) diluted in 1xTBS-T solution with the addition of 5% (w/v) milk powder in the required ratio was used to detect His-tagged proteins UL144. The Fc-fusion protein CD160 was detected on the second membrane using an Anti-Human IgG (Fc specific) antibody produced in goats and diluted in 1xTBS-T solution with the addition of 5% (w/v) milk

powder in the required ratio. Protein complexes on the membranes were visualized with 1 mg/ml DAB (3,3'-diaminobenzidine) in a solution of 50 mmol/l Tris/HCl (pH 7.3) and 30% hydrogen peroxide (H₂O₂). To stop the reaction has used distilled water.

Protein crystallization

Purified His-tagged recombinant proteins have been concentrated by centrifugation with an AmiconR Ultra 10K (Merck Millipore) to a final concentration of 1-3 mg/ml. Subsequently, crystallization conditions have screened for each of these proteins alone and their complexes with recombinant Fc-fusion protein CD160. The crystallization screens have derived from Hampton Research and Molecular Dimensions, e.g., JCSG-plusTM (MD1-37), PACT Premier MD 1-29 and Morpheus® MD1-46. Preliminary crystallization was achieved by vapor-diffusion technique in a sitting-drop format with classical 24-well plates (CryschemTM Plate). The drop contained an individual His-tagged recombinant protein (in 100 mM Sodium phosphate pH 8.0; 600 mM NaCl; 0.02% TweenTM-20) or its protein-protein complex (in 300 mM Imidazole; 50 mM Sodium phosphate pH 8.0; 300 mM NaCl; 0.01 % TweenTM-20) solution together with precipitant solution from the commercially available screen in the desired ratio. A volume of 0.5 mL of 1.5 M NaCl solution has been added to the reservoir. The completed plate was tape sealed, stored at RT, and observed for one month regularly. The obtained protein crystals have fished out using a crystallization loop, then flash cooled by liquid nitrogen and stored in a nitrogen dewar until measured on a synchrotron.

Results and discussion

All proteins purified by the baculovirus-mediated expression system in Sf9 insect cells (BV-Sf9) were of correct molecular mass, sufficient concentration and purity and used in further experiments. The approximate molecular weight was determined by denaturing (12.5%) SDS-PAGE analysis and WB (Fig. 1, a-e). Concentration and purity have been measured on a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). We used the commercially available kit DynabeadsTM His-Tag Isolation & Pull-down (Invitrogen) to prepare the protein complexes formed between recombinant His-tagged proteins UL144 (native, deglycosylated, N91 and *rhesus*) and Fc-fusion HuCD160. This kit works on the principle of co-immunoprecipitation. Both co-IP were analyzed by WB using different antibodies to determine the binding properties of individual proteins (Fig. 2).

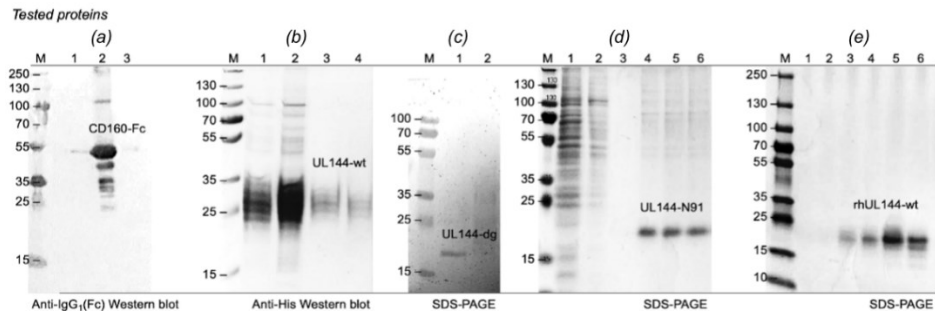


Fig. 1. The result of purification of recombinant proteins HuCD160 (a; lane 2); HCMV UL144-WT (b; lane 1 – 2); HCMV UL144-DG (c; lane 1); HCMV UL144-N91 (d; lane 4 – 6) and RhCMV UL144-WT (e; 3 – 6) in the BV-Sf9 system. Example of sample analysis by Western blot (a, b) and SDS-PAGE (c-e). Lane M: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

Here we report that RhCMV UL144-His was unable to bind to HuCD160-Fc (Fig. 2 (a1), lane 2) even though Šedy *et al.* in their study reported the opposite findings [2], although they have used different set-up. Furthermore, HCMV UL144-WT was also unable to bind HuCD160-Fc (Fig. 2 (a1), lane 4). Interestingly, we proved that HCMV UL144-His DG (Fig. 2 (a1), lane 1) and HCMV UL144-His N91 (Fig. 2 (a1), lane 3) formed a complex with HuCD160-Fc. It suggests the importance of glycosylation (as a post-translational modification of proteins) plays the role in receptor binding. The binding affinity was comparable to that of soluble HVEM. However, there is the fact that the chosen expression system in insect cells may reduce glycosylation compared to mammalian cells and thus affect protein binding. The major bands on the WB corresponded to the HuCD160-Fc complex with recombinant His-tagged proteins that have size is about 50-60 kDa (Fig. 2, a1-a2).

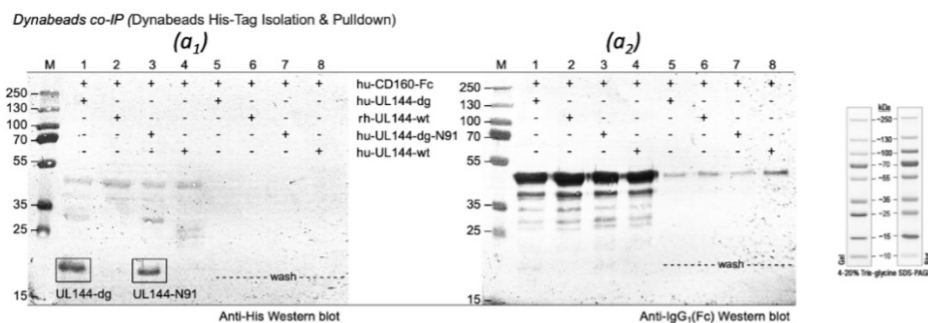


Fig. 2. (a1) WB analysis of co-IP between different constructs of UL144 proteins (encoded by HCMV and RhCMV) and HuCD160-Fc using HRP Anti-6X His tag® antibody (ab1187).

(a2) WB analysis of co-immunoprecipitation assays (co-IP) between different constructs of UL144 proteins (encoded by HCMV and RhCMV) and HuCD160-Fc using Anti- Human IgG (Fc specific) antibody.

Lane M: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific); 1: interaction between HCMV UL144 (DG) and HuCD160-Fc; 2: interaction between RhCMV UL144 (WT) and HuCD160-Fc; 3: interaction between HCMV UL144 (N91) and HuCD160-Fc; 4: interaction between HCMV UL144 (WT) and HuCD160-Fc; 5-8: washing steps after binding of HuCD160-Fc.

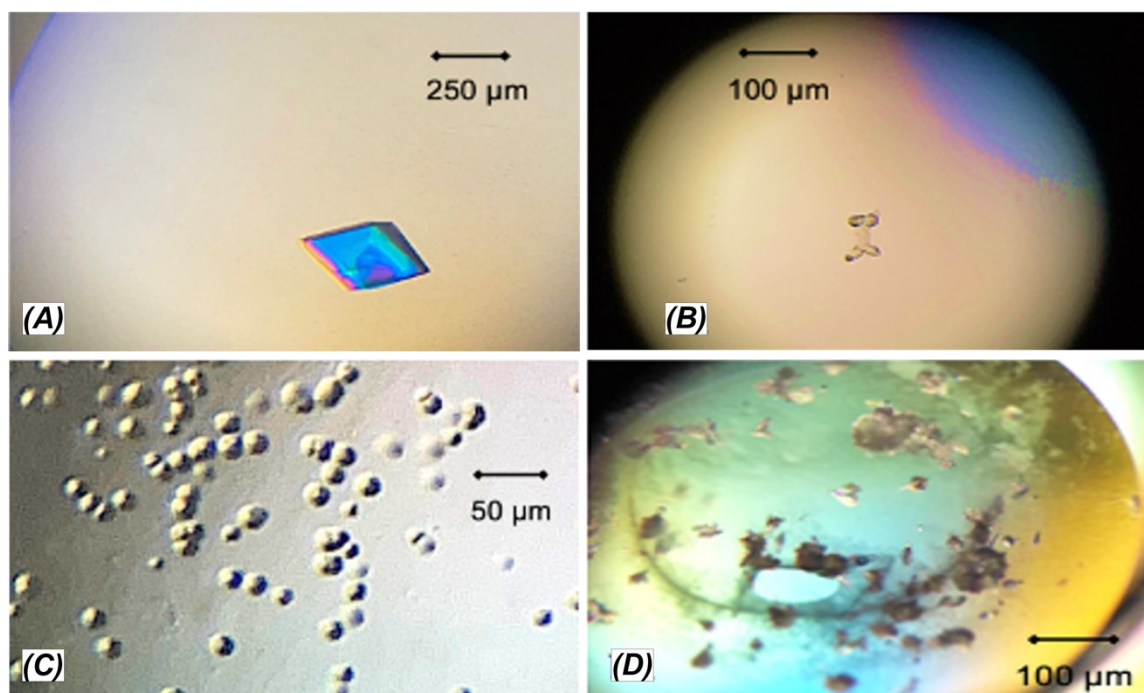


Fig. 3. The crystals of RhCMV UL144-WT (A, B); HCMV UL144-DG (C) and HCMV UL144-N91 (D) were obtained under above-mentioned crystallization conditions with precipitant to protein ratio 1:2 in the drop. Together with the protein crystals, their size is shown in the picture.

Recombinant proteins RhCMV UL144-WT, HCMV UL144-WT, HCMV UL144-DG, and HCMV UL144-N91 have crystallized using the sitting drop vapor diffusion method through different commercial crystallization screens (e.g., JCSG-plusTM (MD1-37), PACT Premier MD 1-29 and Morpheus® MD1-46). We optimized the concentration ratio of proteins to precipitant, as well as temperature, pH, and additives. We have found crystallization "hit" for RhCMV UL144-WT (100 mM CHES pH 9.5, 20%w/v PEG 8000), for another RhCMV UL144-WT (24%w/v PEG 1500), for HCMV UL144-DG (100 mM TRIS pH 7.0, 200 mM Magnesium chloride hexahydrate, 10%w/v PEG 8000) and for HCMV UL144-N91 (200 mM Zinc acetate dihydrate, 100 mM Sodium acetate pH 4.5, 10%w/v PEG 3000). These crystals were of sufficient quality for X-ray diffraction measurement and therefore tested at the DESY synchrotron (Hamburg) (Fig. 3). Recently, we obtained another initial crystallization "hit" for HCMV UL144-DG under the precipitant condition: 100 mM CHES pH 9.5, 20%w/v PEG 8000 (Not shown). Is it the same preliminary crystallization condition that was used for the crystallization of RhCMV UL144-WT (Fig. 3A). Further, we will optimize and test it for X-ray diffraction. We have not yet managed to crystallize the protein complexes prepared by co-IP.

Conclusion

Successfully expressed and purified recombinant His-tagged recombinants of proteins UL144 (HCMV and RhCMV) and recombinant Fc-fusion protein human CD160 with desired properties were allowed to form the protein-protein complexes by using a co-immunoprecipitation assay with specifically labelled antibody. The preliminary results of these protein-protein interactions further emphasize the importance of post-translational modification and its influence on the receptor binding properties. The data obtained by crystallization helped to gain a profound knowledge of the atomic and molecular structure of glycoprotein UL144. The created protein-protein complexes will continue to be tested with commercially available crystallization screens until we find their optimal crystallization "hits". The preliminary crystallization conditions, we found, will be further optimized, and obtained crystals will be tested for X-ray diffraction. This study aims to elucidate the modulation of immune effector pathways by protein UL144 (HCMV or RhCMV) at the molecular level for the rational design of bio-immunotherapeutics.

Acknowledgement

This research was funded by the contribution of the Slovak Research and Development Agency under the project APVV-19-0376; and the contribution of the Scientific Grant Agency of the Slovak Republic under the grant VEGA-02/0026/22. IN was Marie Curie Fellow financed by program SASPRO co-funded by the European Union and the Slovak Academy of Sciences. Part of the research team was supported by the Interreg V-A SK-AT cooperation program by project CAPSID under contract No. NFP305010V235 co-financed by the European Regional Development Fund.

References

- [1] Bitra A., Nemčovičová I., Picarda G., et al. (2019) JBC. 294(27), p. 10519
- [2] Šedý J. R., Bjordahl R. L., Bekiaris V., et al. (2013) J. Immunol. 191(2), p. 828
- [3] El-Far M., Pellerin C., Pilote L., et al. (2014) J. Transl. Med 12(1), p. 217
- [4] Cai G., Freeman G. J. (2009). Immunol. Rev. 229(1), p. 244
- [5] Cai G., Anumanthan A., Brown J. A., et al. (2008) Nat. Immunol. 9(2), p. 176
- [6] Ward-Kavanagh L. K., Lin W. W., Šedý J. R., et al. (2016) J. Immunol. 196(5), p. 1005

Sledovanie imunomodulačného účinku chondroitín sulfátu a fukoidanu v podmienkach *in vivo* na modeli laboratórnych myší

Roman Bubica¹, Jozef Zima², Martina Labudová^{1,3}, Silvia Majcherová¹, Eva Nováková^{1,3}
Veronika Mikušová², Miroslava Šuplíková^{1,2}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie, Mlynská dolina, Ilkovičová 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
bubica3@uniba.sk

²Univerzita Komenského v Bratislave, Farmaceutická fakulta, Katedra galenickej farmácie, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovenská republika

³Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Virologický ústav, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Monitoring the immunomodulatory effect of chondroitin sulfate and fucoidan in *in vivo* conditions on a laboratory mouse model

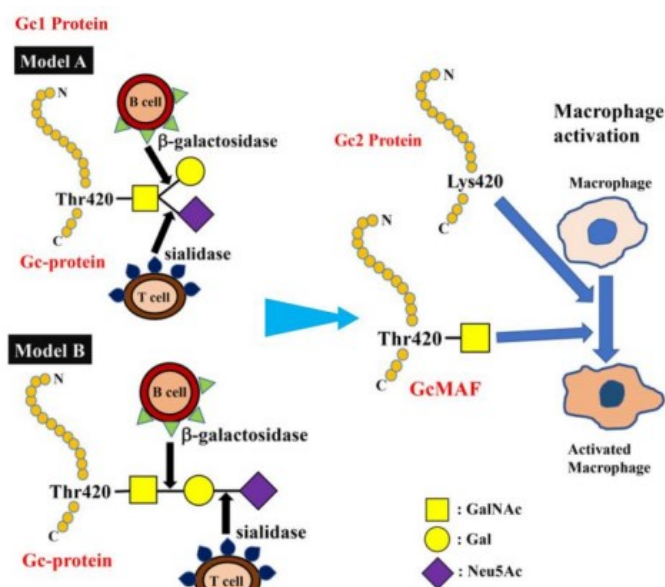
Immunotherapeutic approaches have been supported by the discovery of a specific serum Gc-globulin, or also vitamin D transport protein, with the ability to convert to a specific globulin component of macrophage activating factor (GcMAF). Physiologically, GcMAF acts as a macrophage-activating signaling glycoprotein, inhibits angiogenesis, and exerts tumoricidal effects. Nagalase is produced by cancer cells and virus-infected cells. Nagalase deglycosylates N-acetyl-galactosamine from the GcMAF molecule, thereby inactivating the protein and preventing it from triggering a cascade of immunological mechanisms. The action of nagalase on the GcMAF protein results in a state of immunodeficiency, loss of immunity control over cancer cells, and uncontrolled viral multiplication in the host organism. The submitted contribution represents a literature search from selected areas of the studied topic, which we plan to experimentally devote ourselves to in the future. As part of the experimental part, we carried out an experiment on laboratory mice according to the schemes presented in the article.

Keywords: *GcMAF; nagalase; glycosaminoglycans; fucoidan; laboratory mice*

Úvod a formulácia cieľa

Imunomodulačné účinky chondroitín sulfátu a fukoidanu sú predmetom výskumu inovatívnych imunoterapeutických metód cielených na relatívne novú špecifickú oblasť imunitnej normalizácie. Imunonormalizačné metódy odstraňujúce príčiny dysfunkcie imunity majú potenciál v liečbe chronických ochorení, akými sú imunodysregulácie, imunodeficientné stavy, chronické bakteriálne a vírusové infekcie a onkologické ochorenia. Faktor aktivujúci makrofágy odvodený od Gc-globulínového proteínu (GcMAF) je glykoproteín obsahujúci N-acetyl-galaktozamínový radikál viazaný na treonín v 420. pozícii aminokyselinového reťazca s terminálnym N-radikálom ako väzobným miestom pre vitamín D a jeho metabolity. Vytvára sa modifikáciou Gc-proteínu viažuceho vitamín D (VDTP). Vitamín D sa zúčastňuje na riadení komplexných mechanizmov adaptívneho a vrodeneho imunitného systému. Pritom dochádza k väzbe a transportu k cieľovým receptorom bunkových membrán. Všetky metabolity vitamínu D sú viazané a transportované prevažne proteínom viažucim vitamín D (VDTP-vitamín D-

transportný proteín) [1]. *In vivo* selektívna deglykozylácia Gc proteínu sa vyskytuje prirodzene ako súčasť zápalovej odpovede, zatiaľ čo *in vitro* membránovo viazaná beta-galaktosidáza a sialidáza aktivovaných B- a T-lymfocytov hydrolyzujú terminálnu galaktózu a kyselinu sialovú, pričom vzniká aktívny GcMAF (Obr. 1). Okrem stimulácie makrofágov sa preukázalo, že GcMAF inhibuje angiogézu spojenú s nádorom v rôznych systémoch, a tento účinok sa považoval za skutočnosť, že súvisí s protinádorovými vlastnosťami GcMAF [2, 3].



Obr. 1. Štruktúra Gc-proteínu a jeho konverzia na GcMAF [4].

Záujem o GcMAF je spôsobený jeho schopnosťou podieľať sa na obranných mechanizmoch organizmu prostredníctvom aktivácie makrofágov: obrana proti patogénom, malígnym poškodeným bunkám ako aj posilnenie mechanizmov liečebných procesov. Okrem toho môže zohrávať úlohu pri komunikácii neurónov, modulovať aktiváciu mikroglíí, pôsobiť neuroprotektívne pred toxicitou cytostatík a podporovať tzv. neuroplasticitu [5].

Glykozaminoglykány (GAG) sú skupinou lineárnych, negatívne nabitých polysacharidov, ktoré sa vyskytujú tak na povrchu ľudských buniek, ako aj v extracelulárnej matrix. GAG interagujú so širokým spektrom proteínov, vrátane proteáz, rastových faktorov, cytokínov, chemokínov a adhézných molekúl, čo im umožňuje sprostredkovať mnohé fyziologické procesy, ako je funkcia proteínov, bunková adhézia a signalizácia. Rastúci záujem o výskum interakcií glykozaminoglykánov s proteínmi a ich úlohy pri ľudských ochoreniach, vrátane kardiovaskulárnych chorôb, infekčných chorôb, neurodegeneratívnych chorôb a nádorov, prináša nové terapeutiká zamerané na špecifické interakcie. Najviac zastúpeným

glykozaminoglykánom v extracelulárnom priestore je chondroitín sulfát (CS), ktorý je základnou zložkou spojivových tkanív. Vedecké poznatky rôznych aspektov fukoidanov (F) sa neustále rozširujú pre rôznorodosť biologických účinkov a širokú dostupnosť z prírodných zdrojov. Medzi známe biologické účinky fukoidanov patrí antivírusová, antikoagulačná, protinádorová, antioxidantná, protizápalová a imunomodulačná aktivita a neuroprotektívne účinky. Terapeutické využitie fukoidanov je intenzívne smerované aj do oblasti liečby rakoviny [3].

Cieľom našich experimentov bude potvrdenie mechanizmu substrátovej inhibície nagalázy založenej na podaní substrátového nadbytku látok zo skupiny glykozaminoglykánov obsahujúcich N-acetylgalaktozamín v molekule inhibujúcich aktivitu nagalázy *in vivo* na modeli laboratórnych myši. V rámci nášho výskumu chceme zistiť, či nami študované látky chondroitín sulfát a sulfatovaný fukoidan a ich kombinácia CS+F majú priaznivé účinky na inhibíciu aktivity nagalázy, a teda na zvýšenie tvorby GcMAF proteínu v danom organizme. Experimentálne pristúpime k cielenému subkutánnemu podaniu nádorových buniek laboratórnym myšiam a budeme sledovať účinok perorálne podaných liečiv CS, F, CS+F na progresiu ako aj inhibíciu vytvorených xenograftov. V rámci výskumu plánujeme študovať ich antiproliferatívny, protinádorový a imunomodulačný účinok. Podstatou imunomodulačného účinku nami študovaných látok chondroitín sulfátu (CS) a fukoidanu (F) je *in vivo* zvýšenie tvorby GcMAF proteínu prostredníctvom inhibície aktivity nagalázy.

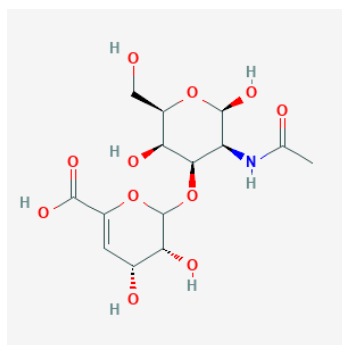
Materiál a metódy

Hepalcl7 - Stabilizovaná adherentná bunková línia, izolovaná z hepatocelulárneho karcinómu C57/L myši.

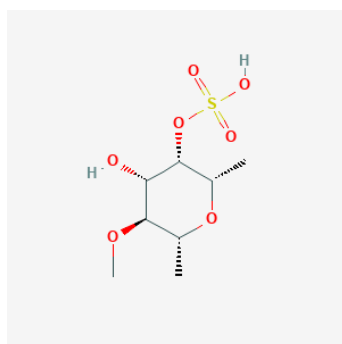
Chondroitín sulfát, Gnosis Bioresearch S.r.l. Italy 0,004% w/w (CS, obr. 2) sa skladá z reťazca striedajúcich sa cukrov, ktorými sú GalNAc a kyselina glukurónová.

Fukoidan KangCare Biotech, Co., Ltd, China 0,002% w/w (F, obr. 3) pozostáva z L-fukózových a sulfátových esterových skupín, môže obsahovať galaktózu, N-acetyl-galaktozamín, xylózu, manózu, kyseliny urónové a glukurónové.

Laboratórne myši z kmeňa NMRI - Línia nahých atymických myši s autozomálnou recesívnou mutáciou v géne *Foxn1* (*forkhead box N1*), ktorá spôsobuje deficienciu T- bunkovej odpovede.

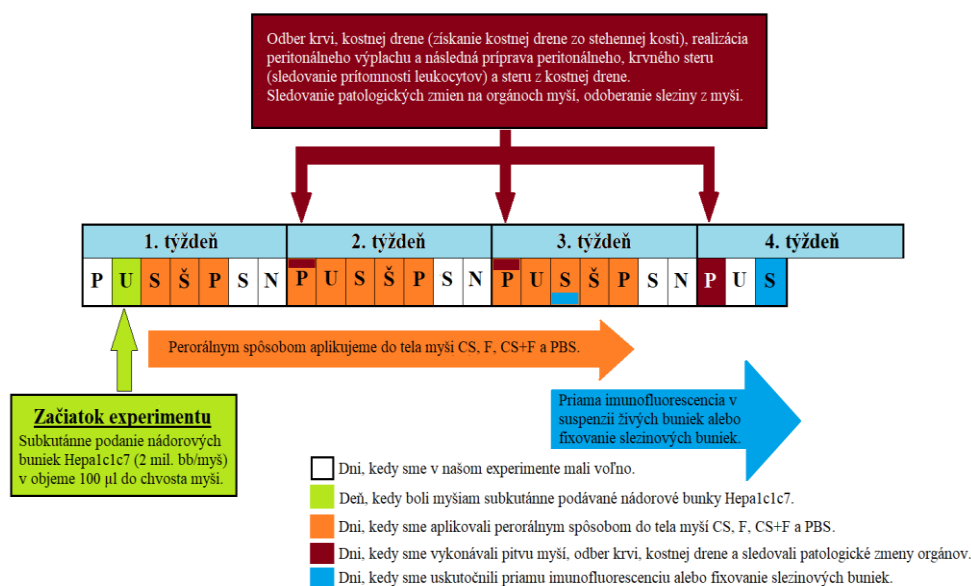


Obr. 2. Chemická štruktúra chondroitínu ($C_{14}H_{21}NO_{11}$) [2].

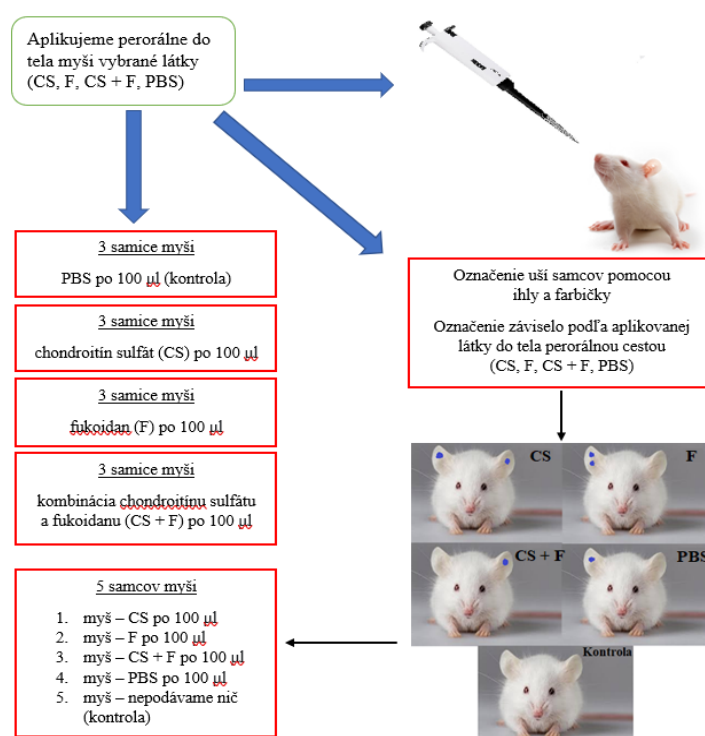


Obr. 3. Chemická štruktúra fukoidanu ($C_8H_{16}O_7S$) [3].

Experiment *in vivo* na laboratórnych myšiach - Experimentálne sme laboratórne myši infikovali subkutánne nádorovými bunkami Hepa 1c1c7 v objeme 100 μ l na 2 mil. buniek. Podľa publikovaných dát sme schému dávkovania v experimentoch navrhli pre podávanie CS 600mg/kg/deň a F 600mg/kg/deň vo vode, 1 krát denne, nedelená dávka. Ako prví sme podávali aj dvojkombináciu CS + F a plánujeme študovať synergické účinky týchto látok na myšiach. Podávali sme CS300mg + F300mg/kg/deň 1 krát denne, nedelená dávka. Spomínané látky do tela myši sme aplikovali perorálnym spôsobom pomocou mikropipety + špičky v objeme vopred vypočítanom podľa váhy jedinca. Priebeh experimentu dokumentuje (Obr. 4) a na (Obr. 5) prezentujeme podávanie našich látok laboratórnym myšiam.



Obr. 4. Priebeh experimentu realizovaný na laboratórnych myšiach.



Obr. 5. Podávanie účinných látok perorálnym spôsobom do tela laboratórnych myši. Laboratórne myši rozdelené podľa pohlavia a typu podávanej látky.

Výsledky

V rámci experimentálnej časti nášho výskumu sme zatiaľ zrealizovali experiment na myšiach (Obr. 4 a Obr. 5). Všetky zvieratá sme usmrtili a odobraté vzorky (orgány, krv, sérum) sme vhodne uskladnili. V krátkej budúcnosti plánujeme vyšetriť myšacie séra na prítomnosť a kvantitatívne stanovenie enzýmu nagalázy využitím inovatívnej metódy ELISA. Tento test

má vysokú citlivosť a vynikajúcu špecifickosť na detekciu N-acetylgalaktosaminidázy Alfa (NAGA). Hlavným našim cieľom je sledovanie imunomodulačného účinku CS, F a CS + F na *in vivo* zvýšenie GcMAF proteínu, čo by bolo priamym dôkazom inhibície nagalázy.

Ďalším významným cieľom nášho výskumu je sledovanie fagocytárnej aktivity makrofágov prostredníctvom zvýšenia tvorby GcMAF proteínu v organizme využitím spomínaných látok CS a F pripravených na báze glykozaminoglykánov a sulfátovaných heteropolysacharidov.

Záver

Predložený príspevok predstavuje vypracovanú literárnu rešerš z vybraných oblastí študovanej témy, ktorým sa plánujeme v krátkej budúcnosti experimentálne venovať. V rámci experimentálnej časti sme zrealizovali experiment na laboratórnych myšiach podľa uvedených schém. Predpokladáme, že sledovanie účinkov perorálneho liečiva na imunitnú odpoveď organizmu (v našom výskume na zvieracom modeli) môže poskytnúť významné ukazovatele a nasmerovania v rámci GcMAF imunoterapie. Významným prínosom nášho výskumu je uviesť do praxe novú 3. generáciu GcMAF imunoterapie založenú na inhibícii zvýšenej aktivity nagalázy spôsobujúcej imunodeficientné stavy. Schopnosť nagalázy inhibovať aktivitu makrofágov u experimentálnych myší s vyvíjajúcimi sa nádormi, kde pôsobí ako imunosupresor, je predmetom nášho ďalšieho výskumu s cieľom vytvorenia základov pre nové imunomodulačné liečivá. Hypotetickým terapeutickým cieľom je riešenie neutralizujúce imunosupresívny účinok nagalázy pôsobením na VDTP a Gc-MAF. Jedným z nádejných farmakologických riešení sa javí práve *in vivo* substrátová inhibícia aktivity nagalázy prostredníctvom podávania heteropolysacharidov a glykozaminoglykánov.

PodĎakovanie

Predložený príspevok bol realizovaný s finančnou podporou grantu VEGA 1/0146/23.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Bouillon R., Pauwels S. (2018) The vitamin D-binding protein. In: Feldman DBT-VD. Vitamin D. Amsterdam: Elsevier, 4th ed. p. 9
- [2] Pacini S., Morucci G., Punzi T., et al. (2011) Cancer Immunol. Immunother. 60(4), p. 479
- [3] Zima J., Nováková E., Mikušová V. et al. (2022) Bulletin ČSSM. 4. p. 140
- [4] Nabeshima Y., Abe C., Kawauchi, T., et al. (2020) Sci Rep. 10(1), p. 19122
- [5] Morucci G., Branca J. J., Gulisano M., et al. (2015) Anti-Cancer Drugs 2

Celogenómová analýza kmeňov *Listeria monocytogenes* izolovaných z prostredia spracovania potravín

Alexandra Burdová¹, Aneta Bugalová², Juraj Bugala², Michal Andrežál¹, Eva Kaclíková³, Jana Minarovičová³, Adriána Véghová³, Jana Koreňová³, Hana Drahovská^{1,2}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; burdova23@uniba.sk

²Univerzita Komenského v Bratislave, Vedecký park, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava, Slovenská republika

³Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 821 08 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Whole genome analysis of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food processing environment
Listeria monocytogenes is a gram-positive, facultatively anaerobic, non-spore-forming bacterium that causes listeriosis. It is one of the most dangerous foodborne zoonotic pathogens. It is necessary to monitor the frequency of its occurrence in food. Increased attention should be paid to persistent strains that are capable of creating a permanent risk of contamination of the resulting ready to eat products. In cooperation with the Food Research Institute we have analyzed whole genome sequences of 29 listeria strains isolated from meat factory and sheep dairy farm. We detected prophages integrated in their genomes as they can influence properties of the host bacteria. Totally 72 prophages was present, the number varied from one to five per strain. According to the genome similarity the prophages were divided into thirteen groups. The most frequent prophages possessed incomplete genome with the size of 12 kbp which were integrated into the esterase gene. Prophages integrated into tRNA genes had 40 kbp encoding for 60 genes and were complete. The use of bacteriophage endolysins encoded by these prophages may be useful for the biological control of pathogen growth in food products and food processing environments, because they are able to lyse the host cell by enzymatic degradation of peptidoglycan.

Keywords: endolysin, *L. monocytogenes*; listeriosis; persistence; prophage; WGS

Úvod a formulácia cieľa

Listeria monocytogenes je grampozitívny, alimentárny bakteriálny patogén, ktorý spôsobuje listeriózu, systémové ochorenie vyplývajúce z požitia kontaminovaných potravín. U imunokompromitovaných jedincov môže prechádzať cez hematoencefalickú bariéru alebo fetoplacentárnu bariéru a spôsobiť potenciálne smrteľnú meningitídu alebo sepsu a v prípade gravidných žien môže zapríčiniť predčasný pôrod alebo potrat. Zároveň schopnosť prechodu cez hematoencefalickú a fetoplacentárnu bariéru súvisí so systémovým šírením tohto patogénu [1]. Všetky kmene rodu *Listeria* spp. sú tyčinkovité fakultatívne anaeróby, ktoré môžu rásť pri nízkych teplotách a sú celkom odolné voči environmentálnemu stresu, ako je nízke pH a vysoká koncentrácia solí, čo sú vlastnosti, ktoré robia z *L. monocytogenes* hlavný problém v potravinárskom priemysle [2]. Kontrola *L. monocytogenes* v zariadeniach na spracovanie potravín je výzvou, pretože tento patogén môže perzistovať roky v zariadeniach. Hoci je *L. monocytogenes* inaktivovaná tepelným spracovaním používaným na výrobu RTE (ready to

eat) potravín, krížová kontaminácia po spracovaní zo zariadení a prostredia predstavuje hlavný problém [3, 4]. Na kontrolu post-výrobnej kontaminácie v závodoch na spracovanie potravín sa používajú rôzne prístupy, vrátane prísnych implementácií správnej výrobných praxe, sanitárne štandardné prevádzkové postupy, technológie sterilného balenia [5], post-výrobné úpravy v balení produktov pomocou antimikrobiálnych látok. Na zlepšovanie kontroly *L. monocytogenes* a predchádzaní krížovej kontaminácie v rôznych prostrediach súvisiacich s potravinami sa využívajú prístupy molekulárnej subtypizácie, ktoré poskytujú lepšie pochopenie ekológie a prenosu tohto patogénu.

Cieľom predkladanej práce bola celogenómová analýza kmeňov *L. monocytogenes* izolovaných z prostredia vybraných potravinárskych prevádzok na Slovensku. Ďalším z cieľov práce bola identifikácia integrovaných profágov, nakoľko môžu napomáhať kmeňom *L. monocytogenes* perzistovať v prostredí potravinárskych prevádzok. Môžu kódovať pomocné metabolické gény, faktory virulencie, gény antimikrobiálnej rezistencie, gény úniku pred imunitným systémom alebo gény pre enzýmy s lytickou aktivitou.

Materiál a metódy

Izolácia a kultivácia bakteriálnych kmeňov

Kmene *L. monocytogenes* (Tab. 1) boli izolované v spolupráci s Výskumným ústavom potravinárskym Bratislava z dvoch závodov spracovania potravín štandardnými postupmi na analýzu *L. monocytogenes* v potravinách.

Na kultiváciu kmeňov *L. monocytogenes* sme použili médium Tryptic-Soy Broth (TSB), pričom bakteriálne kmene boli inkubované pri teplote 37°C po dobu 12 hodín. Takto rozrastené nočné kultúry boli použité na izoláciu DNA.

Izolácia DNA a príprava sekvenáčnych knižníc

Na izoláciu chromozomálnej DNA *L. monocytogenes* sme použili komerčnú súpravu QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Nemecko) a kontrolu koncentrácie DNA sme overili na prístroji Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen by ThermoFisher Scientific; Eugene, Oregon USA). Genómové knižnice určené na sekvenovanie sme pripravili podľa protokolu Nextera XT DNA Prep Kit (Illumina; SanDiego, California USA) a prečistili na magnetických guľôčkach AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter Life Sciences; Indianapolis, Indiana USA). Priemernú dĺžku finálnych knižníc sme stanovili pomocou prístroja Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies; Santa Clara, California USA) a samotné sekvenovanie prebehlo na platforme Illumina (Illumina; SanDiego, California USA).

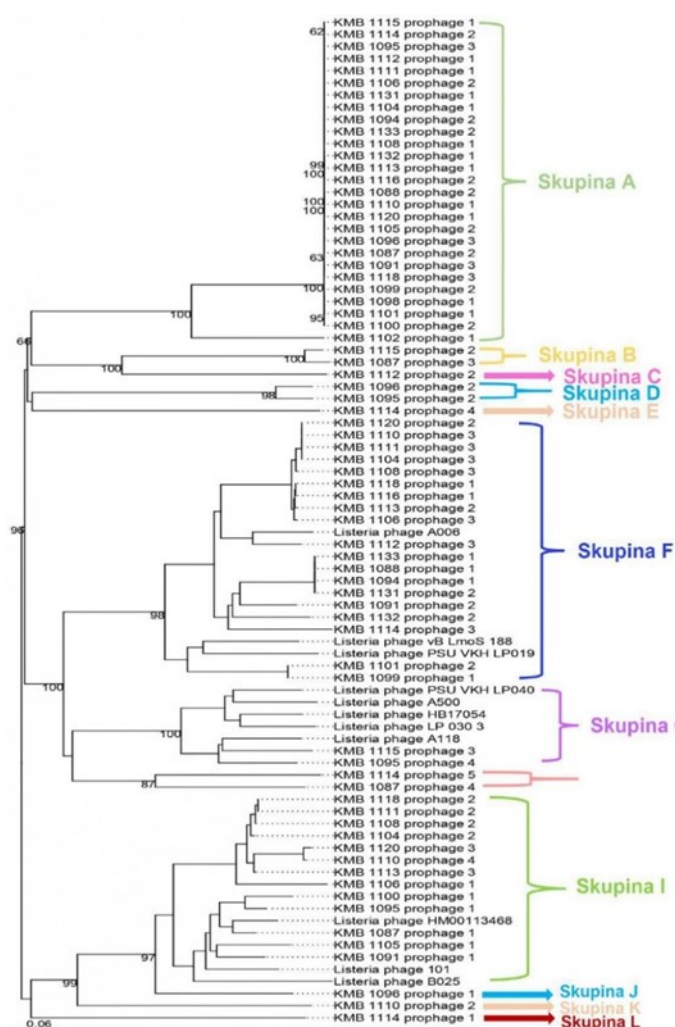
Bioinformatická spracovanie a analýza genómov *L. monocytogenes*

Dáta zo sekvenátora sme poskladali do kontigov pomocou algoritmu SPAdes (Center for Algorithmic Biotechnology; St. Petersburg State University, Russia) a genómy sme anotovali a analyzovali pomocou online platforiem BV-BRC (Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Integration Center) a CGE (Center for Genomic Epidemiology; Kongens Lyngby, Denmark). V anotovaných sekvenciách sme detekovali profágy integrované v genóme jednotlivých kmeňov na základe identifikácie fágových esenciálnych proteínov, ako sú integrázy, alebo na základe identifikácie oblasti obsahujúcej proteíny podobné profágovým proteínom. Z identifikovaných profágov sme vytvorili fylogenetický strom v databáze VICTOR (Virus Classification and Tree Building Online Resource) s využitím vzorca D0, podpory vetvy odvodennej zo 100 pseudo-bootstrap replikátov a F hodnoty 0,6.

Výsledky a diskusia

V práci sme sekvenovali 29 kmeňov *L. monocytogenes* (Tab. 1), ktoré boli zaradené do šiestich sekvenčných typov. Priemerná dĺžka genómu bola 2,9 Mb s priemerným počtom kontigov 35 a pokrytím 51. Pomocou vyhľadávania profágových génov sme v anotovaných genómoch detekovali profágy. Celkový počet identifikovaných profágov v týchto kmeňoch bol 72. Na základe 70% pokrytia genómu a 50% identity sme profágy rozdelili do 13 skupín označených písmenami A-L. Do skupiny A sme zaradili 27 profágov, do skupiny B dva profágy identifikované v kmeňoch *L. monocytogenes* KMB-1087 a *L. monocytogenes* KMB-1115, do skupiny C iba jedného profága identifikovaného v kmeni *L. monocytogenes* KMB-1112, do skupiny D profágy identifikované u kmeňov *L. monocytogenes* KMB-1095 a *L. monocytogenes* KMB-1096, do skupiny E jedného profága identifikovaného v kmeni *L. monocytogenes* KMB-1114, do skupiny F 19 identifikovaných profágov, do skupiny G dva profágy identifikované v kmeňoch *L. monocytogenes* KMB-1095 a *L. monocytogenes* KMB-1115, do skupiny H dva profágy identifikované v kmeňoch *L. monocytogenes* KMB-1087 a *L. monocytogenes* KMB-1114, do skupiny I 13 profágov, do skupiny J jedného profága identifikovaného v kmeni *L. monocytogenes* KMB-1096, do skupiny K jedného profága identifikovaného v kmeni *L. monocytogenes* KMB-1110 a do skupiny L profága identifikovaného v kmeni *L. monocytogenes* KMB-1114. Zistili sme, že každý kmeň obsahoval minimálne jedného profága a maximálne sme našli päť integrovaných profágov v genóme kmeňa *L. monocytogenes* KMB-1114. Najčastejším miestom integrácie profágov do genómu boli gény pre tRNA, po ktorých nasledovali gény kódujúce kompetenčný transkripčný faktor a esterázu. Profágy integrované do esterázových génov predstavujú neúplné profágy s veľkosťou

genómu 12 kbp kódujúce 19 proteínov, ktoré nemajú homológiu so žiadnymi publikovanými profágmi. Profágy integrované do génov pre tRNA naopak predstavujú úplné profágy, majú veľkosť genómu v priemere 40 kb so 60 proteín kódujúcimi génmi. Tieto fágy boli príbuzné s niekoľkými profágmi v databáze, pričom najčastejšie to bolo s profágmi LP A006, LP A118, LP 030-3, LP HM00113468 a LP 101 [6]. Z identifikovaných listeriových profágov sme na základe podobnosti nukleotidových sekvencií vytvorili fylogenetický strom pomocou databázy VICTOR (Obr. 1).



Obr. 1: Fylogenetický strom identifikovaných profágov v genóme kmeňov *L. monocytogenes* izolovaných z prostredia potravinárskych prevádzok

Tab. 1: Identifikované profágy v genóme kmeňov *L. monocytogenes* izolovaných z prostredia potravinárskych prevádzok

*ST= sekvenčný typ

**P/Sp= perzistentný/sporadický

Kmeň	ST*	P/Sp**	Pôvod vzorky	Identifikované profágy	Počet integrovaných profágy
KMB-1087	9	P	mäsová prevádzka	A, B, H, I	4
KMB-1088	14	P	mäsová prevádzka	A, F	2
KMB-1091	8	Sp	mäsová prevádzka	A, F, I	3
KMB-1094	14	P	mäsová prevádzka	A, F	2
KMB-1095	121	Sp	mäsová prevádzka	A, D, G, I	4
KMB-1096	9	P	mäsová prevádzka	A, D, J	3
KMB-1098	194	Sp	mäsová prevádzka	A	1
KMB-1099	6	Sp	mäsová prevádzka	A, F	2
KMB-1100	87	Sp	mäsová prevádzka	A, I	2
KMB-1101	6	Sp	mäsová prevádzka	A, F	2
KMB-1102	20	-	mäsová prevádzka	A	1
KMB-1104	14	P	ovčia farma	A, F, I	3
KMB-1105	2833	Sp	ovčia farma	A, I	2
KMB-1106	14	P	ovčia farma	A, F, I	3
KMB-1108	14	P	ovčia farma	A, F, I	3
KMB-1110	14	P	ovčia farma	A, F, I, K	4
KMB-1111	14	P	ovčia farma	A, F, I	3
KMB-1112	91	Sp	ovčia farma	A, C, F	3
KMB-1113	14	P	ovčia farma	A, F, I	3
KMB-1114	451	Sp	ovčia farma	A, E, F, H, L	5
KMB-1115	394	Sp	ovčia farma	A, B, G	3
KMB-1116	14	P	ovčia farma	A, F	2
KMB-1118	14	P	ovčia farma	A, F, I	3
KMB-1120	14	P	ovčia farma	A, F, I	3
KMB-1131	14	-	mäsová prevádzka	A, F	2
KMB-1132	14	-	mäsová prevádzka	A, F	2
KMB-1133	14	-	mäsová prevádzka	A, F	2
Celkový počet					72

Záver

V práci sme pomocou celogenómového sekvenovania charakterizovali 27 kmeňov *L. monocytogenes*. Kmene sme rozdelili do šiestich sekvenčných typov na základe MLST analýzy. V kmeňoch sme celkovo identifikovali celkovo 72 profágov. Tieto profágy môžu napomáhať kmeňom *L. monocytogenes* perzistovať v prostredí potravinárskych prevádzok, nakoľko môžu kódovať pomocné metabolické gény, faktory virulencie, gény antimikrobiálnej rezistencie, gény úniku imunity alebo gény pre enzýmy s lytickou aktivitou.

PodĎakovanie

Práca bola zrealizovaná vďaka finančnej podpore z projektu APVV-20-0001.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Drolia R, Bhunia A. K. (2019) Trends in Microbiology. 27 (5), p. 408
- [2] Gandhi M, Chikindas M. L. 2007. Int. J. Food Microbiology. 113 (1), p. 1
- [3] Lappi, V. R., Thimothe, J., Nightingale, K. K., et al. (2004) Journal of food protection. 67 (11), p. 2500
- [4] Lawrence, L. M., Gilmour, A. (1995) Applied and Environmental Microbiology. 61 (6), p. 2139
- [5] David, J. R., Coronel, P. M., Simunovic, J. (2022). Handbook of aseptic processing and packaging. Crc Press, p. 1
- [6] Loessner, M. J., Inman, R. B., Lauer, P., et al. (2000) Molecular microbiology. 35 (2), p. 324

Antropologická analýza kostrových pozostatkov z krypty v Katedrále Najsvätejšej Trojice v Žiline (Slovensko) – Predbežné výsledky

Nina Cekulová, Silvia Bodoriková, Michaela Dörnhöferová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra antropológie, Ilkovičova 6, Mlynská dolina, 842 15, Bratislava, Slovenská republika; cekulova1@uniba.sk

Abstract

Anthropological analysis of skeletal remains from the crypt in the Cathedral of the Holy Trinity in Žilina (Slovakia) – Preliminary study

Skeletal remains exhumed from the crypt in 2020–2022 were analysed. A basic anthropological analysis, including an evaluation of morphoscopic and morphometric features, an estimation of sex and age at death of the individuals, was performed. To date, approximately 35% of the total volume of skeletal remains has been exhumed from the crypt. Based on the number of skulls and cranial bones, the minimum number of individuals whose remains have been exhumed from the crypt is 1,870 adults. The minimum number of non-adults was determined to be 606 based on the number of right humeri. Of the 553 adult skulls, most were brachycephalic (45.4%). Stature was estimated from maximum femur length (F1). The average stature of males was 170.3 ± 6.0 cm, and that of females was 160.2 ± 5.2 cm. Most of the males and females belonged to the category of high stature (46.5% and 52.4%, respectively). The research will be continued in the summer of 2023.

Keywords: *ossuary; morphometric and morphoscopic analysis; minimum number of individuals*

Úvod a formulácia cieľa

Katedrála Najsvätejšej Trojice patrí k najstarším a najvýznamnejším objektom v centrálnej časti mesta Žilina. Prvá písomná zmienka o farskom kostole v Žiline pochádza z roku 1423. Objav starších základov pod súčasným kostolom však posunul jeho existenciu až do polovice 13. storočia, kedy bolo okolie kostola vyhradené na pochovávanie žilinských mešťanov a to až do konca 18. storočia [1]. V roku 2020 sa konala prvá etapa obnovy exteriéru kostola. Počas prebiehajúceho archeologického výskumu bol v stene bočnej lode chrámu objavený vetrací otvor, ktorý ústil do klenbovej miestnosti, interpretovanej ako krypta. Vybudovaná bola pravdepodobne v 14. storočí. Tento priestor s rozmermi $6,4 \times 6,5$ m a výškou asi 3,9 m bol zaplnený ľudskými kostrovými pozostatkami do výšky viac ako 2 m v objeme 80 až 90 m³. Pozostatky neležali v anatomickej polohe, ale boli premiešané so zeminou, hoblinami a rôznymi archeologickými nálezmi. Kostí pochádzajú pravdepodobne z pôvodného prikostolného cintorína a zrejme aj z neďalekej kostnice [2]. Katedra antropológie PriF UK v Bratislave v spolupráci s Považským múzeom v Žiline a Žilinskou diecézou realizovala v lete 2021 a 2022 workshopy, počas ktorých bolo exhumovaných približne 35 m³ kostrových pozostatkov. Cieľom antropologickej analýzy bolo zhodnotenie morfoskopických a morfometrických znakov, odhad pohlavia a veku dožitia jedincov a stanovenie minimálneho

počtu jedincov, ktorých pozostatky boli uložené do krypty.

Materiál a metódy

Predmetom antropologickej analýzy boli kostrové pozostatky z krypty Katedrály Najsvätejšej trojice v Žiline exhumované počas troch výskumných sezón v rokoch 2020 – 2022. Kostrové pozostatky boli triedené v exteriéri kostola, v priestore pred kryptou. Morfoskopická a morfometrická analýza prebiehala priamo na mieste (Obr. 1). Hodnotili sa tie kosti, ktorých stav zachovanosti to dovolil a v množstve, ktoré bolo možné z hľadiska našej časovej kapacity spracovať. Zvyšné kosti sa len spočítavali, aby bolo možné odhadnúť minimálny počet jedincov (MNI), ktorých pozostatky boli uložené do krypty [3]. Neúplné lebky sa počítali len tie, ktoré mali zachovanú čelovú kosť. V prípade dlhých kostí to boli len také, ktoré mali zachovaných viac ako 50 % diaľfýzy. Na lebkách sme vek dožitia dospelých jedincov odhadovali podľa stupňa obliterácie lebečných švov [4] a podľa stupňa opotrebovania zubov [5]. U nedospelých jedincov bol vek odhadnutý na základe stupňa mineralizácie a prerezávania chrupu [6]. Na lebkách dospelých jedincov sme na odhad pohlavia zhodnotili stupeň rozvoja sexuálne-diagnostických znakov, na základe ktorých sme vypočítali hodnotu DS skóre (stupeň sexualizácie) [7]. V rámci kranioetrickej analýzy sme vypočítali dĺžkovo-šírkový *index cranialis* (I1) [8]. Na ramenných a stehnových kostiach sme pohlavie odhadovali na základe obvodu a priečneho, resp. zvislého priemeru hlavice [9]. Telesnú výšku sme vypočítali len u dospelých jedincov, a to na základe maximálnej dĺžky stehnovej kosti (F1) [10]. Na základe vypočítanej výšky sme jedincov klasifikovali do kategórií podľa Martina a Sallera (1957) [8].



Obr. 1. Triedenie kostí pred kryptou (A) a morfometrická analýza (B – C)

Výsledky a diskusia

Stanovenie minimálneho počtu jedincov (MNI)

Najpočetnejšie zastúpené boli lebky a kosti lebky dospelých jedincov (Tab. 1). Prítomných bolo 1870 lebiek v rôznom stupni zachovania (914 *calvarium*, 404 *calvaria*, 299 *calva*, 235 *os frontale*, a 18 *splanchnocranium s os frontale*), čo znamená, že doposiaľ exhumované pozostatky patrili minimálne 1870 dospelým jedincom. U nedospelých jedincov sme zaznamenali najviac pravostranných ramenných kostí (N = 606). V krypte boli teda pochované pozostatky minimálne 606 nedospelých jedincov. Vzhľadom na to, že doposiaľ sme exhumovali asi len 30 % z celkového objemu kostrových pozostatkov, konečný počet pochovaných jedincov bude určite vyšší.

Tab. 1. Počet exhumovaných kostí rozdelených podľa pohlavia a laterality

D – pravá kosť, S – ľavá kosť, N – neurčená lateralita, C – krčné stavce, Th – hrudníkové stavce, L – driekové stavce, S – krížové stavce

Druh kosti	Dospelí jedinci								Nedospelí jedinci			
	Muži		Ženy		Neurčení			Spolu	Spolu			
Lebka	232		128		1510			1870	322			
Sánka	50		22		559			631	89			
C1	0		0		67			67	5			
C2	0		0		47			47	4			
C3 – C7	0		0		159			159	34			
Th1 – Th12	0		0		1195			1195	125			
L1 – L5	0		0		1165			3495	82			
S1 – S5	0		0		0			0	8			
Krížová	0		0		412			412	20			
Hrudná	0		0		92			92	2			
Druh kosti	D	S	D	S	D	S	N	Spolu	D	S	N	Spolu
Rebrá	0	0	0	0	26	30	0	56	5	3	0	8
Jablčko	0	0	0	0	4	13	0	17	0	0	0	0
Kľúčna	0	0	0	0	188	224	0	412	142	30	0	172
Lopatka	0	0	0	0	340	353	0	693	236	39	0	275
Ramenná	134	106	117	82	855	853	0	2147	606	203	0	809
Vretenná	0	0	0	0	573	478	0	1051	60	46	0	106
Lakt'ová	0	0	0	0	656	566	0	1222	60	33	0	93
Panvová	211	184	133	140	460	466	0	1594	88	91	0	179
Stehnová	420	436	148	155	1051	1170	0	3380	504	495	0	999
Píšťala	0	0	0	0	1384	1244	0	2628	234	223	1	458
Ihlica	0	0	0	0	471	445	109	1025	40	42	25	107

Morfoskopická a morfometrická analýza lebiek

Predmetom analýzy bolo 638 lebiek vo veľmi dobrom stave zachovanosti. Z celkového počtu 602 lebiek dospelých jedincov, bolo 232 mužských, 128 ženských a 242 lebiek neurčeného pohlavia (Tab. 2). Čo sa týka veku dožitia, najvyšší počet dospelých jedincov bol

v kategórii *adultus* (314 lebiek, 49,2 %) a najnižší počet vo veku *senilis* (52 lebiek, 8,2 %).

Tab. 2. Rozdelenie hodnotených lebiek na základe pohlavia a veku dožitia

N – počet lebiek

Vekové kategórie	Muži		Ženy		Neurčené pohlavie		Spolu	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Infans I</i> (7 mes. – 6 r.)	0	0,0	0	0,0	1	0,2	1	0,2
<i>Infans II</i> (7 – 13)	0	0,0	0	0,0	15	2,4	15	2,4
<i>Juvenis</i> (14 – 19)	0	0,0	0	0,0	20	3,1	20	3,1
<i>Adultus</i> (20 – 39)	96	15,0	83	13,0	135	21,2	314	49,2
<i>Maturus</i> (40 – 59)	104	16,3	33	5,2	83	13,0	220	34,5
<i>Senilis</i> (60 +)	24	3,8	9	1,4	19	3,0	52	8,2
Dospelí neurčiteľní	8	1,3	3	0,5	5	0,8	16	2,5
Spolu	232	36,4	128	20,1	278	43,6	638	100,0

Index cranialis (I1) bolo možné vypočítať pri 553 lebkách dospelých jedincov (Tab. 3). Najviac zastúpené boli brachykranné (45,4 %), hyperbrachykranné (27,3 %) a mesokranné lebky (17,7 %). Ultradolichokranná lebka bola v súbore zastúpená len jedenkrát (0,2 %) a patrila jedincovi s neurčeným pohlavím. Tieto výsledky poukazujú na brachycefalizačný trend, ktorý je dokázateľne pozorovaný na našom území v období stredoveku až novoveku [11,12].

Odhad telesnej výšky

Z celkového počtu 3380 stehnových kostí dospelých jedincov, bolo metricky analyzovaných 1910 kostí (Tab. 4). Maximálnu dĺžku (F1) bolo možné zmerať na 1348 kostiach, z ktorých bolo 823 mužských (404 pravých (dex.) a 419 ľavých (sin.)), 286 ženských (142 dex. a 146 sin.) a 339 neurčeného pohlavia. Priemerná výška mužov ($170,3 \pm 6,0$ cm) bola klasifikovaná ako vysoká. Najviac jedincov spadalo do kategórie vysoká telesná výška (dex. 45,1 %, sin. 47,9 %), nasledovala nadpriemerná výška. Najmenej zastúpenými kategóriami bola výška malá, veľmi malá a veľmi vysoká. Maximálna dĺžka bola odmeraná na 142 pravých ženských stehnových kostiach a 146 ľavých. Priemerná hodnota výšky postavy žien predstavovala $160,2 \pm 5,2$ cm, ktorá spadá do kategórie vysoká telesná výška. Najviac zastúpenou kategóriou bola vysoká výška postavy (dex. 53,5 %, sin. 51,4 %), nasledovala nadpriemerná výška. Kategória veľmi malej telesnej výšky nebola u žien zaznamenaná vôbec.

Tab. 3. Kategorizácia lebiek dospelých jedincov podľa *indexu cranialis* (Garson 1886) [13]
N – počet lebiek

Kategória	Muži		Ženy		Neurčení		Spolu	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Ultradolichokran ($x - 64,9$)	0	0,0	0	0,0	1	0,2	1	0,2
Hyperdolichokran ($65,0 - 69,9$)	1	0,2	1	0,2	1	0,2	3	0,5
Dolichokran ($70,0 - 74,9$)	5	0,9	3	0,5	10	1,8	18	3,3
Mesokran ($75,0 - 79,9$)	43	7,8	20	3,6	35	6,3	98	17,7
Brachykran ($80,0 - 84,9$)	96	17,4	53	9,6	102	18,4	251	45,4
Hyperbrachykran ($85,0 - 89,9$)	65	11,8	32	5,8	54	9,8	151	27,3
Ultrabrachykran ($90,0 - x$)	8	1,4	5	0,9	18	3,3	31	5,6
Spolu	218	39,4	114	20,6	221	40,0	553	100,0

Tab. 4. Kategorizácia telesnej výšky (Martin a Saller 1957) [8]
N – počet stehnových kostí

Kategória (cm)	Muži				Ženy			
	Pravá kosť		Ľavá kosť		Pravá kosť		Ľavá kosť	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Veľmi malá	1	0,3	1	0,2	0	0,0	0	0,0
Malá	14	3,5	13	3,1	2	1,4	1	0,7
Podpriemerná	58	14,4	39	9,3	4	2,8	5	3,4
Priemerná	63	15,6	61	14,6	25	17,6	21	14,4
Nadpriemerná	68	16,8	84	20,1	32	22,5	31	21,2
Vysoká	182	45,1	201	47,9	76	53,5	75	51,4
Veľmi vysoká	18	4,5	20	4,8	3	2,1	13	8,9
Spolu	404	100,0	419	100,0	142	100,0	146	100,0

Záver

Doposiaľ boli z krypty exhumované pozostatky minimálne 1870 dospelých a 606 nedospelých jedincov. *Index cranialis* (I1) bolo možné vypočítať u 553 lebiek dospelých jedincov. Najviac lebiek (45,4 %) patrilo do kategórie brachykranných. Priemerná telesná výška dosiahla $170,31 \pm 6,0$ cm u mužov a $160,19 \pm 5,2$ cm u žien. Kategória vysoká telesná výška bola u mužov aj u žien zastúpená najpočetnejšie (muži 46,5 %, ženy 52,4 %). Doposiaľ objavené nálezy sú len časťou svedectva, ktoré krypta ešte stále ukrýva, nakoľko v uplynulých troch sezónach bolo exhumovaných asi 35 % z celkového objemu kostrových pozostatkov. Vo výskume krypty sa plánuje pokračovať aj tento rok. Vďaka výskumu získavame stále lepšiu predstavu o živote a zdravotnom stave obyvateľov Žiliny v období vrcholného stredoveku až novoveku a odкрývame tak nepoznanú históriu mesta.

PodĎakovanie

Antropologicko-archeologický workshop a výskum bol realizovaný s finančnou podporou Žilinskej diecézy, Považského múzea v Žiline a Ministerstva kultúry SR v rámci dotačného programu Obnovme si svoj dom 2021 a 2022. Za spoluprácu pri exhumácii kostrových pozostatkov ďakujeme všetkým účastníkom workshopu.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Moravčík J. (2013) Farský kostol v Žiline. In: Moravčík J., Zvedelová K., Janura T., et al. (ed.) História Žiliny – Farský kostol v Žiline. EDIS, Žilina p. 9
- [2] Slaná A., Bodoriková S., Dörnhöferová M., et al. (2021) Vlastivedný zborník Považia XXX, p. 119
- [3] White T. D., Folkens P. A. (2005) The human bone manual. Elsevier Academic Press, California, p. 360
- [4] Meindl R. S., Lovejoy C. O. (1985) Am. J. Phys. Anthropol., 68(1) p. 57
- [5] Lovejoy C. O. (1985) Am. J. Phys. Anthropol., 68(1) p. 47
- [6] Ubelaker D. H. (1989) Human skeletal remains: excavation, analysis, interpretation. Taraxacum, Washington D.C., p. 71
- [7] Acsádi G., Nemeskéri, J. (1970) History of human Life Span and Mortality. Akadémiai Kiadó, Budapešť, p. 347
- [8] Martin R., Saller K. (1957) Lehrbuch der Anthropologie in systematischer Darstellung mit besonderer Berücksichtigung der anthropologischen Methoden. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, p. 324
- [9] Černý M. (1971) Určování pohlaví podle postkranialního skeletu. In: Vlček E. (ed.) Symposium o určování stáří a pohlaví na základě studia kostry. Národní muzeum, Praha, p. 46
- [10] Sjøvold T. (1990) Hum. Evol. 5(5), p. 431
- [11] Pavlíková Š. (2018) Brachycefalizačný trend u predhistorických a historických populácií z územia Slovenska. (Diplomová práca) Univerzita Komenského v Bratislave
- [12] Krásničanová H. (1999) Pelikán, 6, [Citované: 29. marec 2023] <<https://kolweb.lf2.cuni.cz/projekty/pelikan/peli0699/doc8.htm>>
- [13] Garson J. G. (1886) J. R. Anthropol. Inst. G., 15(1) p. 235

Vplyv ošetrovania semien jačmeňa jarného superabsorpčným polymérom na účinnosť moridla proti hubovému patogénu *Bipolaris sorokiniana*

Peter Cilík^{1,2}, Marcela Gubišová², Miroslava Hrdlicová², Martina Hudcovicová², Katarína Ondreičková², Jozef Gubiš², Lenka Klčová²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
cilik2@uniba.sk

²Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Odbor aplikovanej biológie a genetiky, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Slovenská republika

Abstract

The effect of treating spring barley seeds with a superabsorbent polymer on the effectiveness of fungicide dressing against the fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana*

Superabsorbent polymers (SAPs) applied to the surface of seeds act as water reservoirs that can help plants germinate during periods of drought. They can be applied alone, but in agricultural praxis usually together or after the pesticide dressing. The aim of the experiment was to evaluate the changes in the effectiveness of fungicides used for seed protection against seed-born pathogen *B. sorokiniana* after the subsequent application of SAP as a seed coat. The results showed that seed dressing with fungicides significantly reduced plant disease symptoms, both in terms of visual symptom assessment and the amount of pathogenic DNA in plant tissue determined by Real-Time PCR but did not completely prevent plant infection. The application of SAP did not have a negative effect on the effectiveness of the fungicide dressing in protection against the fungal pathogen *B. sorokiniana*.

Keywords: fungicide dressing; Real-Time PCR; seed-born pathogen; seed coating; superabsorbent polymers

Úvod a formulácia cieľa

Aplikácia superabsorbčného polyméru (SAP) na semená poľnohospodársky významných rastlín sa ukazuje ako účinný nástroj v boji proti nedostatku pôdnej vlahy. Sucho sa stáva v dôsledku klimatickej zmeny abiotickým stresovým faktorom, ktorý dramaticky znižuje výnosy vysiatach plodín [1]. Aplikáciou SAP priamo na osivo pomocou kvapalnej suspenzie sa vytvorí veľmi tenký a homogénny film. Po styku s pôdnou vlhkosťou vznikne na povrchu semien hydrogél, ktorý slúži ako mikrozervoár vody pre klíčiace rastliny, z ktorého je voda spätne uvoľňovaná semenu podľa jeho potrieb na základe rozdielov osmotických tlakov [2]. SAP sú považované za pôdne kondicionéry, ktoré majú schopnosť absorbovať molekuly vody a zabudovať ich do svojej 3D štruktúry. Schopnosť opakovanej absorpcie je na úrovni 300-500 násobku hmotnosti SAP [3]. Obaľovanie semien polymérmi sa považuje za inovatívny nástroj na vyrovnanie sa s nedostatkom vody pri klíčení semien, no na druhej strane môže ovplyvniť účinnosť látok na ochranu rastlín používaných pri morení semien.

Okrem abiotického stresu pôsobia na vysiate poľnohospodárske komodity aj biotické

stresové faktory. Jedným zo závažných hubových patogénov jačmeňa jarného (*Hordeum vulgare* L.) je z dlhodobého hľadiska *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker. Huba napáda najmä obilniny, čím spôsobuje pokles úrody a kvality zrna a kontamináciu mykotoxínmi.

V našej práci sme sa zaoberali posúdením vplyvu obaľovania osiva SAP Aquaholder®Seed (kopolymér kyseliny akrylovej, draselnej soli kyseliny akrylovej a akrylamidu) na fungicídny účinok moridla proti hubovému patogénu *Bipolaris sorokiniana*.

Materiál a metódy

Biologický materiál:

a) osivo jačmeňa jarného (*Hordeum vulgare* L.), odr. Bojos a Laudis, morené semená boli ošetrené moridlom Raxil Star (Bayer), polovica z nich následne polymérom Aquaholder®Seed,

b) kultúra *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, kultivovaná na živnej pôde.

Nádobový experiment: Vplyv obaľovania semien SAP na účinnosť fungicídnych látok v moridle bol overovaný v nádobovom experimente v kontrolovaných kultivačných podmienkach (20°C, 16-h fotoperiódou). Semená jačmeňa boli ukladané rovnomerne do kruhu po obvode črepníka, inokulum patogéna vo forme jačmenných krúpkov prerastených mycéliom *B. sorokiniana* bolo aplikované do stredu črepníka. Hodnotené bolo vzchádzanie a výška rastlín po 7 dňoch od výsevu a vizuálne symptómy infekcie viditeľné na koleoptylách rastlín po 3 týždňoch podľa šesťbodovej stupnice: 0/žiadne napadnutie, 1/do 10 % plochy svetlohnedých lézií, 2/ 11 – 25 % svetlohnedých lézií, 3/26 – 40 % svetlohnedých alebo tmavých lézií, 4/41 – 71 % tmavých lézií, 5/76 – 100 % tmavých lézií.

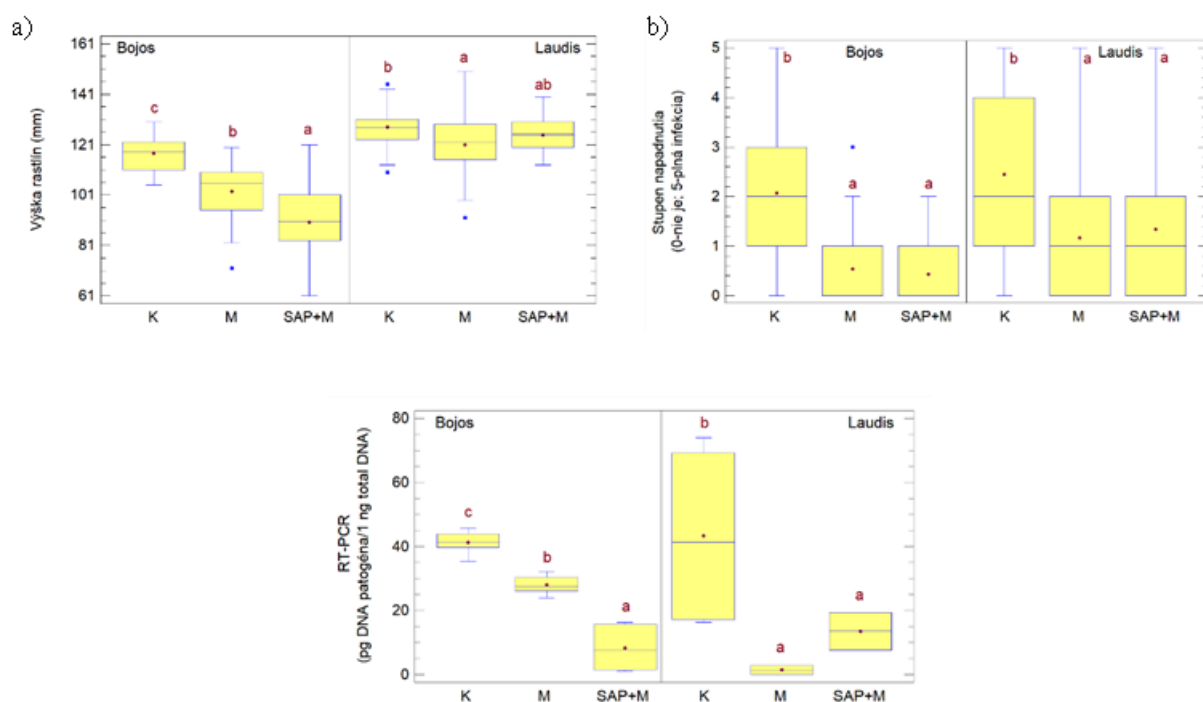
Izolácia DNA a Real-Time PCR: Izolácia celkovej DNA sa uskutočnila z približne 0,1 g hubového mycélia z kultúry *B. sorokiniana* a 0,1 g rastlinného materiálu. Vzorky boli rozdrvené pomocou tekutého dusíka a celková genomická DNA bola izolovaná pomocou extrakčného kitu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Kvantifikácia patogénnej DNA v rastlinnom materiáli sa uskutočňovala metódou real-time PCR pomocou SYBR® Green farbičky (SYBR® Green I Masters Mix). Použité boli špecifické primery BISO2 F a BSOR2 R navrhnuté pomocou programu Primer Express Software v 2.0 z oblasti lokusu Brn1 ohraničenej primermi COSA F/R podľa Matušinský a kol. [4]. Na vyhodnotenie výsledkov bol použitý program ABI PRISM® 7000 software.

Štatistické vyhodnotenie: Výsledky boli štatisticky vyhodnotené testami ANOVA a následným LSD pri hladine významnosti $\alpha = 0,05$ použitím štatistického programu Statgraphics Centurion XVI. Analýza hlavných komponentov (Principal component analysis,

PCA) a PERMANOVA s následným *post-hoc* párovým porovnaním na zistenie rozdielov medzi typmi ošetrovania bola realizovaná pomocou programu Past3 (PAleontological STatistics).

Výsledky a diskusia

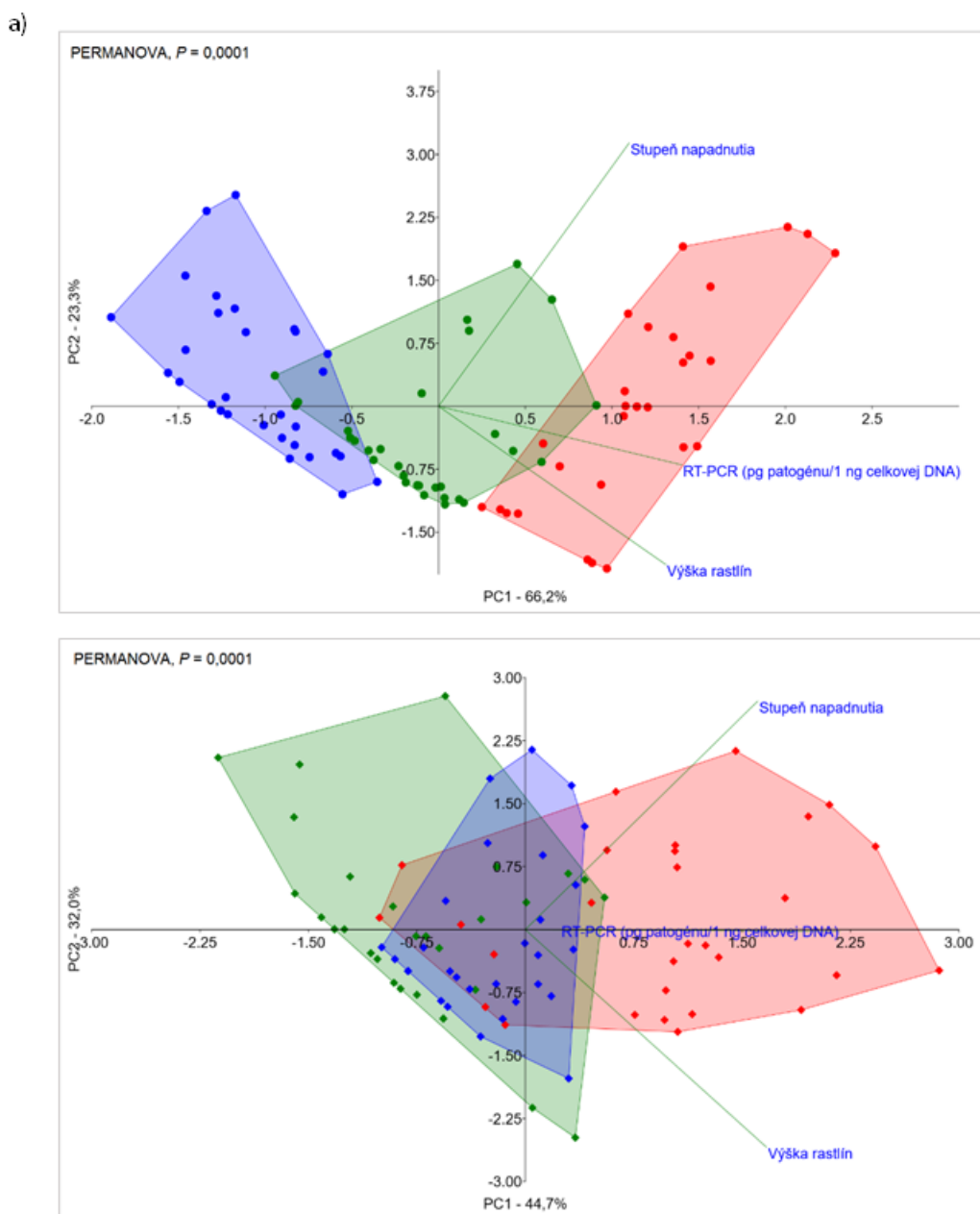
Vzchádzanie rastlín v experimente nebolo ovplyvnené ošetrovaním semien a dosahovalo vo všetkých variantoch oboch odrôd 96,7 – 100%. Výška rastlín bola pri oboch odrodách štatisticky významne ovplyvnená moridlom, ktoré negatívne ovplyvnilo výšku rastlín v juvenilnom štádiu (obr. 1a). Výška rastlín bola signifikantne ovplyvnená aj infekciou v pôde, keď dosahovala v rámci odrôd a variantov ošetrovania semien 120,34 – 141,57 mm pri rastlinách pestovaných v pôde bez infekcie a 90,13 – 128,0 mm pri infikovanom variante.



Obr. 1. Box ploty vyjadrujúce výšku rastliny (a), stupeň napadnutia (b) a množstvo pg patogénnej DNA na 1 ng celkovej DNA (c) pri rôznych typoch ošetrovania osiva jačmeňa v pôde infikovanej *B. sorokiniana*. K=kontrolné osivo bez ošetrovania, M=osivo morené, SAP+M=osivo morené a ošetrované SAP. Rozdielne malé písmená zodpovedajú štatisticky významným rozdielom medzi typmi ošetrovania (LSD, $P \leq 0,05$) a štatistické vyhodnotenie bolo robené pre každú odrodu samostatne.

V prípade vizuálneho hodnotenia symptómov napadnutia boli pri oboch odrodách pozorované signifikantné rozdiely medzi semenami neošetrenými (kontrola) a ošetrenými (obr. 1b), pričom rozdiely v ošetreniach moridlo a moridlo + SAP neboli pozorované. Napadnutie rastlín však bolo vizuálne detekovateľné aj pri rastlinách zo semien ošetrených moridlom samotným alebo v kombinácii so SAP. Kvantitatívna analýza obsahu patogénnej DNA

pomocou real-time PCR rovnako potvrdila štatisticky významné rozdiely medzi ošetrovanými a neošetrovanými semenami (Obr. 1c) v prospech ošetrovaných semien. Pri odr. Bojos ošetrovanie moridlo + SAP vykázalo dokonca lepšie výsledky, t.j. štatisticky významne nižší obsah patogénnej DNA v pletivách rastlín, avšak pri odr. Laudis bol trend opačný, hoci rozdiely neboli štatisticky významné.



Obr. 2. PCA analýza vyjadrujúca rozmiestnenie vzoriek z jednotlivých typov ošetrovania osiva jačmeňa odrody Bojos (a) a Laudis (b). Kontrola bez ošetrovania (červená farba), osivo morené (zelená farba) a osivo morené a ošetrované SAP (modrá farba).

Pomocou analýzy hlavných komponentov (PCA) boli vzorky z rôznych typov ošetrovania štatisticky odlišné pri oboch odrodách (PERMANOVA, $P = 0,0001$; Obr. 2). Prvé dva hlavné komponenty pri odrode Bojos (Obr. 2a) oddelili každý typ ošetrovania osiva od seba, ale pri odrode Laudis (Obr. 2b) je zreteľný prekryv medzi osivami ošetrovanými moridlom a osivom ošetrovaným moridlom spolu so SAP. Tieto ošetrované osivá sa však čiastočne prekrývajú v PCA grafe aj s kontrolnými neošetrovanými vzorkami osiva. Tieto výsledky z PCA grafov boli následne potvrdené *post-hoc* párovým porovnaním hodnôt všetkých hlavných komponentov a pri odrode Bojos bol detegovaný štatisticky významný rozdiel medzi každým typom ošetrovania osiva a pri odrode Laudis štatisticky významný rozdiel bol detegovaný medzi kontrolou a oboma typmi ošetrovania, ale nie medzi vzorkami osiva s moridlom a moridlom spolu so SAP (Tab. 1).

Tab. 1. Párové porovnanie pomocou analýzy PERMANOVA medzi každým typom ošetrovania osiva hodnotené na základe hodnôt hlavných komponentov z PCA z obr. 2. Čísla v tabuľke predstavujú P-hodnoty. P-hodnoty pod diagonálou zodpovedajú odrode Bojos a hodnoty nad diagonálou odrode Laudis.

	Kontrola	Moridlo	Moridlo + SAP
Kontrola		0,0001	0,0001
Moridlo	0,0001		0,0603
Moridlo + SAP	0,0001	0,0001	

V predchádzajúcej práci [5] bola vykonaná podobná štúdia na osive pšenice letnej f. ozimná a kukurice siatej pri infekcii pôdy hubovým patogénom *Fusarium culmorum*. Rovnako aj v týchto experimentoch bolo zistené, že aplikácia SAP na morené osivo zásadne neovplyvnila jeho fungicídny účinok. Náš experiment s použitím ďalšieho hubového patogéna a hostiteľskej rastliny tieto závery potvrdil. [6] potvrdili, že protiokonazol mikroenkapsulovaný v β -cyklodextríne, ktorý bol pridaný do suspenzie na obaľovanie semien pšenice, nielenže efektívne znížil úroveň infekcie pšenice hubovým patogénom *Fusarium graminearum*, ale zároveň zvýšil dĺžku koreňov a stoniek a tiež hmotnosť sušiny a počet klasov v porovnaní s protiokonazolom bez enkapsulácie alebo neošetrovanými semenami. Schopnosti superabsorpčných polymérov interagovať s inými látkami [7] a redukovať ich mobilitu v pôde [8] umožňujú akumulovať účinok týchto látok v mieste potreby a znižovať tak nežiadúcu kontamináciu pôdy. Perspektívne môžu byť tieto látky v poľnohospodárstve využité nielen ako absorbenty vody, ale v kombinácii s ďalšími substanciami, napr. s biopesticídmi alebo symbiotickými mikroorganizmami, dávajú predpoklady pre využívanie ekologicky

prijateľnejších alternatív v boji proti patogénom spôsobujúcim ochorenia plodín.

Záver

Záverom môžeme konštatovať, že ošetrovanie semien SAP s cieľom zlepšiť klíčenie semien v podmienkach sucha nemalo negatívny vplyv na účinnosť moridla v ochrane pred hubovým patogénom *B. sorokiniana*. Použité moridlo signifikantne znížilo prejav symptómov ochorenia na rastlinách, čo sa týka vizuálneho hodnotenia symptómov aj množstva patogénnej DNA v pletivách rastlín, avšak úplne nezabránilo infikovaniu rastlín. Vizuálne symptómy ochorenia boli pri ošetrovaných semenách oboch odrôd slabšie v porovnaní s kontrolnými semenami, bez rozdielov medzi ošetrovaním moridlom samotným a moridlom + SAP. Pri kombinovanom ošetrovaní moridlo + SAP bolo pri jednej z odrôd dokonca detegované signifikantne nižšie množstvo patogénnej DNA.

PodĎakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Inovatívne hnojivá s alternatívnymi prírodnými zdrojmi a ich implementácia v agrotechnických postupoch, 313011BWL7, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Sehgal A., Sita K., Siddique K. H. M., et al. (2018) Front. Plant Sci. 9, p. 1705
- [2] Peteu S. F., Oancea F., Siciua O. A., et al. (2010) Polymers 2(3), p. 229
- [3] Tripathi A. (2018) Acta Sci. Agric. 2(1), p. 1
- [4] Matusinsky P., Frei P., Mikolasova R., et al. (2010) Crop Prot. 29(11), p. 1325
- [5] Gubišová M., Hudcovicová M., Matušinský P., et al. (2022) Polymers 14(1), p. 76
- [6] Chi Y., Ye Z., Su X., et al. (2022) Appl Nanosci 12, p. 2683
- [7] Peteu S. F., Oancea F., Siciua O. A., et al. (2010) Polymers 2(3), p. 229
- [8] Ludwig E. J., Nunes U. R., Prestes O. D., et al. (2020) Rev. Ambient. Agua 15(6), p. 2602

Genetická príčina senzorineurálnej poruchy sluchu s dôrazom na analýzu génu *STRC*

Klaudia Cipková^{1,2}, Silvia Borecká², Marek Sklenár², Lukáš Varga^{2,3}, Dimitrios Paouris⁴, Daniela Gašperiková²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; cipkova13@uniba.sk

²Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Ústav experimentálnej endokrinológie, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika

³Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Univerzitná nemocnica Bratislava, Klinika otorinolaryngológie, chirurgie hlavy a krku, Antolská 11, 851 07 Bratislava, Slovenská republika

⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Národný ústav detských chorôb, Detská otorinolaryngologická klinika, Limbová 1, 833 40 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Identification of the genetic cause of sensorineural hearing impairment with emphasis on the analysis of the *STRC* gene

The second most common cause of autosomal-recessive sensorineural hearing loss are mutations and copy number variations (CNVs) in the *STRC* gene. Pathogenic variants cause non-syndromic hearing loss, but larger deletions of adjacent regions (*CATSPER2*) may lead to a syndromic hearing disorder associated with male infertility. Due to a high homology between the *STRC* gene and its pseudogen, it is difficult to evaluate these changes. Therefore, the aim of our study was to optimize variant identification in the *STRC* gene. Causative mutations including CNVs and point mutations were found in 5.9% of 353 probands. The homozygous *STRC* deletion extended into *CATSPER2* was described in 8 probands. The homozygous deletion of separate *STRC* exons was observed in other 8 probands. Five heterozygous deletion probands exhibited hemizygous pathogenic mutations in the second allele. The results confirmed, that *STRC* is an important contributor to mild-to-moderate congenital hearing impairment.

Keywords: sensorineural hearing loss; *STRC* gene; pseudogene; CNV; point mutations

Úvod a formulácia cieľa

K jedným z najčastejších zmyslových poškodení vo svetovej populácii sa radí porucha sluchu. Za genetickú etiológiu, ktorá tvorí viac ako 50% všetkých prípadov, zodpovedá veľké množstvo génov, ktoré sa podieľajú na nesyndrómovej ako aj syndrómovej poruche sluchu. Častou príčinou miernej až stredne ťažkej, neprogresívnej poruchy sluchu s kongenitálnym nástupom resp. nástupom v detskom veku, sú aj zmeny v géne *STRC* [1]. Tieto zmeny spôsobujú jednak nesyndrómovú senzorineurálnu poruchu sluchu (DFNB16), avšak väčšie delécie zasahujúce aj príľahlý gén *CATSPER2*, sú zodpovedné aj za syndrómovú poruchu sluchu spájanú s mužskou neplodnosťou (Deafness-Infertility Syndrome; DIS). V oboch prípadoch ide o ochorenie s autozomálne recesívnym typom dedičnosti [2].

Doteraz bolo popísaných viac ako 400 patogénnych jednonukleotidových variantov (SNV), malých delécií či inzercií alebo variantov počtu kópií (CNV) génu *STRC*, ktoré sú asociované s poruchou sluchu [3]. Gén *STRC* sa nachádza na chromozóme 15q15.3, obsahuje 29 exónov a jeho veľkosť je približne 19 kb. Kóduje proteín stereocilín dlhý 1809 aminokyselín [4]. K jeho expresii dochádza vo vnútornom uchu, kde sa podieľa na vytváraní *horizontal top connectors* stereocílií vonkajších vlásokových buniek a na ukotvení najvyššej stereocílie k tektoriálnej membráne. *STRC* je tandemovo duplikovaný. Kódujúca sekvencia druhej kópie je však prerušená mutáciou v exóne 20, ktorá vytvára predčasný STOP kodón, čím vzniká neaktívny pseudogén ψ *STRC* [5].

V súčasnosti sa masívne paralelné sekvenovanie novej generácie (NGS) často používa na genetické testovanie v klinickom prostredí, avšak analyzovať gén *STRC* pomocou NGS je náročné. Pri mapovaní osekvenovaných úsekov k referenčnému genómu často dochádza k nesprávnemu porovnávaní získaných sekvencií k samotnému génu *STRC*, ale aj k vysoko homologickej oblasti jeho pseudogénu [6].

Cieľ práce je preto zameraný na optimalizáciu metód umožňujúcich identifikáciu patogénnych respektíve pravdepodobne patogénnych variantov v géne *STRC*, ako aj analýzu CNV v géne *STRC* a príslušných oblastí. Ďalším cieľom práce je stanoviť prevalenciu výskytu senzorineurálnej poruchy sluchu spôsobenej zmenami v géne *STRC* vo vybranej populácii pacientov.

Materiál a metódy

Súbor pacientov. V spolupráci s Klinikou ORL a chirurgie hlavy a krku LFUK a UNB v Bratislave, Detskou ORL klinikou LFUK a NÚDCH v Bratislave a ORL ambulanciami umiestnenými po celom Slovensku bolo od roku 2010 doteraz v Laboratóriu Diabgene, Biomedicínske centrum SAV zozbieraných vyše 2000 vzoriek – 1120 probandov s poruchou sluchu a ich rodinných príslušníkov. V tejto práci sme analyzovali gén *STRC* u 353 pacientov s obojstrannou senzorineurálnou poruchou sluchu, u ktorých predchádzajúce analýzy (analýza génov *GJB2* a *GJB6*) doposiaľ neodhalili príčinu poruchy sluchu. Kritériom pre výber pacientov bol nástup poruchy sluchu do 15. roku života a z testovania boli vylúčení probandi s veľmi ťažkou poruchou sluchu.

Izolácia genomickej DNA. Genomickú DNA z periférnej krvi pacientov sme izolovali pomocou kitu Whole Blood DNA Maxi Preparation Kit (Bioteke Corporation), ale aj prostredníctvom automatického izolátora nukleových kyselín MagCore® HF16Plus (RBC Bioscience), pre ktorý sú navrhnuté komerčne vyrábané stripky využívajúce kit MagCore

Gemonic DNA Large Volume Whole Blood Kit (RBC Bioscience). Počas práce sme sa riadili postupom odporúčaným výrobcom kitu.

Multiplexná amplifikácia prób závislá od ligácie (MLPA). Na presnú identifikáciu rozsahu delécie/duplikácií v našom prípade v géne *STRC* a jeho priľahlých úsekov (gény *PPIP5K1*, *CKMT1B* a *CATSPER2*) sme použili metódu MLPA. Vzorky sme analyzovali pomocou kitu SALSA® MLPA® Probemix P461 DIS A1-0616 (MRC Holland). Na kapilárnom sekvenátore Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) sme separovali súbor PCR amplikónov a získané výsledky sme analyzovali softvérom Coffalyser.Net (MRC Holland).

Long-range a nested PCR. Pomocou LongAmp Hot Start *Taq* DNA polymerázy (NEB) a dvoch párov primerov sme si amplifikovali dva rôzne dlhé PCR produkty. Jeden zahŕňajúci úsek exónov 1-19 a druhý exóny 12-29. Oba produkty sme následne 1000x riedili ultračistou vodou, aby sme sa v nasledujúcich krokoch vyhli kontaminácii pseudogénom.

Výhodou nested PCR je zvýšená citlivosť a špecifickosť amplifikovaného produktu, aj keď je k dispozícii malé množstvo templátovej DNA. V našom prípade sú templátom nariadené PCR produkty z long-range PCR. V nested PCR sme použili páry primerov navrhnuté samostatne pre každý exón, čím sme si amplifikovali kratší špecifickejší PCR produkt jedného konkrétneho exónu. Primery pre long-range a nested PCR sme si navrhli podľa dostupnej literatúry od autorov Vona a kol. [2].

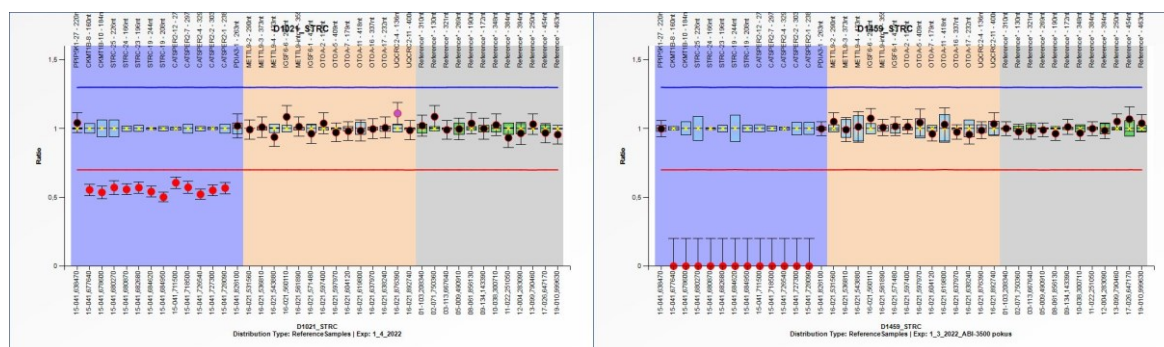
Elektroforéza v agarózovom géli. Po skončení PCR reakcie sme PCR produkty separovali elektroforézou v agarózovom géli (1% a 1,5% gél) a vizualizovali pod UV svetlom, aby sme si overili prítomnosť produktov pred samotným Sangerovým sekvenovaním.

Sangerovo sekvenovanie. Sekvenovanie sa uskutočnilo pomocou kapilárneho sekvenátora Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Získané sekvencie exónov génu *STRC* sme vyhodnocovali pomocou programu SeqScape Software v2.7 (ThermoFisher Scientific), kde boli porovnané voči referenčnej sekvencii NM_153700.2.

Výsledky a diskusia

Z 353 vybraných probandov sa nám podarilo identifikovať príčinu poruchy sluchu na podklade variantov v géne *STRC* celkovo u 21 probandov, čo predstavuje 5,9% v testovanom súbore pacientov. Podobná prevalencia bola popísaná napr. v Nemecku (6%) [2] alebo Českej republike (5,5%) [7]. Homozygotnú deléciu celej oblasti *CKMT1B-STRC-CATSPER2*, ktorá je u mužov spojená so syndrómom DIS, sme identifikovali u 8 probandov (Obr.1, Tab.1). U ďalších 8 probandov sme identifikovali rôzne dlhé homozygotné delécie zasahujúce niektoré

exóny génu *STRC* (Tab. 1). U probanda D414 sme napr. identifikovali homozygotnú deléciu exónov 10 a 11 a u probanda D1453 homozygotnú deléciu exónov 4 až 11 (Tab.1). Tieto krátke delécie exónov génu *STRC* nebolo možné detegovať MLPA metódou, ktorá umožňuje detegovať CNV len v oblasti exónov 19 (2 próby), 23, 24 a 25 (po 1 próbe) (Obr.1) a preto bolo potrebné analyzovať tieto vzorky aj pomocou nested PCR a elektroforézou v agarózovom géli.



Obr. 1. MLPA analýza génu *STRC* u probandov D1021 a D1453. Vľavo: polovičné relatívne množstvo všetkých amplifikovaných exónových oblastí *STRC* (exóny 19 – 25) ako aj príľahlých oblastí (gény *CKMT1B* a *CATSPER2*) v porovnaní s referenčnými amplikónmi u probanda naznačuje heterozygotnú deléciu celej študovanej oblasti. Vpravo: homozygotná delécia oblasti *CKMT1B-STRC-CATSPER2*.

DNA ďalších pätnástich probandov s detegovanou heterozygotnou deléciou génu *STRC* bola ďalej analyzovaná long-range a nested PCR a sekvenovaná podľa Sangeru s cieľom odhalenia variantov v géne *STRC*.

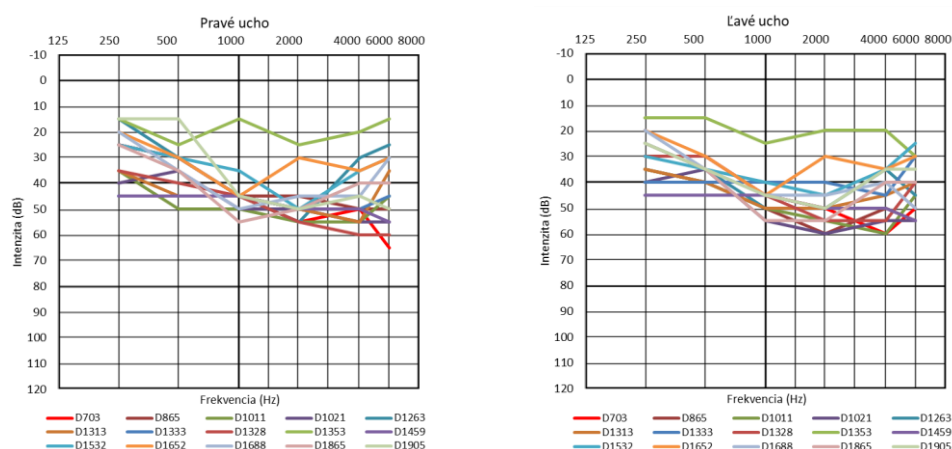
Prostredníctvom chromatogramov zo Sangerovho sekvenovania namapovaných na referenčnú sekvenciu *STRC*, boli pomocou programu SeqScape identifikované patogénne resp. pravdepodobne patogénne varianty génu *STRC* u 5 probandov s heterozygotnou deléciou *STRC*. U pacienta D1333 bol detegovaný nonsense variant c.4402C>T zapríčiňujúci vznik predčasného terminačného kodónu (p.Arg1468Ter). Tento variant bol v minulosti popísaný u pacientov v hemizygotnom stave spolu s heterozygotnou deléciou génu *STRC* [2]. Nonsense variant c.3217C>T (p.Arg1073Ter) bol identifikovaný u troch probandov (D1263, D1011 a D865). Tento variant je známym variantom, ktorý bol popísaný ako variant s najvyššou prevalenciou aj v českej populácii pacientov s poruchou sluchu na podklade mutácií v géne *STRC* [7]. U probanda D1021 bol detegovaný pravdepodobne patogénny variant v pozícii c.3794C>T. Je to missense variant, ktorý spôsobuje zmenu nepolárnej aminokyseliny prolín v konzervovanej polohe 1265 za hydrofóbny leucín (p.Pro1265Leu) (Tab. 1). Tento variant bol nedávno popísaný v zloženom heterozygotnom stave spolu s deléciou celého génu *STRC* u detského pacienta vo Washington [8].

Tab. 1. Klinický fenotyp a genotyp pacientov s detegovanými patogénnymi variantami v géne *STRC*.
(* – syndrómová porucha sluchu, PS – porucha sluchu, M – muž, Ž – žena, c – kongenitálny nástup PS)

Číslo pacienta	Pohlavie	Nástup PS	Závažnosť	Genotyp	
				1.alela	2.alela
D414	M	prelingválne	ťažká*	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>	delécia <i>STRC</i> exón 10-11
D467	M	c	stredne ťažká	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>	delécia <i>CKMT1B-STRC</i> exón 25
D583	Ž	c	stredne ťažká	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>	delécia <i>CKMT1B-STRC</i> exón 25
D703	Ž	10 r.	stredne ťažká	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>	delécia <i>CKMT1B-STRC</i>
D865	M	c	stredne ťažká	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>	<i>STRC</i> : c.3217C>T
D1011	Ž	c	stredne ťažká	delécia <i>CKMT1B-STRC</i>	<i>STRC</i> : c.3217C>T
D1021	Ž	7 r.	stredne ťažká	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>	<i>STRC</i> : c.3794C>T
D1263	Ž	5 r.	stredne ťažká	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>	<i>STRC</i> : c.3217C>T
D1313	M	c	ľahká	delécia <i>CKMT1B-STRC</i>	delécia <i>CKMT1B-STRC</i>
D1328	M	3 r.	stredne ťažká	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>	delécia <i>CKMT1B-STRC</i> exón 25
D1333	M	c	stredne ťažká	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>	<i>STRC</i> : c.4402C>T
D1353	M	c	ľahká	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>	delécia <i>CKMT1B-STRC</i> exón 25
D1453	Ž	c	vľavo ťažká, vpravo ľahká	delécia <i>CKMT1B-STRC</i>	delécia <i>STRC</i> exón 4-11
D1459	M	c	ľahká	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>
D1489	Ž	c	ľahká	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>
D1532	M	c	stredne ťažká	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>
D1652	Ž	c	ľahká	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>
D1688	Ž	c	stredne ťažká	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>
D1845	M	c	ľahká	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>
D1865	M	5 r.	stredne ťažká	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>
D1905	M	c	stredne ťažká	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>	delécia <i>CKMT1B-STRC-CATSPER2</i>

Porucha sluchu na podklade mutácií v géne *STRC* je vo všeobecnosti ľahká až stredne ťažká, neprogredujúca, s nástupom v detskom veku [1]. Audiometrické a ASSR vyšetrenie našich probandov potvrdilo tieto pozorovania (Obr. 2). Závažnosť poruchy sluchu bola u všetkých probandov ľahká až stredne ťažká a bola diagnostikovaná do veku 10 rokov. Výnimku tvorí len proband D414, u ktorého bola diagnostikovaná ťažká porucha sluchu spolu s hereditárnou nefropatiou, renálnou tubulárnou acidózou a mentálnou

retardáciou. U tohto probanda preto zvažujeme WES analýzu, ktorá by mohla odhaliť ďalšie gény spolupodieľajúce sa na ťažšom klinickom obraze.



Obr. 2. Prahová tónová audiometria probandov s poruchou sluchu na podklade mutácií v géne *STRC*. Zobrazené sú spojené audiogramy pre vzdušné vedenie namerané pre pravé ucho (vľavo) a ľavé ucho (vpravo).

Záver

Podarilo sa nám zaviesť účinné a presné metódy schopné identifikovať patogénne varianty génu *STRC*. Výsledky potvrdili vysokú prevalenciu poruchy sluchu na podklade mutácií v géne *STRC* a širokú škálu zmien vyskytujúcich sa v tomto géne.

PodĎakovanie

Výskum bol podporený projektami VEGA 1/0572/21 a ITMS: 313021BZC9.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Nishio S. Y., Usami S. I. (2022) Sci. Rep. 12(1), p. 634
- [2] Vona B., Hofrichter M. A. H., Neuner C., et. al. (2015) Clin. Genet. 87, p. 49
- [3] Yokota Y., Moteki H., Nishio S., et al. (2019) Sci. Rep. 9, p. 4408
- [4] Verpy E., Masmoudi S., Zwaenepoel I., et. al. (2001) Nature Genetics. 29(3), p. 345
- [5] Francey L. J., Conlin L. K., Kadesch H. E., et. al. (2012) Am. J. Med. Genet. A. 158A(2), p. 298
- [6] Mandelker D., Schmidt R. J., Ankala A., et. al. (2016) Genet. Med. 18(12), p. 1282
- [7] Marková S. P., Brožková D. Š., Lašuthová P., et. al. (2018) Genet. Test Mol. Biomarkers. 22(2), p. 127
- [8] Carlson R. J., Walsh T., Mandell J. B., et. al. (2023) JAMA Otolaryngol. Head Neck Surg. 149(3), p. 212

Posudzovanie obvodových, hmotnostných charakteristík v súvislosti so sledovaním nadhmotnosti a obezity u detí

Nataliia Demesh¹, Eva Neščáková¹, Miriam Kirchmayerová², Lenka Vandáková², Silvia Bodoriková¹, Mária Fuchsová³, Eva Štefánková⁴

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra antropológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; natashademesh888@gmail.com;

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra telesnej výchovy, Mlynská dolina, Staré Grunty 36, 842 25 Bratislava, Slovenská republika

³Univerzita Komenského v Bratislave, Pedagogická fakulta, Katedra didaktiky prírodovedných predmetov v primárnom vzdelávaní, Račianska 59, 813 34 Bratislava, Slovenská republika

⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Klinika detskej chirurgie, Národný ústav detských chorôb, Limbová 1, 831 01 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Anthropometric characteristics of older school-age children and their use in clinical practice (Bratislava region)

The aim of this article is to analyze the values of waist circumference, Pignet index and recently developed A Body Shape Index in older school-age children. The goal is also an intersex comparison of individual age categories and a comparison of the studied group with the Slovak standard for evaluating the secular trend. The sample consisted of children (277 boys and 275 girls) aged eleven to fifteen. The gender differences in mean values of waist circumference were statistically significant in six and seven-year age categories, in the Pignet index in all age categories. Compared to the Slovak norm, we evaluated the differences in waist circumference as statistically significant in all age categories for both sexes. When evaluating the differences in the Pignet index, statistically significant differences were found in boys only at the ages of fourteen and fifteen, they were confirmed in girls in all age categories.

Keywords: growth; development; secular changes; obesity

Úvod a formulácia cieľa

Biologický rast a zrenie organizmu detí a mládeže sa systematicky študuje viac ako 160 rokov. Už od 19. storočia európske deti rástli a vyvíjali sa rýchlejšie, boli vyššie a skôr dospievali. Sekulárny trend sa môže charakterizovať ako zmena vzoru somatického vývoja detí určitej populácie v porovnaní s inou generáciou. Sekulárne trendy v Európe sú jasne spojené s industrializáciou a zmenami súvisiacimi so životným štýlom, preto sa tieto zmeny nevyskytli súčasne v rôznych európskych krajinách [1]. Miera rastu počas detstva sa za posledných 50 – 100 rokov značne zvýšila. Vo všetkých rozvinutých krajinách došlo k veľkému sekulárnemu zvýšeniu miery rastu a dozrievania. Na sekulárny trend rastu tela do výšky má vplyv zlepšená kvalita prostredia, zlepšená zdravotná starostlivosť a zlepšené podmienky výživy obyvateľstva. Tieto faktory sú vzájomne prepojené s tými, ktoré sa týkajú aj veľkosti rodiny a s genetickými

faktormi [2]. V európskych krajinách sa zvýšila telesná výška v rozmedzí 1 až 3 cm za desaťročie pri sledovaní výsledkov za posledné storočie [3]. Napriek tomu, zatiaľ čo všeobecná obezita je široko hodnotená pomocou indexu telesnej hmotnosti (BMI), podľa dobre známych kategórií Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) neexistuje v súčasnosti konsenzus o tom, ako najlepšie posúdiť abdominálnu adipozitu a rôzne antropometrické indexy zahŕňajúce obvod brucha. Body Shape Index (ABSI) bol však špeciálne navrhnutý ako nezávislý od BMI [8]. Krakauer a Krakauer (2012) zistili, že niektorí ľudia s normálnym BMI boli podľa ABSI ohrození na zdravie. Tento index poukazuje do akej miery je telesná hmotnosť tvorená svalmi a do akej miery ho tvorí tuk. Svaly sú ťažšie, ale menej objemné [9]. Sekulárne trendy rastu sa v mnohých rozvojových krajinách spomalili, zatiaľ čo prírastok hmotnosti pokračuje, čo vedie k nadváhe a obezite [6]. Výška sa od roku 1975 stabilizovala, ale hmotnosť sa zvyšuje a epidémia obezity v západnom svete rastie [3].

Cieľom tohto článku je analyzovať hodnoty obvodu brucha na posúdenie nadváhy, hodnoty Pignetovho indexu na posúdenie telesnej stavby a taktiež hodnoty nedávno vytvoreného Indexu tvaru tela na posúdenie abdominálnej obezity u detí staršieho školského veku. Cieľom je taktiež zistiť intersexuálne rozdiely v jednotlivých vekových kategóriách a porovnať výsledky sledovaného súboru so slovenskou normou na posúdenie sekulárneho trendu.

Materiál a metódy

Sledovaný súbor pozostával z 552 detí (275 chlapcov a 277 dievčat), ktoré boli rozdelené do piatich vekových kategórií, od 11 do 15 rokov, čo zodpovedá veku detí staršieho školského veku. Zber dát sa uskutočnil v základných školách v Bratislave v roku 2014–2020. V publikácii sme sa zamerali na jeden telesný rozmer a tri indexy telesných rozmerov. Pri zisťovaní telesnej výšky (cm), telesnej hmotnosti (kg), obvodu brucha (cm) a obvodu hrudníka (cm) sme postupovali podľa metodiky Martina a Sallera (1957). Obvod brucha sme merali vovýške pupka cez antropometrický bod *omphalion* v horizontálnej rovine pásovou mierou. Z nameraných údajov bol vypočítaný Pignetov index, Index tvaru tela (ABSI) a Index adiposity (BAI), na ktorých výpočet bol použitý nasledovný vzorec:

$$PI = \text{telesná výška (cm)} - [\text{obvod hrudníka (cm)} + \text{telesná hmotnosť (kg)}] \quad [\text{I.}]$$

$$ABSI = \text{obvod brucha (m)} * \text{telesná hmotnosť (kg)}^{-2/3} * \text{telesná výška (m)}^{5/6} \quad [\text{II.}]$$

$$BAI = (\text{obvod brucha (m)} / (\text{telesná výška (m)}^{1.5}) - 18 \quad [\text{III.}]$$

Na štatistické spracovanie sme použili funkcie MS Excel 2010, kde sme počítali základné štatistické charakteristiky ako aritmetický priemer a smerodajnú odchýlku.

Na stanovenie intersexuálnych rozdielov sme použili program IBM SPSS 20, kde sme na základe výsledkov normality dát použili adekvátne štatistické testy. Štatistickú významnosť sme hodnotili na hladine významnosti 0,05.

Výsledky a diskusia

Nadbytočný telesnej tuk okolo stredú predstavuje väčšie zdravotné riziko, ako telesný tuk v oblasti bokov a stehien. Ako uvádza Svačina (2010), riziko metabolických komplikácií, t. j. tendencia k centrálnemu typu obezity, je úmerné práve obvodu brucha. Ak je obvod brucha u detí väčší ako polovica telesnej výšky, môže byť jednotlivec v stave metabolického rizika, ak je naopak menší, jednotlivec by mal byť bez metabolického rizika [4]. Priemerné hodnoty obvodu brucha boli vyššie u chlapcov vo všetkých vekových kategóriách. Signifikantné intersexuálne rozdiely sú viditeľné v kategórii 11, 12 a 15-ročných ($p < 0,001$) (Tab.1). Príčinou vyššieho metabolického rizika, ako aj vyššieho výskytu obéznych chlapcov, môže byť že u dievčat tuk rozmiestnený po tele rovnomernejšie, zatiaľ čo u chlapcov sa nachádza najmä okolo pásu. Po vyhodnotení somatických parametrov v rámci intersexuálnych rozdielov, sme porovnali naše parametre so súborom Slováková et al. (1989) [10]. Pri porovnaní obvodu brucha s údajmi so slovenskou normou boli u oboch pohlaví vo všetkých vekových kategóriách zistené štatistiky významné rozdiely v priemerných hodnotách v prospech sledovaného súboru (Tab.2). To môže súvisieť s narastajúcou prevalenciou negatívnych zmien environmentálneho prostredia. Nadmerný príjem energeticky bohatej stravy nie je kompenzovaný adekvátnou fyzickou aktivitou. Aktívne formy trávenia voľného času nahrádza televízia, počítač a internet [12].

Medzi ukazovatele telesnej stavby sme zaradili Pignetov index. Priemerné hodnoty tohto indexu vo všetkých vekových kategóriách ako u dievčat tak aj u chlapcov klesali s vekom. Zaujímavé je to, že medzi hodnotami tohto indexu boli mínusové čísla. Štatistická významnosť sa nepotvrdila. Priemerné hodnoty Pignetovho indexu vo všetkých vekových kategóriách dievčat aj chlapcov v porovnaní so slovenskou normou boli nižšie a štatisticky významné vo všetkých vekových kategóriách ($p < 0,001$; Tab. 2). Znižovanie hodnôt Pignetovho indexu znamená mohutnenie tela, u obéznych sú hodnoty až negatívne. Index tvaru tela a Index adiposity u detí nebol na Slovensku ani v žiadnych iných krajinách doposiaľ hodnotený, z tohto dôvodu sme nemali súbor na porovnanie.

Na prekonanie nedostatkov BMI (Krakauer a Krakauer, 2012) prišli s indexom telesného tvaru (ABSI) na základe obvodu pásu, BMI a telesnej výšky. Je však pokročilejší, lebo rozlišuje dobré a zlé rozloženie telesného tuku. BMI dáva do súvisu výšku a hmotnosť,

ale nepoukazuje na to, kde na tele sa hmotnosť sústreďuje [8]. Pri porovnávaní priemerných hodnôt Indexu tvaru tela (ABSI) sme pozorovali vyššie hodnoty u chlapcov vo všetkých vekových kategóriách. Štatistická významnosť sa potvrdila u 11-ročných ($p < 0,001$), 13-ročných (0,019) a 15-ročných ($p < 0,001$; Tab.1). Zvýšená hodnota sledovaného indexu vypovedá o zvýšenom podiele viscerálneho tuku v abdominálnej oblasti v porovnaní s periférnym tkanivom a taktiež o zvýšenom riziku vzniku kardiometabolických komplikácií. Chlapci majú vyšší index, lebo akurát v takom období dochádza k intervencia dievčat. Dievčatá o seba začínajú viac dbať, strážia si telesnú hmotnosť, čo má práve v tomto veku často za následok rozvoj porúch príjmu potravy [5] .

Tab. 1. Telesné rozmery a indexy telesných rozmerov sledovaného súboru

Legenda: N – počet probandov, x – aritmetický priemer, SD – smerodajná odchýlka, p – štatistická významnosť, OB – obvod brucha, PI – Pignetov index, ABSI – Index tvaru tela, BAI-Index adiposity

Sledovaný súbor						
Vek (rok)		Chlapci		Dievčatá		p
		x	SD	x	SD	
N = 61				N = 57		
11	OB	72,29	8,84	68,68	8,65	0,021
	PI	31,74	12,77	33,75	12,92	0,397
	ABSI	85,27	13,98	72,89	14,48	< 0,001
	BAI	25,91	3,45	25,51	3,72	0,504
N = 63				N = 57		
12	OB	82,10	5,94	70,86	9,07	< 0,001
	PI	34,66	10,34	31,22	11,06	0,080
	ABSI	85,29	15,46	80,52	18,21	0,126
	BAI	24,32	2,84	25,51	3,30	0,004
N = 47				N = 47		
13	OB	74,83	9,30	73,87	4,84	0,532
	PI	31,11	14,24	27,97	8,04	0,192
	ABSI	104,51	19,81	95,53	16,64	0,019
	BAI	23,19	3,26	25,75	3,36	< 0,001
N = 43				N = 56		
14	OB	76,58	8,86	73,81	7,59	0,104
	PI	23,54	17,00	23,68	10,33	0,962
	ABSI	116,39	24,35	97,70	2,58	< 0,001
	BAI	23,16	4,48	24,90	4,62	0,064
N = 60				N = 42		
15	OB	78,99	8,34	75,90	6,06	0,032
	PI	20,54	22,10	24,77	13,16	0,232
	ABSI	132,07	28,02	108,06	18,52	< 0,001
	BAI	22,51	4,45	25,97	3,60	< 0,001

V roku 2011 bol navrhnutý index založený na antropometrických meraniach na hodnotenie percenta telesného tuku (BF) u dospelých. Index adipozity – (BAI) využíva meranie obvodu bokov a telesnú výšku, ukázal sa ako praktický, jednoduchý, rýchly a nenáročný. Výhody metódy z nej robia zaujímavú alternatívu k laboratórnym metódam na hodnotenie zloženia tela v epidemiologických štúdiách alebo klinickej praxi, najmä na identifikáciu nadváhy alebo obezity u ľudí so sedavým životným štýlom [9]. V našom súbore u chlapcov môžeme sledovať, že s vekom sa hodnoty znižujú. Štatistická významnosť sa potvrdila u 12-ročných ($p = 0,004$), 13-ročných ($< 0,001$) a 15-ročných ($< 0,001$; Tab. 1). Príčinou takého výsledku je že v nástupe pubertálnej rastovej akcelerácie dochádza u chlapcov k znateľnému úbytku podkožnej tukovej vrstvy, stávajú sa štíhlejšími a postava sa formuje mužským smerom, čo sa prejaví hlavne rozšírením ramien. Dĺžka rastového obdobia je u chlapcov dlhšia a dosahujú vyššiu výšku v porovnaní s dievčatami. Pre dievčat v tomto vekovom rozmedzí už došlo k realizácii zmien asociovaných s pubertou a redistribúcia tukového tkaniva odpovedá typickému vzoru rozloženia tuku dospeléj ženy [8].

Tab. 2. Porovnanie telesného rozmeru a indexu sledovaného súboru so slovenskou normou
 Legenda: N – počet probandov, x – aritmetický priemer, SD – smerodajná odchýlka, p – štatistická významnosť,
 OB – obvod brucha (cm), PI – Pignetov index

Chlapci							Dievčatá				
Vek (roky)		Sledovaný súbor		Slováková et al. (1989)		p	Sledovaný súbor		Slováková et al. (1989)		p
		x	SD	x	SD		x	SD	x	SD	
		N = 61		N = 95			N = 57		N = 56		
11	OB	72,29	8,84	63,36	6,91	1,107	68,68	8,65	62,06	7,72	< 0,001
	PI	31,74	12,7	40,59	9,56	< 0,001	33,75	12,92	40,57	9,61	< 0,001
		N = 63		N = 57			N = 57		N = 48		
12	OB	82,10	5,94	65,53	6,5	0	70,86	9,07	64,83	7,22	< 0,001
	PI	34,66	10,34	37,90	8,78	0,066	34,22	11,06	40,82	10,82	< 0,001
		N = 47		N = 46			N = 47		N = 59		
13	OB	74,83	9,30	67,95	7,62	< 0,001	73,87	4,84	66,69	5,61	1,904
	PI	31,11	14,24	36,00	11,72	0,073	27,97	8,04	41,19	9,06	2,547
		N = 43		N = 44			N = 56		N = 42		
14	OB	76,58	8,86	70,69	6,72	< 0,001	73,81	7,59	71,22	6,91	0,08
	PI	23,54	17,00	33,23	10,17	< 0,001	23,68	10,33	32,51	8,14	< 0,001
		N = 60		N = 40			N = 42		N = 44		
15	OB	78,99	8,34	71,69	5,02	3,694	75,90	6,06	73,49	7,13	0,094
	PI	20,54	22,10	32,39	10,09	< 0,001	24,77	13,16	29,25	11,76	0,105

Záver

Pri porovnaní intersexuálnych rozdielov sledovaného súboru so súborom (1989) vidíme, že terajšie deti staršieho veku majú vyššie hodnoty obvodu brucha. Pignetovom indexe

sme zistili znižovanie hodnôt, u niektorých detí tento index mal mínusové hodnoty. Tento index môžeme považovať za vhodný pri diagnostike obezity a nadhmotnosti. Výsledky nášho výskumu potvrdzujú sekulárny trend zvyšovania telesnej hmotnosti, ktorá silne koreluje so zväčšovaním obvodových mier a so vzrastajúcou mierou celkovej, či konkrétne abdominálnej formy obezity. Nepriaznivý je zrýchlený nárast hodnôt telesnej hmotnosti pri spomaľovaní rastu, čo sa zákonite prejavilo vo významnom náraste priemerných hodnôt vo všetkých vekových skupinách chlapcov i dievčat a taktiež vo vyšších obvodových mierach. V dobe celosvetového nárastu prevalence nadváhy a obezity tak prispieva k riešeniu problému s absentujúcimi aktuálnymi údajmi potrebnými na hodnotenie zdravotného stavu v pediatrickej praxi.

PodĎakovanie

Ďakujeme vedeniu základných škôl (ZŠ Turnianska-Petržalka, a Spojená škola Tilgnerova) v Bratislave a lekárom ambulancii v Podunajských Biskupiciach vďaka ktorým bolo možné vytvoriť tento príspevok.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Gerová M., Nižňanská M., Korbel M., et al. (2008) Praktická Gynekologie. 12 (1), p. 22
- [2] Roche A. F. (1979) Secular trends in human growth, maturation, and development. Monographs of the Society for Research in Child Development. 44 (3-4), p. 1
- [3] Cole T. J. (2000) Proc. Nutr. Soc., 5 (2), p. 317
- [4] Svačina Š. (2000) Obezita a diabetes. Praha, Maxdorf, 307 s.
- [5] Papežová H. (2000) Anorexia nervosa. Psychiatrické centrum, Praha
- [6] Malina R. M. (2004) Przegląd Antropologiczny – Anthropological Review. 67, p. 3
- [7] Krakauer N. Y., Krakauer J. C. (2012) PLoS One. 7(7), p. 1
- [8] Riegerová J., Přidalová M., Ulbrichová M. (2006) Aplikácia fyzickej antropológie v telesnej výchove a športe: (príručka funkčnej antropológie), Hanex, Olomouc, p. 88
- [9] Cerqueira M. S., Santos C. A. D., Silva D. A. S., et al. (2018) Advances in nutrition (Bethesda, Md.), 9(5), p. 617
- [10] Slováková E., Netriová Y., Potočný V., et al. (1989) Antropometria detí a mládeže a jeho využitie v pediatrickej praxi. Ústav zdravotnej výchovy, Bratislava, p. 33
- [11] Kocková N. (2011) Vychovávateľ. 7-8(63), p. 42

Optimalizácia metódy pre izoláciu extracelulárnych vezikúl z plazmy

Miroslav Dolník¹, Eva Petrovčíková², Alexandra Kondelová², Ján Jurčík², Ivan Juráš²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
miroslavdolnik01@gmail.com

²Lambda Life a.s., Levočská 3617/3, 851 01 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Optimization of method for isolation of extracellular vesicles from the plasma

Liquid biopsy represents a less invasive technique in personalized medicine and oncology. It is used to detect cancer-derived components which include extracellular vesicles (EVs). EVs are lipid membrane-bound structures produced by all the cells in the body and released to extracellular space. Components of EVs can be used as biomarkers for the detection of cancer or other diseases while reflecting the phenotypic state of the cell of origin that can differ among the physiological or pathological state of the cell and between different cell types. Proper isolation and analysis of plasma EVs are still challenging. In our study, we present different approaches for EVs preparation from plasma in combination with Imaging Flow Cytometry and fluorochromes. Our data manifest that we achieved a higher concentration of EVs in the sample with the Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit. We were able to identify 3-6 times more EVs in 1 ml of the sample by Amicon opposite to the TFF-Easy filter.

Keywords: extracellular vesicles; EVs; Imaging Flow Cytometry; SEC chromatography

Úvod a formulácia cieľa

Extracelulárne vezikuly (EV) sú fosfolipidovou membránou ohraničené častice produkované všetkými bunkami v ľudskom tele a uvoľňované do extracelulárneho priestoru za fyziologických aj patologických podmienok. Predstavujú veľmi heterogénnu skupinu častíc, ktorých jednou z dnes známych funkcií je zabezpečovať komunikáciu medzi bunkami, a to aj doručovaním svojho obsahu bioaktívnych molekúl (karga) do cieľovej bunky. Podľa mechanizmu vzniku ich možno rozdeliť na apoptotické telieska (50-5000 nm), mikrovezikuly (100-1000 nm) a exozómy (30-150 nm). Podľa veľkosti je možné rozdeliť EV na „malé“ EV (sEV) a „stredné/veľké EV“ (m/l EV), pričom rozsahy sú definované pre malé EV < 100 nm alebo < 200 nm a pre stredné/veľké EV > 200 nm. EV a ich obsah sú zložené z proteínov, lipidov a nukleových kyselín [1, 2]. Unikátna skladba EV umožňuje, aby boli použité ako biomarkery pri rôznych chorobných stavoch vrátane onkologických chorôb. V onkológii sa použitie zameriava na včasnú detekciu a diagnostiku, prognózu pacienta s onkologickým ochorením, výber a stratifikáciu liečby, sledovanie účinkov liečby, ako aj sledovanie minimálnej reziduálnej choroby [3, 4].

Pre klinické využitie v onkológii solídnych nádorov sa vyvíjajú metódy, pomocou ktorých sa sleduje expresia proteínov na povrchu EV s úmyslom identifikovať bioaktívne

molekuly ovplyvňujúce správanie cieľových buniek alebo spojitosť EV s bunkami nádoru. Tiež sa vyvíjajú metódy na analýzu obsahu EV, ktorý môže byť potenciálnym faktorom účinku na cieľové bunky. Pre vývoj týchto metód je kľúčové získať EV z patientskej plazmy s čo najmenšími stratami a v čo najvyššej čistote [2].

Zlatým štandardom v oblasti izolácie EV je ultracentrifugácia, ktorá vyžaduje nákladné prístrojové vybavenie a je časovo náročná. V poslednom čase sa viac do popredia dostáva vylučovacia chromatografia podľa veľkosti (z angl. size exclusion chromatography) (SEC) [1, 2], ktorá je menej nákladná, rýchla, s relatívne solídnymi ziskami a čistotou izolátu EV z plazmy [5].

Prietoková cytometria sa používa na kvantifikáciu a fenotypizáciu častíc v suspenzii. Bežne používané prietokové cytometre majú ťažkosti odlíšiť EV od pozadia, preto bolo prelomovým nedávne vyvinutie zobrazovacej prietokovej cytometrie na identifikáciu a analýzu jednotlivých EV [6].

V našej práci sme sa rozhodli používať SEC na izoláciu EV z plazmy, pretože je to lacnejšia a menej časovo náročná alternatíva k ultracentrifugácii. Pri izolácii EV z plazmy sme použili kolónu maxiPURE-EV (Hansa BioMed, Estonia), ktorá produkuje nariedený izolát EV (15 ml), a ten je potrebné pre analýzu zobrazovacou prietokovou cytometriou predtým zakoncentrovať. Cieľom tejto práce bolo porovnanie dvoch metód koncentrácie EV, tangenciálnej prietokovej filtrácie (z angl. tangential flow filtration – TFF) a ultrafiltrácie. Na TFF sme použili TFF-Easy filter (Hansa BioMed, Estonia) a na ultrafiltráciu Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit, 10 KDa (Merck, SRN). Koncentrované vzorky EV sme analyzovali pomocou markera pre EV (CD81) za použitia zobrazovacej prietokovej cytometrie (Imagestream Amnis MKII, Luminex, USA).

Materiál a metódy

Extracelulárne vezikuly (EV) boli izolované z 10 ml periférnej krvi zdravého dobrovoľníka odobratej venepunkciou do vákuovanej skúmavky BD Vacutainer s K₂EDTA (Becton, Dickinson and Company, USA). Plazma použitá na izoláciu EV bola získaná diferenciálnou centrifugáciou. Krv v objeme 10 ml sa centrifugovala 10 min / 300 x g na oddelenie buniek od plazmy. Odobratá plazma sa ďalej centrifugovala 20 min / 5 000 x g na oddelenie zvyškových častíc buniek a apoptotických teliesok od EV. Po centrifugácii sa odobral supernatant nachádzajúci sa nad vytvoreným peletom, ktorý sa centrifugoval 30 min / 16 000 x g na oddelenie väčších EV od menších, pričom väčšie EV vytvorili pelet a menšie EV tvorili supernatant, ktorý sa ďalej analyzoval.

Supernatant, ktorý obsahoval menšie EV bol nariadený roztokom 0,1 µm filtrovaného 1x PBS do objemu 20 ml a naniesol sa na povrch vopred premytej maxiPURE-EV kolóny 0,1 µm filtrovaným 1x PBS podľa postupu od výrobcu. Počas celého experimentu sme používali iba 1x PBS filtrovaný cez 0,1 µm filter (PBS). Po nanesení na kolónu sa najprv zbierala frakcia mŕtveho objemu 15 ml, ktorá sa zahodila. Nasledovala elúcia frakcie EV v objeme 15 ml.

Na použitie v ďalších analýzach EV je potrebné vzorku zakoncentrovať. Na porovnanie efektivity koncentrovania vzorky izolovaných EV sme zvolili metódu TFF (TFF-Easy filter) a ultrafiltráciu (Amicon Ultra-15 10kDA). Pri zakoncentrovaní pomocou TFF-Easy filtra sme postupovali podľa manuálu od výrobcu. Na filter sme naniesli 15 ml izolátu EV pomocou striekačky. Konečný objem, do ktorého sme pomocou TFF izolát EV zakoncentrovali bol 1 ml. Pri použití koncentrátora Amicon Ultra-15 10 kDa sme postupovali podľa manuálu od výrobcu. Izolát EV v objeme 15 ml sa naniesol na filter a skúmavka Amicon sa centrifugovala 20 min / 4000 x g. Výsledný zakoncentrovaný objem EV bol 1 ml.

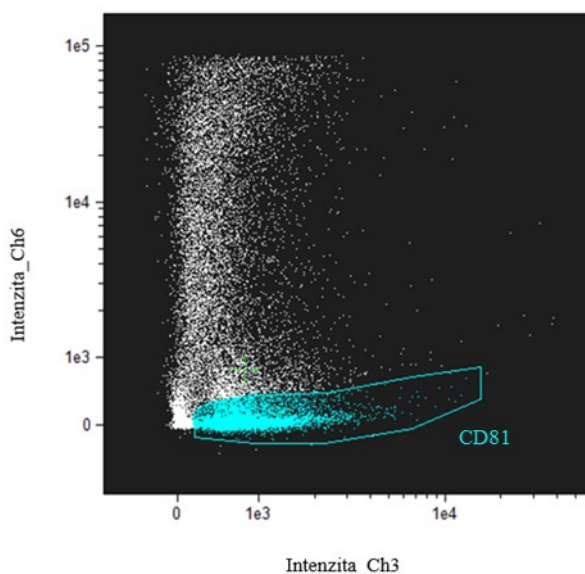
Takto pripravené vzorky zakoncentrovaných EV sa analyzovali zobrazovacou prietokovou cytometriou za použitia protilátky proti EV markeru CD81, ktorá je značená fluorescenčne s fykoerytrínom (PE) (ThermoFisher, USA). Okrem vzorky EV s CD81-PE sme pripravili tiež kontrolné vzorky EV s CD81-PE + 0,1 % Tritonom X-100 (Merck, SRN), kontrola protilátky CD81-PE v PBS a samotný roztok PBS. Farbenie vzoriek a kontrol s 10x CD81-PE prebiehalo 1h v tme pri izbovej teplote. Triton X-100 sa pridával do kontrolnej vzorky po 45 minútach inkubácie s CD81-PE. Zo všetkých vzoriek a kontrol boli pripravené riedenia 10x, 20x, 40x s roztokom PBS. Ofarbené vzorky izolovaných EV a kontrolné vzorky boli analyzované pomocou zobrazovacej prietokovej cytometrie na prietokovom cytometri Amnis ImageStream X Mk II. pri týchto nastaveniach: 488 nm laser nastavený na 400 mW; SSC (side scatter) nastavený na 10 mW v kanáli 6; zväčšenie nastavené na 60x; zapnutý high gain mód; rýchlosť prietoku nízka / citlivosť vysoká. Fluorofór PE protilátky CD81 sme detegovali v kanáli 3 (Ch3). Dáta boli spracované a vyhodnotené pomocou softvéru IDEAS 6.3 (Luminex, USA).

Výsledky a diskusia

Extracelulárne vezikuly (EV) sú štruktúry, ktorých veľkosť sa pohybuje v nanometroch. Sú uvoľňované z buniek do prostredia, kde slúžia na komunikáciu medzi bunkami prostredníctvom doručovania svojho obsahu. V poslednej dobe sa čoraz viac využívajú ako biomarkery v diagnostike rôznych ochorení, pretože v komunikácii buniek

a tým aj v patologických procesoch majú významnú úlohu [1]. Medzinárodná spoločnosť pre extracelulárne vezikuly poskytla minimálne informácie na štúdium EV (MISEV2018), ktoré zhrnula v článku, v ktorom informuje o rôznych spôsoboch izolácie a analýzy EV a jeho obsahu [2].

V našej práci sme sa rozhodli optimalizovať proces prípravy izolátu EV z plazmy. EV boli izolované z 10 ml krvi zdravého dobrovoľníka. Plazma bola získaná diferenciálnou centrifugáciou, EV boli naizolované pomocou SEC kolóny a zakoncentrované do výsledného objemu 1 ml, buď metódou TFF alebo ultrafiltráciou. Prítomnosť EV vo výslednej vzorke bola dokázaná pomocou EV markera tetraspanínu CD81-PE za použitia zobrazovacej prietokovej cytometrie. Na obrázku 1 môžete vidieť dot-blot graf s nameranými údajmi a zobrazením EV v kanáli CD81 (Obr. 1).



Obr. 1. Závislosť intenzity fluorescence v kanáli 3 (CD81) od intenzity fluorescence v kanáli 6. Na obrázku je zobrazený graf závislosti intenzity fluorescence v kanáli 3 (CD81) od intenzity fluorescence v kanáli 6, ktorý sa používa ako SSC (side scatter). Kanál CD81 zobrazený na obrázku označuje malé EV. Ich veľkosť je určená pomocou SSC a pozitivita na EV marker je určená intenzitou v kanáli 3. (Vytvorené a upravené pomocou softvéru IDEAS 6.3 Luminex).

Stredná hodnota intenzity fluorescence v kanáli CD81 (kanál 3) by pri všetkých riedeniach mala zostať pre jednotlivé detegované objekty približne rovnaká (zlepené zhľuky EV sú z merania vylúčené). Pri vzorkách zakoncentrovaných pomocou TFF boli hodnoty strednej intenzity fluorescence v kanáli CD81 pri riedení vzorky 10x 905, pri riedení 20x 852 pri riedení 40x 946. Pri vzorkách zakoncentrovaných pomocou ultrafiltrácie boli hodnoty strednej intenzity fluorescence v kanáli CD81 pri riedení vzorky 10x 948 pri riedení 20x 1000

pri riedení 40x 1027. Zároveň je v tabuľke 1 a 2 ukázané, že koncentrácia EV vo vzorke by mala klesať s každým riedením. Ako ďalšia kontrola slúži vzorka inkubovaná s 0,1 % Triton X-100, ktorý by mal rozrušiť väčšinu EV a preto vzorky, ktoré obsahujú Triton X-100 by mali obsahovať menej objektov ako vzorky obsahujúce len EV s protilátkou. Poslednou kontrolou je samotná protilátka v roztoku PBS, ktorej kryštály veľkosťou spadajú do kanálu CD81 rovnako ako EV, pričom je potrebné používať protilátky s čo najmenším pozadím (Tab. 1, Tab. 2). Autori Welsh a kol. uvádzajú ako by sa mali štandardizovane vykonávať experimenty s EV a prietokovou cytometriou [7].

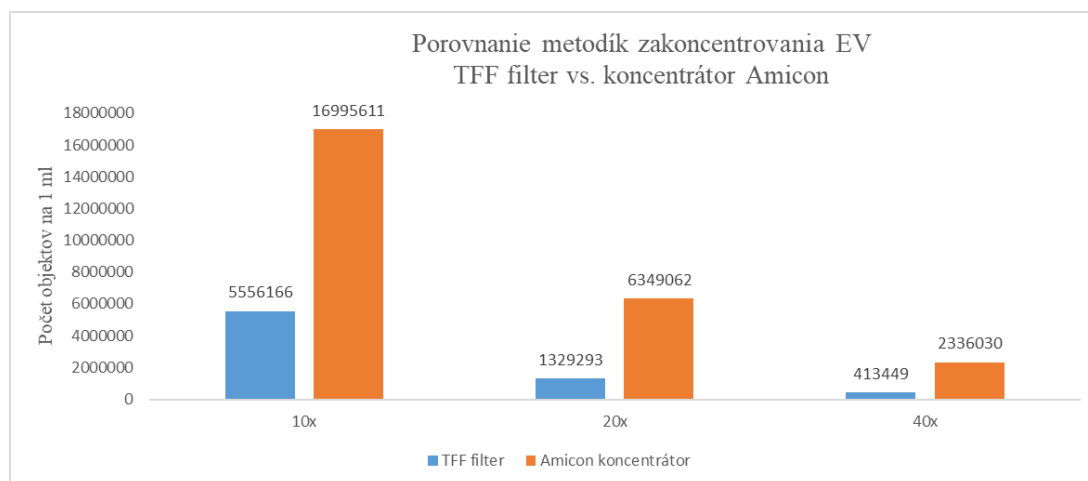
Tab. 1. Počet objektov na 1 ml v kanáli CD81 pri vzorkách zakoncentrovaných pomocou TFF filtra.
V tabuľke sú uvedené hodnoty koncentrácií (počet objektov na ml) vzoriek a kontrol v kanáli CD81 u vzoriek EV, ktoré boli zakoncentrované pomocou TFF filtra.

Vzorka	Riedenia		
	10x	20x	40x
EV+CD81-PE	5 556 166	1 329 293	413 449
EV+CD81-PE+Triton X-100	624 621	256 317	129 482
CD81-PE	102 162	28 374	8 867
PBS	0	0	0

Tab. 2. Počet objektov na 1 ml v kanáli CD81 pri vzorkách zakoncentrovaných pomocou koncentrátora Amicon. V tabuľke sú uvedené hodnoty koncentrácií (počet objektov na ml) vzoriek a kontrol v kanáli CD81 u vzoriek EV, ktoré boli zakoncentrované pomocou Amicon koncentrátora.

Vzorka	Riedenia		
	10x	20x	40x
EV+CD81-PE	16 995 611	6 349 062	2 336 030
EV+CD81-PE+Triton X-100	3 419 034	1 346 611	582 222
CD81-PE	228 437	69 004	25 989
PBS	0	0	0

Na základe výsledkov porovnania počtu objektov v kanáli CD81 vo vzorkách EV farbených EV markerom (CD81) sme zhodnotili, že vhodnejšou metodikou na zakoncentrovanie EV po ich izolácii na kolóne maxiPURE je ultrafiltrácia v porovnaní s TFF, pretože je účinnejšia. V závislosti od riedenia bol počet objektov EV pre ultrafiltráciu vyšší 3-6 x v porovnaní s TFF (Obr. 2).



Obr. 2. Porovnanie TFF filtra a koncentrátora Amicon.

Záver

Z 10 ml krvi zdravého dobrovoľníka sme úspešne vyizolovali a analyzovali extracelulárne vezikuly. Výsledky našej práce ukázali, že vhodnejšou metódou pre zakoncentrovanie vzorky po SEC chromatografii je použitie ultrafiltrácie, ktorá umožňuje získať niekoľkonásobne väčšie počty EV ako TFF. Získané poznatky sú základom pre ďalšiu optimalizáciu a zlepšenie prípravy vzoriek pre downstream analýzy EV.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Integratívna stratégia v rozvoji personalizovanej medicíny vybraných zhubných nádorových ochorení a jej vplyv na kvalitu života (Kód projektu v ITMS 2014+: 313011V446), spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Doyle L. M., Wang M. Z. (2019) Cells. 8(7), p. 727
- [2] Théry C., Witwer K. W., Aikawa E., et al. (2018) J. Extracell Vesicles. 7(1), p. 1535750
- [3] Macías M., Alegre E., Díaz-Lagares A., et al. (2018) Adv. Clin. Chem. 83, p. 73
- [4] Martins I., Ribeiro I. P., Jorge J., et al. (2021) Genes (Basel). 12(3), p. 349
- [5] Baranyai T., Herczeg K., Onódi Z., et al. (2015) PLoS One. 10(12), e0145686
- [6] Woud W. W., van der Pol E., Mul E., et al. (2022) Commun Biol. 5(1), p. 633
- [7] Welsh J. A., Van Der Pol E., Arkesteijn G. J. A., et al. (2020) J. Extracell Vesicl. 9(1), p. 1713526

Influence of adaptation of influenza A viruses on the immune response in the spleens of infected mice

Karin Donátová^{1,2}, Miriam Mladá², Viktória Zezulová², Jana Jakubíková³,
Tatiana Betáková^{1,2}

¹*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Microbiology and Virology; Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak republic; donatova3@uniba.sk*

²*Biomedical Research Center of Slovak Academy of Sciences, v. v. i., Institute of Virology, Department of Viral Immunology, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovak republic*

³*Biomedical Research Center of Slovak Academy of Sciences, v. v. i., Cancer Research Institute, Department of tumorimmunology, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovak republic*

Abstract

Influenza viruses (IVs) cause acute respiratory infections in local outbreaks, seasonal epidemics, or sporadic pandemics. Approximately 10% of the world's population is infected by influenza viruses annually, making it one of the major global threats. The severity and clinical course of influenza infection are determined by direct infection of the respiratory epithelium combined with the effects of inflammation as a result of an immune response. Even though, IV is primarily considered a respiratory pathogen, various reports suggest that IV is frequently associated with a number of clinical syndromes that involve organ systems outside the respiratory tract. Upon detection of IV, host immune system aims to clear the viral infection. Non-structural protein 1 (NS1) of IV inhibits host immune defenses through various mechanisms, thus contributing to efficient viral replication. The aim of this study is to analyse the dissemination of IV to the spleen of infected mice, and investigate the influence of NS1 protein on activation of immune response.

Keywords: *influenza A virus; NS1 protein; immune system; T cell; macrophage*

Introduction and Objectives

The influenza A virus (IAV) is a leading cause of respiratory illnesses in humans, with the most severe cases occurring in young and elderly individuals [1]. Although IAV is primarily recognized as a respiratory pathogen, it can also lead to a wide range of non-pulmonary complications, affecting the heart, brain, spleen, and other organs [2].

The innate immune system is comprised of various phagocytic cells, cytokines, and IFN-stimulated genes, which provide the first line of defense against IAV infection. Adaptive immunity is mediated by T cells and B cells following exposure to a specific antigen [3]. T cells include CD4⁺ T cells which differentiate into T helper (Th) cells, and CD8⁺ T cells which differentiate into cytotoxic T lymphocytes (CTLs). Furthermore, Th cells are divided into several distinct subsets: Th1, Th2, Th9, Th17, T-follicular helper (Tfh), and T-regulatory (Treg) cells [4]. Research has shown that Th1 cells mediate cellular immune responses against intracellular viruses and bacteria through the activation of macrophages and CTLs. In contrast,

Th2 cells mediate humoral immune responses by promoting B-cell proliferation, differentiation, maturation, and the production of antibodies [5]. The signature cytokines produced by the Th1 subset are IFN- γ , IL-2, and IL-10, whereas Th2 cytokines include IL-4, IL-5, and IL-13 [4].

The non-structural NS1 protein of IAV inhibits host antiviral defenses, contributing to efficient viral replication. It possesses plenty of strategies to inhibit the host immune response on multiple levels. Evidence has shown that NS1 counteracts several components of the RIG-I-like signaling pathway (e.g. IRF-3) to efficiently suppress IFN synthesis [6]. This study aimed to analyse the dissemination of IAV to distant organs, specifically to the spleens of mice infected with adapted and non-adapted IAV strains. Additionally, the activation of an innate and adaptive immune response in the infected organs was observed.

Materials and methods

Viruses: We used human influenza A strain A/WSN/33 (H1N1) and NS80 (NS1-truncated virus; deletion mutant of A/WSN/33 lacking C-terminal and effector domain of NS1 protein), which were prepared by using reverse genetics system. We also used adapted strains of respective viruses: WSN ad, NS80 ad. The adapted viruses were obtained by serial passage of the virus from lung to lung of Balb/c mice.

Cell lines: Adherent epithelial Vero cells (ATCC® CCL-81™) were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and maintained in 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

Experimental animals: As a susceptible *in vivo* model we used 4 weeks old female inbred line of white laboratory Balb/c mice (Dobrá Voda).

Balb/c mice infection: Anaesthetised mice were intranasally inoculated with either lethal dose (LD₁₀₀) or non-lethal dose (LD₀) of WSN, WSN ad, NS80, or NS80 ad. Three days post infection, the spleens, lungs, and hearts were dissected and homogenised in PBS.

Determination of virus titer: Virus titer in the organ homogenates were determined by ELISA assay on Vero cells.

Semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT PCR): Total RNA from the spleens was extracted using the SV Total RNA Isolation System (Promega). A total of 400 ng/ μ l RNA was reverse transcribed using random hexanucleotide primers and the MuLV reverse transcriptase (Finnzyme; Thermo Fisher Scientific). The mRNA levels of selected genes were detected by semi-quantitative RT-PCR. The sequences of primers targeting

β -actin, M2, RIG-I, MDA-5, NF- κ B, IRF3, IRF7, IRF4, T-bet, GATA-3, IL-2, and IL-4 were previously described [7, 8].

Flow cytometry: After organ homogenization, ACK lysis buffer was added to ensure the lysis of red blood cells. Subsequently, PBS was added, and cell suspension was centrifuged at 1100 rpm for 30 minutes at 22°C. The supernatant was removed, and remaining pellet was resuspended in PBS, and centrifuged at 870 rpm for 10 minutes at 22 °C. Then, 1×10^6 cells per sample were resuspended in PBS and Fc block reagent was added to each sample. Cells were then stained with mixture of immunophenotyping antibodies: Rat anti-mouse CD4 (BioLegend), anti-mouse IL-23R (BioLegend), anti-mouse CD193 (CCR3) (BioLegend), anti-h/m IL-12R β 2 (R&D Systems). After staining, FACS buffer was added, and cells were centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes at 4°C. Obtained pellet was then resuspended in PBS. Data was acquired with a BD FACS Aria II SORP UV flow cytometer.

Results and discussion

To identify the course of viral replication of adapted viruses (WSN-ad, NS80-ad) and non-adapted viruses (WSN, NS80) we determined the growth curve of each virus. Firstly, Vero cells were infected with respective viruses with constant MOI (0,1). The virus titer was determined by ELISA at 0-, 24-, 48-, and 72-hours post-infection. The highest viral titers were observed 48 hours post-infection, in the cells infected with WSN and NS80-ad. On the other hand, the replication of non-adapted NS80 was significantly lower compared to other viruses. These results show that non-adapted NS80 retains its attenuated properties. However, the viral titer of NS80-ad was equal to the one of WSN, which indicates that after adaptation, the NS80 is no longer attenuated (Fig.1).

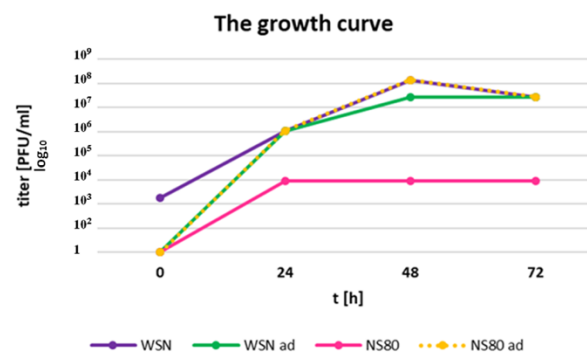


Fig. 1. The growth curve of viruses WSN, WSN-ad, NS80, and NS80-ad. Confluent monolayers of Vero cells were infected with viruses at an MOI of 0.1 and incubated at 37°C. At different time points (0-, 24-, 48-, and 72-hours post-infection), virus titer in culture medium was determined by ELISA on Vero cells.

To determine the dissemination of influenza virus, female Balb/c mice were intranasally infected with viruses WSN, NS80, WSN-ad, and NS80-ad (LD_{100}). Three days post infection, the infected mice developed various symptoms including ruffled fur, lethargy, and rapid weight loss. Dissected spleens did not show any macroscopic changes or visible signs of pathology. The virus titer was established in the organ homogenates by ELISA method. We detected the virus titer in the lungs of mice infected with LD_{100} as well as LD_0 of respective viruses. Regarding spleens, the virus titer was observed in the mice infected with LD_{100} of respective viruses. The presence of the virus was also detected by RT-PCR, using primers targeting gene M, which encodes viral proteins M1 and M2. The highest expression levels of M2 mRNA were observed in the spleens of mice infected with LD_{100} of WSN and NS80-ad (Fig. 2).

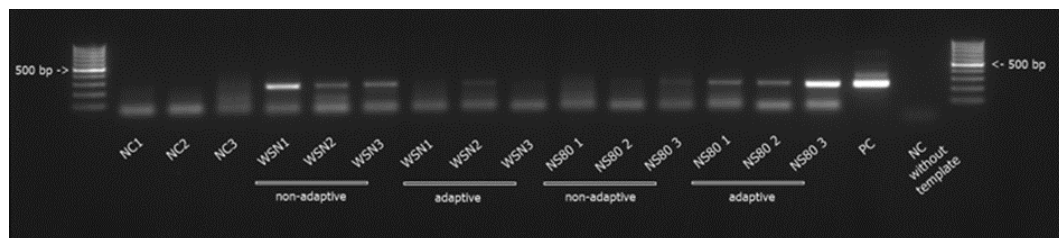


Fig. 2. The expression levels of M2 mRNA in the spleens of mice infected with LD_{100} of WSN, NS80, WSN-ad, and NS80-ad. NC1-NC3 represent non-infected mice.

To study the immunological factors associated with IAV infection, the immune response in mice infected with control WSN and attenuated NS80 was compared. Our results showed that NS80 virus activated RIG-I-like receptor signaling pathway more efficiently than control WSN virus. The expression of RIG-I, IRF-3, NF- κ B mRNA was increased in the mice infected with NS80 in comparison to WSN. To determine the induced subsets of $CD4^+$ T cells and distinguish the classically activated macrophages (M1) from alternative activated macrophages (M2) in the infected spleens, we have compared the transcription profiles of their specific markers and cytokines, as well as expression of specific markers on the cell surface. The mRNA levels of M1 markers CD38, Gpr18 and M2 markers Egr2, and Agr1 were significantly increased in mice infected with LD_{100} of WSN and WSN-ad. The expression of Th1 regulator T-bet was similar in the mice infected with WSN and NS80 viruses. Compared to negative control, the expression of T-bet was notably higher (Fig. 3A). The expression of Th1 cytokine IL-2 was significantly higher in WSN-ad, as well as NS80-ad (Fig. 3B). The level of Th2 regulator GATA-3 mRNA was significantly increased in mice infected with NS80-ad (Fig. 3C). The highest level of Th2 cytokine IL-4 was observed in mice infected with non-adapted WSN (Fig. 3D).

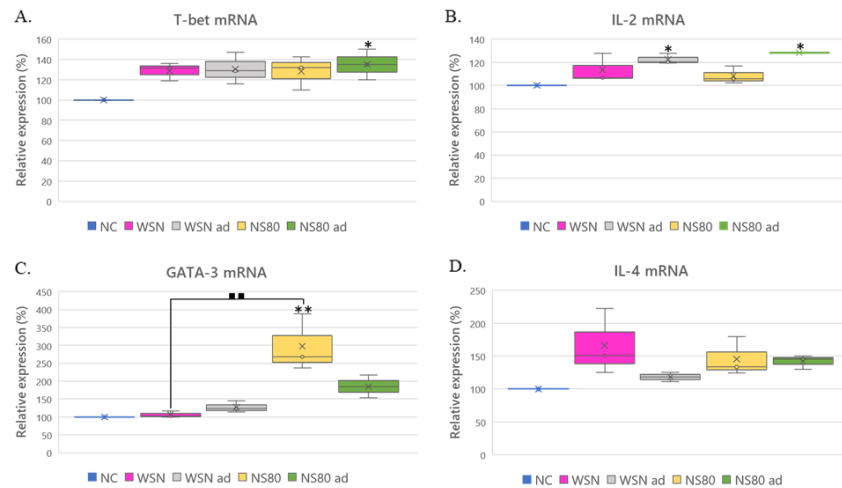


Fig. 3. Induction of Th1 and Th2 response in spleens of Balb/c mice infected with LD₁₀₀ of WSN, WSN-ad, NS80, and NS80-ad.

Using flow cytometry, we determined the subpopulations of T cells in organ homogenates, specifically Th (CD4⁺) cells, which play a major role in adaptive immune response to IAV. Based on the surface expression of markers IL-12Rb2⁺(Th1) and CCR3⁺(Th2), we managed to distinguish Th1 and Th2 subsets of CD4⁺ T cells. We also distinguished M1 and M2 macrophages based on the surface expression of markers CD68⁺(M1), and CD163⁺(M2). The WSN-ad virus elucid the hyperinflammatory immune response and significantly increased the level of Th1 (Fig. 4A) and Th2 (Fig. 4B) cells in the spleens of mice infected with LD₁₀₀ of WSN-ad. The levels of CD68⁺(M1) and CD163⁺(M2) were also increased in mice infected with LD₁₀₀ of WSN-ad (Fig. 4C, 4D).

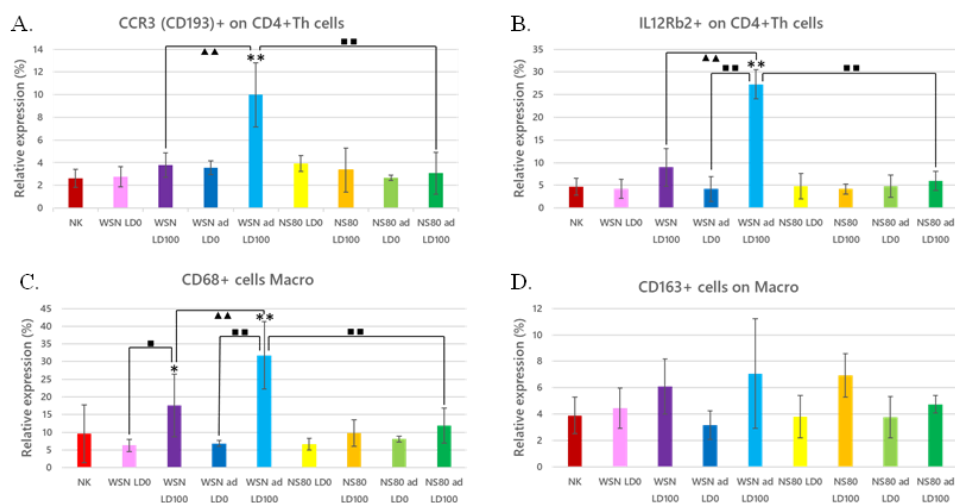


Fig. 4. Subsets of CD4⁺ T lymphocytes in the spleen of mice infected with LD₁₀₀ and LD₀ of WSN, WSN-ad, NS80, NS80-ad.

Conclusion

Our results show that adaptation of NS80 virus increased the replication of this virus in Vero cells. Adapted NS80 virus is not attenuated as non-adapted NS80 virus. The virus was detected in the spleens of mice infected with WSN and NS80 virus (LD₁₀₀). Adaptation of NS80 virus increased the pathogenicity and ability of this virus to be spread into other organs. All viruses induced the RIG-I signaling pathway. Adapted virus significantly increased expression of cytokine mRNAs. The WSN-ad virus eluded the hyperinflammatory immune response in the spleens of infected BALB/c mice. Adapted WSN virus significantly increased the levels of CD68⁺(M1) and CD163⁺(M2) macrophages.

Acknowledgement

This research was funded by European Regional Development Fund and by the Slovak Research and Development Agency (grand No. VEGA 2/0031/20).

References

- [1] Roberts N. R. J., Krilov L. R. (2022) *Viruses*. 14(5), p. 883
- [2] Sellers S. A., Hagan R. S., Hayden F. G., et al. (2017) *Influenza Other Respir. Viruses*. 11(5), p. 372
- [3] Chen X., Liu S., Goraya M. U., et al. (2018) *Front. Immunol.* 9(320)
- [4] Beňová K., Hancková M., Koči K., et. al. (2020) *Acta. Virol.* 64(2), p. 131
- [5] Liu J. X., Zhang Y., An M., et al. (2019) *J. Infect. Dev. Ctries.* 13(6), p. 536
- [6] Krug R. M. (2015) *Curr. Opin. Virol.* 12
- [7] Turianová L., Lachová V., Beňová K., et. al. (2020) *Acta. Virol.* 64(1), p. 78
- [8] Švančarová P., Svetlíková D., Betáková T. (2015) *Virus. Res.* 195

Sledovanie expresie vybraných génov včasnej imunitnej odpovede po infekcii vírusu kliešťovej encefalitídy v keratinocytoch

Jozef Džubara, Iveta Štibrániová, Paulína Bartíková

*Virologický ústav Slovenskej Akadémie Vied, v. v. i., Oddelenie imunológie vírusov,
Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika; Dúbravská cesta 9, 845 05
Bratislava, Slovenská republika; dzubara2@uniba.sk*

Abstract

Monitoring of selected innate immune response genes after tick-borne encephalitis virus infection in keratinocytes

Tick-borne encephalitis Virus (TBEV) is the most well-known and probably the most dangerous virus in the Flaviviridae family in our region. TBEV inducing encephalitis in an infected person. To properly set up an appropriate therapy, it is crucial to know all the links between the host's immune system and the virus, which includes the interaction of TBEV with skin cells. At our laboratory, we confirmed that TBEV proliferates in human keratinocytes *in vitro* but without an apparent cytopathic effect. The skin, as the external barrier of people and animals, is the gateway for many others pathogens occurring in the environment or transmitted by parasites acting on the skin. Ticks are the main vectors that transmit not only TBEV, but a wide range of other pathogens, including viruses, with significant implications by causing severe human and animal diseases.

Keywords: Tick-borne encephalitis virus; skin; keratinocytes; gene expression; immune response

Úvod a formulácia cieľa

Vírus kliešťovej encefalitídy je malý obalený vírus s nesegmentovaným genómom tvoreným molekulou RNA + polarity. Patrí do čeľade *Flaviviridae*. Cieľovým orgánom vírusu v organizme je CNS. Po infekcii navodí horúčkovité stavy, ktoré často prerastajú až do encefalitídy a meningitídy [1].

Vstupnou bránou pre mnohé vírusy, vrátane TBEV, a miestom ich prvého kontaktu s imunitou hostiteľa je koža. Obranu, ako aj zachovanie homeostázy zabezpečuje celá sieť imunokompetentných buniek a nimi produkovaných cytokínov, chemokínov a antimikrobiálnych peptidov [2]. Najväčšia časť kože – epidermis je tvorená hlavne keratinocyty – v rôznych stupňoch diferenciácie. Sú jednými z buniek, s ktorými prichádza do styku vektor aj prenášaný patogén, v našom prípade TBEV. Na povrchu a aj v cytoplazme keratinocytov dochádza k produkcii patogén-rozpoznávajúcich receptorov (PRR), pomocou ktorých identifikujú cudzorodé antigény a následne indukujú veľmi efektívne imunitné reakcie [3]. V závislosti od ich vnútrobunkovej lokalizácie následne aktivujú rôzne signálne dráhy, ktoré vyvolávajú príslušnú imunitnú odpoveď – prozápalovú cytokínovú alebo antivírusovú interferónovú. Po transformačných zmenách dochádza k asociácii s mitochondriálnym adaptorovým proteínom antivírusovej signalizácie (MAVS). V tejto kaskádovej reakcii,

nasleduje aktivácia viacerých kaspáz a kinázových inhibítorov (IKK ϵ , TBK-1), čo vyústi do fosforylácie NF- κ B (nuclear factor- κ B) a IRF3 (interferon regulatory factor 3). Tieto faktory sa viažu na ISRE (IFN-stimulated responsive elements), a tým aktivujú transkripciu interferónových génov a génov pre ich receptory [4].

V našom experimente sme sa zamerali na sledovanie vplyvu TBEV na expresiu vybraných génov asociovaných s antivírusovou imunitnou odpoveďou v infikovaných kožných keratinocytoch v porovnaní s neinfikovanými bunkami. Zároveň sme počas prvých troch dní po infekcii monitorovali vplyv koncentrácie vírusu na expresiu sledovaných génov. Každý gén bol testovaný v 3 paralelkách. Výsledky pochádzajú z dvoch nezávislých experimentov.

Materiál a metódy

Bunková línia HaCaT: Je spontánne transformovaná aneuploidná bunková línia keratinocytov. Bunky sme udržiavali v kompletnom médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's, Lonza), (s 1 % L-Glutamínom a 1 % antibiotikami penicilín (10000 U/ml) – streptomycín (10000 μ g/ml), Lonza)), obohatenom o 10 % fetálne bovínne sérum (FBS, Lonza), pri teplote 37 °C a pri atmosfére obsahujúcej 5 % CO₂.

Vírus kliešťovej encefalitídy – kmeň Hypr: Zbierka BMC VÚ SAV, bol množený na mozgoch novorodených myši kmeňa BALB/c.

Infikovanie buniek: Nakoľko sme sledovali vplyv rôznych koncentrácií TBEV na expresiu vybraných génov asociovaných s antivírusovou imunitnou odpoveďou v priebehu 72 hod po infekcii, infikovali sme 24-hodinovú bunkovú kultúru (10⁶ buniek) vírusom TBE kmeň Hypr v troch rôznych multiplicitách infekcie (MOI) 0,1, 1 a 5. V priebehu nasledujúcich troch dní po infekcii sme v 24 hodinových intervaloch odoberali bunky, ktoré sme použili na izoláciu celkovej RNA pomocou komerčne dostupných kitov.

Izolácia RNA: Z infikovaných keratinocytov sme celkovú RNA izolovali pomocou kitu GenJet RNA Purification kit (Thermoscientific), postupovali sme podľa protokolu vydaného výrobcom. Koncentráciu RNA sme merali na Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo scientific) pri vlnovej dĺžke (λ = 260 nm) a dlhodobo uskladnili pri teplote -80 °C.

Prepis RNA: RNA sme pomocou komerčne dostupného kitu First Strand cDNA Synthesis kit (Thermoscientific) prepísali do cDNA. Postupovali sme podľa protokolu vydaného výrobcom. Do prvého vlákna cDNA sme prepisovali 500 ng RNA za pomoci 100 μ M RANDOM primerov. Koncentráciu sme odmerali na Nanodrop 2000 Spectrophotometer,

Thermo Scientific. Prepísanú cDNA sme využívali ako templát pri semikvantitatívnych real-time PCR reakciách.

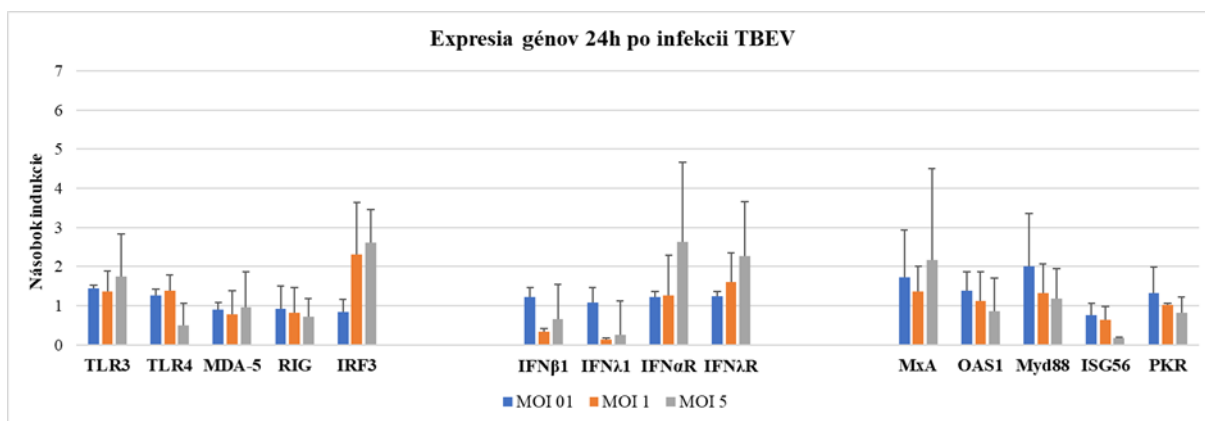
Real-time PCR: Vplyv TBEV na expresiu génov asociovaných s antivírusovou odpoveďou sme sledovali pomocou semikvantitatívnej Real-time PCR, pomocou kitu MAXIMA Sybr Green/ROX (Thermoscientific) s využitím gén špecifických primerov, ktoré sme navrhli pre sledované gény. Pracovná koncentrácia primerov bola 0,3 μ M. Do 10 μ l reakcií sme dávali 150 ng cDNA. Teplotný program qPCR bol nastavený podľa pokynov výrobcu, v závislosti od sekvencie primerov bola teplota anelácie a polymerizácie nastavená na 60 °C. Reakciu sme realizovali v StepOnePlus Real-time PCR termocykleri (Applied Biosystems, USA).

Všetky skúmané vzorky sme testovali v troch paralelných jamkách. Výsledné hodnoty Ct sme vo výpočtovej tabuľke porovnávali oproti hodnotám β -aktínu a oproti kontrolným – neinfikovaným bunkám. Výsledné hodnoty indikujú násobok indukcie jednotlivých génov v infikovaných bunkách v porovnaní s neopracovanými bunkami.

Výsledky a diskusia

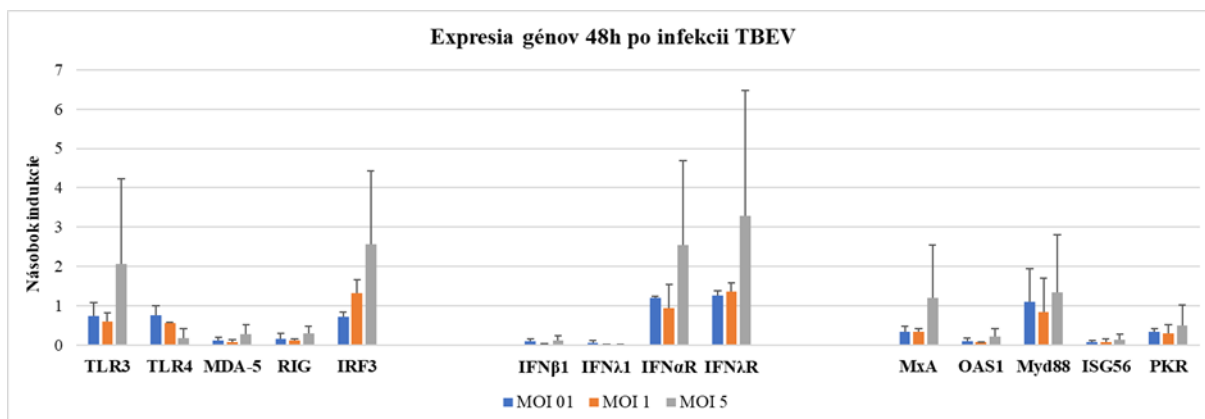
V tomto experimente sme monitorovali vplyv TBEV infekcie na expresiu 14 génov – TLR3, TLR4, RIG, MDA-5, IRF3, IFN β 1, IFN λ 1, IFN α -R1, IFN λ -R1, OAS1, MxA, ISG56, MyD88 a PKR – zapojených do vrodenej antivírusovej obrany ľudských kožných keratinocytov, počas prvých 72h po infekcii.

Už 24h po infekcii sme zaznamenali nárast expresie väčšiny génov (Obr. 1.). Najvyššie, 2- až 3-násobné zväčšenie expresie sme zaznamenali pri génoch IRF3, IFN α -R1 a IFN λ -R1. Tento násobok sme zaznamenali iba pri MOI 5 u spomenutých génov (IRF3 aj pri MOI 1). Najčastejším nárastom expresie bolo 1- až 2-násobné zväčšenie, ktoré sme zaznamenali najčastejšie pri MOI 01. Pri niektorých génoch sme zaznamenali pokles násobku expresie so stúpajúcou MOI (TLR4, IFN β 1, IFN λ 1, OAS1, ISG56, MyD88 a PKR). Je tiež možné, že pri vyšších koncentráciách vírusu dochádza k indukcii monitorovaných génov skôr ako 24 hod po infekcii.



Obr. 1. Nárast expresie sledovaných génov v HaCaT-CLS po infekcii TBEV 24h po infekcii. Hodnoty osi Y vyjadrujú násobok zmeny expresie sledovaného génu vo vzťahu k neopracovaným bunkám.

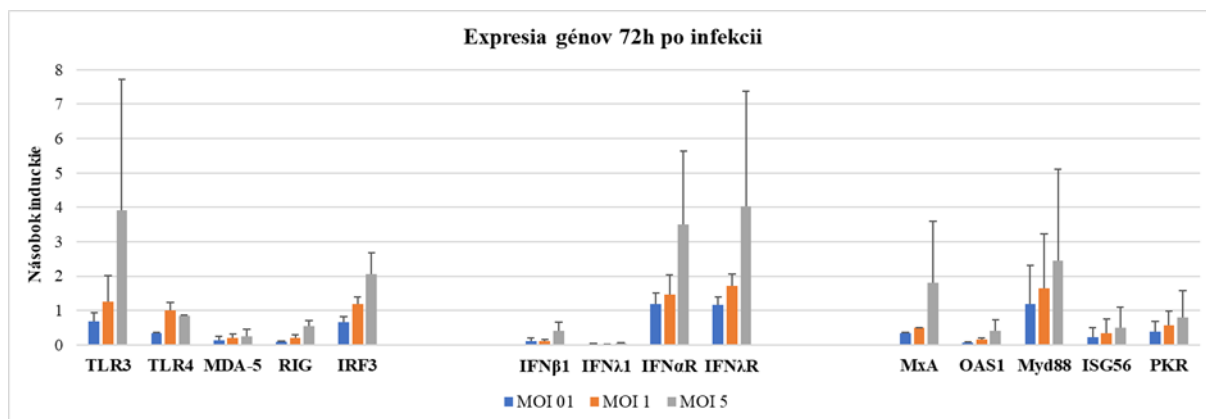
V porovnaní s 24 h intervalom sme 48 h po infekcii opäť detegovali nárast expresie génov pre prvé subjednotky receptorov pre IFN I a III typu – IRF3, IFN α -R1 a IFN λ -R1 (takmer dvojnásobné zväčšenie). V prípade expresie TLR4, MDA-5, RIG-I, IFN β 1, IFN λ 1, OAS1, ISG56 a PKR, sme zaznamenali výraznú inhibíciu expresie. V prípade TLR4 s nárastom dávky vírusu dochádzalo k zvyšovaniu inhibičného efektu. Naopak, v prípade IRF3 (MOI 0.1), TLR3, MxA a Myd88 (MOI 0.1 a 1) inhibičný efekt vírusu na expresie sledovaných génov slabol s rastúcou MOI. (Obr. 2). V prípade génov Myd88, MxA a TLR3 mal koncentračný vplyv kolísavý efekt, s poklesom 48 hod po infekcii.



Obr. 2. Nárast expresie sledovaných génov v HaCaT-CLS po infekcii TBEV 48 h po infekcii. Hodnoty osi Y vyjadrujú násobok zmeny expresie sledovaného génu vo vzťahu k neopracovaným bunkám.

Ako vidno z obrázku 3, 72 hod po infekcii dochádzalo v infikovaných keratinocytoch k nárastu indukcie expresie génov IFN α -R1(2,5-krát) a IFN λ -R1(2-krát), najmä pri MOI 5, a to v porovnaní s oboma predchádzajúcimi dňami. Rovnako došlo k pozitívnej stimulácii expresie génu pre TLR3 (2-krát), Myd88 (1,5-krát), a IRF3 (2-krát). Pri ostatných sledovaných génoch

sme zaznamenali pomalé utlmovanie expresie. Okrem toho, naďalej dochádzalo k expresii génov Myd88 a MxA (pri MOI 5).



Obr. 3. Nárast expresie sledovaných génov v HaCaT-CLS po infekcii TBEV 72 h po infekcii. Hodnoty osi Y vyjadrujú násobok zmeny expresie sledovaného génu vo vzťahu k neopracovaným bunkám.

Naše výsledky naznačujú, že k indukcii nami testovaných interferónov dochádzalo hneď po infekcii, no postupne nastával pokles expresie génov pre IFN-β a IFN-λ, MDA-5 a RIG-I. Gény pre receptory týchto interferónov dosahovali vyššie hodnoty expresie aj v neskorších časových intervaloch a pri vyšších infekčných dávkach (MOI 5). Hoci arbovírusy nie sú silnými induktormi IFN I typu, podarilo sa nám detegovať aktiváciu imunitnej odpovede v ľudských keratinocytoch asociovanú nielen s IFN I typu, ale aj IFN III typu, ktoré sa podieľajú na antivírusovej ochrane epitelov. IFN-λ sa tak spolupodieľa na obrane pred inváziou napr. arbovírusov [5], poskytujúc obranu v prvej línii, ktorá spôsobuje menšie vedľajšie poškodenie ako silnejšia odpoveď IFN I typu. K indukcii nami testovaných PRR dochádzalo najmä na začiatku infekcie s postupným utlmovaním expresie. V prípade senzorických PRR typických pre TBEV, RIG-I a MDA-5, sme detegovali najvyššiu mieru aktivácie už 24 hod po infekcii, preto bude zaujímavé, otestovať mieru expresie v skorších časových intervaloch po infekcii. Výnimkou bolo TLR3. Pravdepodobne, podobne ako pri infikovaní buniek CNC, aj v koži bude tento PRR zohrávať významnú úlohu. Pri génoch kódujúcich antivírusové proteíny sme zaznamenali vyššie hodnoty expresie len pri géne pre Myd88 vo všetkých časových intervaloch. Dôležitosť funkcie Myd88 počas infekcie TBEV bola dokázaná v priebehu antivírusovej odpovede myšacích astrocytov infikovaných TBEV, kedy bola preukázaná bifázická indukcia IFN-β, v neskorších intervaloch infekcie závislá práve od signalizácie Myd88/TRIF [6].

Záver

Naše experimenty potvrdili schopnosť ľudských keratinocytov infikovať sa vírusom TBE a reagovať na infekciu zvýšenou expresiou väčšiny nami sledovaných génov zapojených v imunitnej odpovedi. Najvýraznejšie indukcie expresie väčšiny génov sme zaznamenali 24 h po infekcii pre všetky MOI. U niektorých génov sme detegovali nárast expresie v dôsledku vyššej infekčnej dávky, u iných malo zvyšovanie koncentrácie vírusu inhibičný efekt. V experimentoch, ktorými dokazujeme indukciu expresie testovaných génov sa stále pokračuje.

PodĎakovanie

Experiment bol zrealizovaný vďaka finančnej podpore z grantu VEGA 2/0108/22.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Hart CH. E., Ribeiro J. M., Kazimirova M., et al. (2020). Front. in Cell. Inf. Micr. 10, p. 41
- [2] Garcia M., Wehbe M., Leveque N.(2017). Eur. Cytokine Netw. 28(2), p. 41
- [3] Nestle F. O., Di Meglio P., Qin J. -Z., et al. (2009). Nat. Rev. Immunol. 9 (10), p. 679
- [4] Patel J. R., Garcia-Sastre A. (2014). Cyto. Grow. Fact. Rew. 25(5), p. 513
- [5] Bordi L., Lalle E., Caglioti C., et al. (2015) PLoS One 10(2):e0116816
- [6] Ghita L., Breitkopf V., Mulenge F., et al. (2021) Jour. Of Neuros. Research. 99(10): p. 2478

***E. coli* bacteriophages useful for therapy of urinary tract infections**

Sulafa Elnwrani^{1,2}, Barbora Markusková², Michal Andrežál¹, Hana Drahovská^{1,2}

¹*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Molecular biology, Ilkovicva 6, 842 15 Bratislava, Slovak republic ali40@uniba.sk*

²*Comenius University in Bratislava, Science park, Ilkovicva 8, 841 04 Bratislava, Slovak republic*

Abstract

Urinary tract infections (UTIs) belong to the most common bacterial infections. The uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains are very common causative agents of this condition, they are responsible for 80% of all cases. Infections are commonly treated with antibiotics, but the problem is the increasing incidence of resistant bacteria. The phage therapy is one of the alternative treatment options. To increase the host spectrum and reduce the likelihood of developing phage-resistant strains of bacteria, cocktails composed of multiple phages are most often used in therapy. The aim of the presented work was the isolation and characterization of bacteriophages infecting UPEC strains. We isolated bacteriophages from waste water. We established the host phage specificity in a panel of 85 clinical strains of *E. coli*. We established a one-step growth curve and the adsorption of phages to host strains.

Keywords: *Urinary tract infections; bacteriophages; phage therapy; antibiotic resistance*

Introduction and Objectives

Urinary tract infections represent one of the most common problems in clinical medicine. Around 150 million people become infected with this infection every year. The primary cause of community-acquired UTI is the UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) (about 80– 90%). UPEC strains have a plentiful of both structural (as fimbriae, pili, curli, flagella) and secreted (toxins, iron-acquisition systems) virulence factors that contribute to their potential to cause disease, although the ability to adhere to host epithelial cells in the urinary tract represents the most important determinant of pathogenicity [1].

UTIs are becoming one of the difficult to treat infections because of the widespread of antibiotic resistance mechanisms among the members of the family *Enterobacteriaceae*, including *E. coli*, having the plasmid encoding extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) which rapidly spread resistance to third-generation cephalosporins as well as other antibiotics. Currently, the most commonly recommended therapy for UTIs are antibiotics such as trimethoprim sulfamethoxazole, ciprofloxacin and ampicillin. However, with the increasing rates of bacterial resistance, alternative therapies should be considered to reduce the burden of these common infections [2]. Many promising approaches are being developed, phage therapy is one of the alternative treatment options. Using bacterial phages for therapy has drawn increasing attention in recent years. Phages are viruses that attack bacteria to complete their

life cycle [3]. Phage therapy can be defined as the application of strictly virulent phages for the purpose of lysing specific bacterial pathogen which is causing clinical infection. This practice has been around for a century [4]. Like all viruses, bacteriophages are very species-specific with respect to their hosts and usually only infect a single bacterial species or even specific strains within a species and only rarely able to infect throughout bacterial species or genera (polyvalent phages) [5]. Phage therapy can be divided into two groups; the first group is based on using a cocktail targeting wide range of pathogens. The second group is more modern approach which based on personalising medication, phages are selected according to patient pathogen [3].

The main aim of the presented work is to prepare and characterize a phage cocktail, determine the host specificity range of each phage and measure the percentage of growth inhibition of the phage cocktail to selected *E. coli* strains in artificial urine.

Materials and methods

Bacterial strains and cultivation conditions

In the work, we used 77 isolates of *E. coli* originating from a urine sample (n = 74) and a vaginal swab (n = 3). We cultured bacterial strains in liquid or solid LB medium.

Phage isolation

Bacteriophages were isolated from wastewater. The water was filtered through a cellulose filter with a pore diameter of 0.45 µm. 9 ml of filtered water were mixed with 9 ml of 2 times concentrated LB medium, 2 ml of overnight bacterial culture of the indicator strain, 50 µl MgCl₂ (1M), 50 µl CaCl₂ (1M) and 500 µl of 20 % glucose and incubated overnight on a shaker at 37 °C. The overnight culture was mixed with 200 µl chloroform, incubated on ice for 10 minutes and lysed bacteria were removed by centrifugation. The supernatant containing the phages was poured into a sterile tube, chloroform was added again, lysates were concentrated by precipitation with polyethylene glycol and re-suspended in MS solution. The phage lysates were stored at 4 °C.

Determination of host specificity of bacteriophages

The host range of bacteriophages were determined using a spot test on double agar by spotting 10 µl phage lysate with three concentrations – 10⁸, 10⁶ and 10⁴ PFU/ml. Based on the type of plaques and the lysis zone, the bacterial strains were divided into sensitive, partially sensitive and resistant.

Determination of growth parameters of bacteriophages

For determination of one step growth curve the subculture of the indicator strain grown

to $OD_{600} = 0.3$ was mixed with phage lysate with a concentration of 10^7 PFU/ml ($MOI = 0.01$), after the phage adsorption to cell surface the mixture was diluted 100 times and incubated at 37°C , in 5 min intervals (0 – 60 min) 50 μl samples were removed into 450 μl cold SM buffer, stored on ice, the titer was determined by using 5 – 200 μl mixture from samples and plated on double agar plate. the plates were incubated overnight at 37°C , plaques formed were counted and the one step growth curve was constructed. (Fig. 2).

Inhibition of *E. coli* growth by the phage cocktail

We tested the ability of bacteriophages to lyse a bacterial culture in artificial urine by measuring the optical density of the culture in a 96-well microtitre plate. We mixed artificial urine [6] with an overnight culture of bacteria with a concentration of approximately 8×10^8 CFU/ml ($OD_{600} = 0.1$) and a phage cocktail with a concentration of each phage of 8×10^8 PFU/ml ($MOI = 10$) into the wells up to a volume of 200 μl . The optical density of wells was measured each hour for 24 hours on VarioScan spectrophotometer.

Results and discussion

Our team isolated and characterized 17 bacteriophages with potential therapeutic activity against *E. coli* strains. The phages belonged to *Straboviridae*, *Siphoviridae*, *Drexlerviridae*, *Autographiviridae* and *Podoviridae* families. A phage cocktail composed of six phages belonging to *Straboviridae* and *Autographiviridae* was prepared (Tab. 1). The sensitivity of 77 *E. coli* strains to phage infection were tested, vKMB26 was found to be infecting up to 57 % of the strains, other phages from the cocktail infected 17 – 43 % strains (Fig. 1). Phages infected mainly strains belonging to the B2 and D phylogroups.

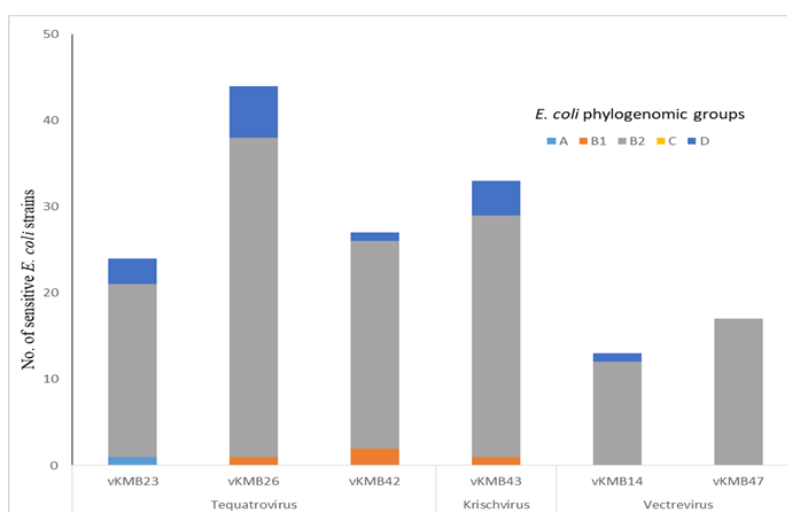


Fig. 1. Sensitivity of *E. coli* strains to phages from the phage cocktail.

Determination of growth parameters of bacteriophages

Phages showed high adsorption to *E. coli* strains, 72 – 98 % in five min interval (Tab. 1). with life cycle ranging from 15 to 30 min (Tab.1). One step growth curve showed the latent period 7.5 – 15 min and the burst size 38 – 212 phages per cell. The highest burst size was determined for vKMB47 belonging to *Vectrevirus* of *Autographiviridae* family.

Tab. 1. Phages used for the phage cocktail.

Name	Family	Genus	<i>E. coli</i> indicator strain	Latent period/min	Life cycle/min	Burst size	Adsorption after 5 min/%
vKMB23	<i>Straboviridae</i>	<i>Tequatrovirus</i>	KMB-507	10	20	95	72
vKMB26	<i>Straboviridae</i>	<i>Tequatrovirus</i>	KMB-517	15	30	47	80
vKMB42	<i>Straboviridae</i>	<i>Tequatrovirus</i>	KMB-233	15	25	69	77
vKMB43	<i>Straboviridae</i>	<i>Krischvirus</i>	KMB-972	10	20	38	80
vKMB14	<i>Autographiviridae</i>	<i>Vectrevirus</i>	KMB-528	7.5	15	190	98
vKMB47	<i>Autographiviridae</i>	<i>Vectrevirus</i>	KMB-972	10	30	212	98

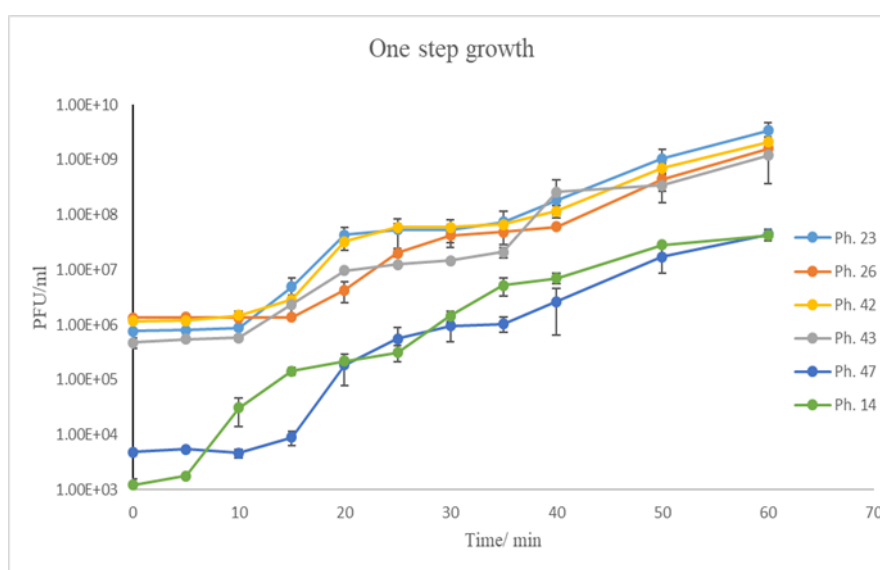


Fig. 2. One step growth curve of *E. coli* phages.

Inhibition of *E. coli* growth by the phage cocktail

We tested the effect of the phage cocktail in simulated urine as in vitro bladder model conditions [6]. In our work, we obtained similar results as in the LB medium a high rate of lysis was observed in cultures in the logarithmic phase of growth (Fig. 2). The cocktail reduced the concentration of bacteria by $99 \pm 0.4\%$, but within 24 hours there was a re-growth of phage-resistant cells. Culture in the stationary phase was inhibited to a lesser extent than in LB medium, during the first hours and after eight hours there was a re-growth of the culture. One of the possible explanations for the better growth of a culture with a phage cocktail may be the presence of gelatin, in which phages are kept. Gelatin, representing a source of carbon in a nutritionally poor medium such as simulated urine, could promote improved growth of phage-resistant cells.

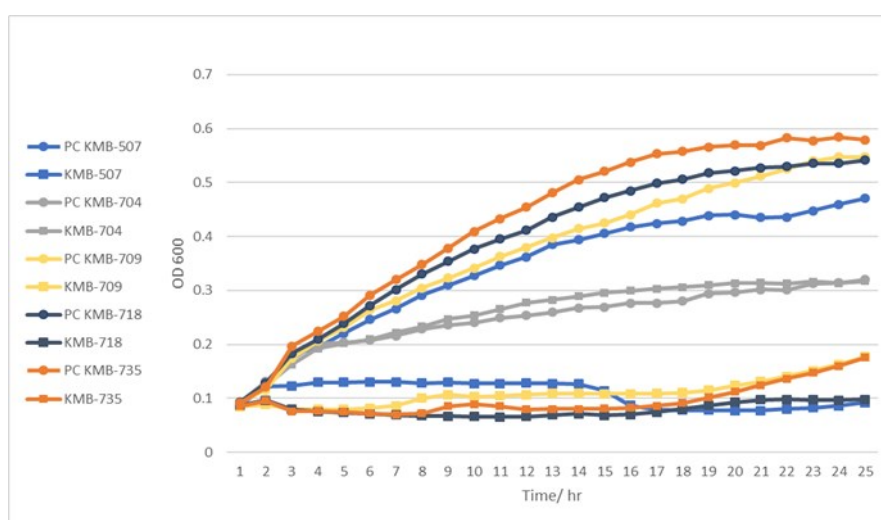


Fig. 3. Inhibition of *E. coli* growth by the phage cocktail on artificial urine (MOI = 10).

Conclusion

A phage cocktail composed of six phages confirmed good efficacy against four of the five tested strains in artificial urine medium. The growth parameters were determined and we observed good adsorption, we observed high inhibition, up to 80 % in four out of the five tested strains. The acquired results will be used in the preparation of cocktails for UTIs phage therapy.

Acknowledgement

This work has been supported by APVV-20-0001.

References

- [1] Terlizzi M. E., Gribaudo G., Maffei M. E. (2017) *Front. Microbiol.* 8(1566), p. 1
- [2] Flores-Mireles A. L., Walker J. N., Caparon M., et al. (2015). *Nat Rev. Microbiol.* 13(9), p. 269
- [3] Mitropoulou G., Koutsokera A., Csajka C., et al. (2022) *Eur. Respir. Rev.* 31(166), p. 220121
- [4] Gordillo Altamirano F. L., Barr J. J. (2019) *Clin. Microbiol. Rev.* 32(2), p. 1
- [5] Knoll B. M., Mylonakis E., (2014) *Clin. Infect. Dis.* 58(4), p. 528
- [6] Sarigul N., Korkmaz F., Kurultak İ. (2019) *Sci. Rep.* 9(1), p. 20159

Sledovanie telesnej stavby žiakov staršieho školského veku (Bratislavský kraj)

Yana Fedorets¹, Miriam Kirchmayerová², Lenka Vandaková², Silvia Bodoriková¹, Mária Fuchsová³, Eva Štefánková⁴, Eva Neščáková¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra antropológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; ana939924@gmail.com

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra telesnej výchovy, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

³Univerzita Komenského v Bratislave, Pedagogická fakulta, Katedra didaktiky prírodovedných predmetov v primárnom vzdelávaní, Račianska 59, 813 34 Bratislava, Slovenská republika

⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Klinika detskej chirurgie, Národný ústav detských chorôb, Limbova 1, 83 340 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Monitoring the physical structure of older school-age students (Bratislava region)

The main goal of this study was to determine anthropometric characteristics of males and females of high school age in Bratislava. Our research focuses on the comparison of high school students aged 11 to 15 years to find out if there are sex differences, on the assessment of somatotype and the analysis of body composition of the subjects by height, as well as on the calculation of anthropometric parameters and comparison of the obtained indicators with previous standards. 566 children (277 males and 279 females) were examined, divided into five groups according to age. 14 body parameters were measured, with the help of which 10 body indices were subsequently calculated. Our results show that the parameters of males are higher than those of females. Comparing the obtained indicators with the parameters measured in 1989, we can conclude that young people tend to accelerate their growth and gain weight over the years.

Keywords: height; high school age; anthropometric indices

Úvod a formulácia cieľa

Sledovanie hodnôt základných telesných charakteristík u detí a dospievajúcej mládeže je jeden z najjednoduchších, základných a neinvazívnych spôsobov posudzovania zdravotného a výživového stavu jedincov a celej populácie. Včasné rozpoznanie odchýlky vývinu telesných znakov dieťaťa od očakávaných hodnôt môže naznačovať výskyt závažnejšieho ochorenia, nesprávne stravovacie návyky, psychické alebo iné problémy dieťaťa [1].

Rast je jedna z funkčných a štrukturálnych zmien, ktoré prebiehajú počas života jedinca alebo množenie a zväčšovanie buniek a tým zväčšovanie celej telesnej hmoty. Ako vývin sa označuje zrenie štruktúry a funkcií nediferencovaného stavu k vysoko špecializovanej funkčnej kapacite [2].

Starší školský vek je obdobie od 11 rokov do 15 rokov. Aktivizuje sa činnosť hypofýzy, ktorá je spúšťačom hormónov stimulujúcich vývin a rast endokrinných žliaz a tkanív [3].

Obdobie puberty je charakteristické intenzívnym telesným rastom (v priemere štyri – päť cm u dievčat, u chlapcov 5,5 cm). Hmotnosť vzrastá v priemere o 4,5 kg u chlapcov [4].

Sekulárny trend (*saeculum* – storočie) sa prejavuje zvyšovaním telesnej hmotnosti a výšky u dospelých, čo znamená urýchlenie vývinu rastu u detí a mládeže [5]. Sekulárny trend sa týka zmien v raste a vývine, tieto zmeny vznikli v dôsledku zlepšovania životných podmienok, ku ktorým došlo v priebehu demografickej revolúcie 19. a 20. storočia [6].

Cieľom tejto štúdie bolo sledovanie telesnej stavby žiakov staršieho školského veku z Bratislavského kraja. Na základe porovnania súčasných dát s dátami Slovákova et al. (1989), sme vytvorili nové normy pre slovenskú populáciu, porovnávali intersexuálne rozdiely v rámci sledovanej vekovej kategórie s ďalším využitím v klinickej a športovej praxi [7].

Materiál a metódy

Súborom sú chlapci a dievčatá staršieho školského veku od 11 do 15 rokov z Bratislavského kraja. Sledovaný súbor tvorí 566 detí (277 chlapcov a 279 dievčat; tab. 1). Databázu meraní poskytla Katedra antropológie Univerzity Komenského v Bratislave. Meranie bolo realizované v rokoch 2014 – 2020 v Bratislave. Zber dát sa uskutočnil v základných školách v Bratislave.

Tab. 1. Počet jedincov v sledovanom súbore vzhľadom na vekové kategórie a pohlavie

Vek (roky)	Počet chlapcov	Počet dievčat
11,00 – 11,99	63	75
12,00 – 12,99	71	45
13,00 – 13,99	47	52
14,00 – 14,99	41	63
15,00 – 15,99	55	44
Spolu	277	279

V danej štúdii sme sa zamerali na telesné rozmery a indexy: telesnú hmotnosť a telesnú výšku, torakálny index ($TI = \text{sagitálny priemer hrudníka} \times 100 / \text{transverzálny priemer hrudníka}$) a Rohrerov index (index telesnej plnosti; $RI = \text{telesná hmotnosť} \times 10^5 / \text{telesná výška}^3$).

Na štatistické spracovanie údajov sme použili program Microsoft Excel a IBM SPSS 20, pomocou t-test pre nezávislé výbery sme stanovili intersexuálne rozdiely, na zhodnotenie rozdielov v priemerných hodnotách parametrov sledovaného súboru a súboru Slovákova et al. (1989) sme použili t-test s Aspin-Welchovou aproximáciou, štatistickú významnosť sme hodnotili na hladine významnosti 0,05.

Výsledky a diskusia

Pri porovnaní intersexuálnych rozmerov sme zistili, že chlapci sú vo všetkých vekových skupinách vyšší ako dievčatá, štatistická významnosť rozdielov sa potvrdila vo veku 13, 14 a 15 rokov ($p < 0,001$). Chlapci majú vyššiu telesnú hmotnosť ako dievčatá, štatistická významnosť sa potvrdila vo veku 11, 14 a 15 rokov. Rýchly rast výšky a hmotnosti oboch pohlaví môže byť ovplyvnený načasovaním puberty a vznikom sekulárneho trendu. Sekulárny trend je vývojový smer, ktorý sa prejavuje zvyšovaním telesnej výšky a hmotnosti dospelých a urýchlením rastu a vývinu detí a mládeže [8]. V puberte dochádza k rastovému špurtu, ktoré u chlapcov obyčajne začína medzi 12. až 13. rokom a končí medzi 17. až 18. rokom života. Najvýraznejší pubertálny rast chlapcov je v 14. roku, kedy ročný prírastok na výške tvorí 7 až 12 cm [9-10]. V sledovanom súbore chlapcov začiatok takého rastového špurtu môžeme pozorovať vo veku 12 rokov, čo je v súlade s Mojžíšová (2008); Riegerová a Ulbrichová (2006). Na rozdiel od chlapcov dochádza u dievčat k rastovému špurtu skôr, a to približne v desiatich rokoch a končí tiež skôr, obyčajne v 15. roku. Najväčšia rýchlosť rastu u dievčat býva opisovaná v 12 rokoch, kedy narastú v priemere sedem až 11 cm za rok. Rastové zrýchlenie v puberte býva u dievčat viac intenzívne, ale zato kratšie ako u chlapcov [11]. U dievčat sledovaného súboru v súlade sa potvrdil najväčší nárast výšky v 12 rokoch a zastavenie rastu vo veku 15 rokov (tabuľka 2).

Ďalším typickým pubertálnym znakom u dievčat je menarché. V našich podmienkach sa objavuje prvá menštruácia u dievčat vo veku okolo 13 rokov a po nej sa rýchlosť rastu spomaľuje, dievčatá vyrastú v priemere už len o 7,5 cm. Po menarché však pokračuje rast panvy, zväčšuje sa množstvo podkožného tuku, ktorý sa charakteristicky ukladá a formuje ženský typ postavy [9-10]. Toto obdobie je charakteristické druhou premenou postavy nielen u dievčat, ale aj u chlapcov, tieto zmeny potvrdzujú zvýšenie telesnej hmotnosti u detí staršieho školského veku.

Pri hodnotení torakálneho indexu majú štatisticky významne vyššie hodnoty chlapci v porovnaní s dievčatami vo vekových skupinách 11, 12, 14 a 15 rokov ($p < 0,001$). Štatisticky významne vyššie hodnoty Rohrerovho indexu sme zistili u chlapcov vo veku 11 rokov, dievčatá mali štatisticky významne vyššie hodnoty vo veku 13 rokov. Na základe hodnotenia Rohrerovho indexu – indexu telesnej plnosti majú dievčatá plnšie postavy, čo súvisí aj s pubertálnym vývinom.

Tab. 2. Porovnanie telesných parametrov a indexov sledovaného súboru so slovenskou normou (Slováková et al. 1989)

Legenda: N – počet jedincov, x – aritmetický priemer, SD – smerodajná odchýlka, TV – telesná výška, TH – telesná hmotnosť, TI – torakálny index, RI – Rohrerov index, p – hodnota významnosti

Chlapci							Dievčatá				
Vek		Sledovaný súbor		Slováková et al. (1989)		p	Sledovaný súbor		Slováková et al. (1989)		p
		x	SD	x	SD		x	SD	x	SD	
N = 63				N = 95			N = 75		N = 56		
11	TV	151,06	5,44	146,87	6,25	< 0,001	150,18	6,90	147,32	7,13	0,023
	TH	46,00	8,34	37,48	7,29	< 0,001	42,81	9,50	37,87	7,85	0,001
	TI	72,13	5,42	69,44	4,59	0,002	69,24	6,80	70,04	4,85	0,434
	RI	1,33	0,21	1,18	0,15	< 0,001	1,25	0,20	1,17	0,15	0,013
N = 71				N = 57			N = 45		N = 48		
12	TV	156,09	7,36	151,32	7,54	< 0,001	156,36	5,73	153,33	8,95	0,054
	TH	46,91	8,99	41,20	7,86	<0,001	48,90	6,96	40,95	8,08	<0,001
	TI	70,14	5,80	72,20	5,08	0,034	67,64	5,31	72,63	5,21	<0,001
	RI	1,23	0,16	1,18	0,13	0,059	1,28	0,15	1,13	0,18	0,001
N = 47				N = 46			N = 52		N = 59		
13	TV	163,46	7,17	158,41	9,25	0,004	160,37	7,96	158,99	6,61	0,327
	TH	53,84	9,22	46,90	10,18	<0,001	54,19	8,18	43,86	7,39	0,001
	TI	68,38	7,56	71,45	5,06	0,024	68,60	6,33	69,81	6,51	0,324
	RI	1,23	0,20	1,17	0,15	0,106	1,33	0,27	1,18	0,12	< 0,001
N = 41				N = 44			N = 63		N = 42		
14	TV	169,02	8,61	166,68	10,14	0,254	162,72	5,76	160,56	6,30	0,079
	TH	61,83	12,66	53,93	10,39	0,002	55,04	8,70	50,10	6,45	0,001
	TI	71,67	6,47	72,28	5,93	0,652	68,73	7,32	68,18	5,75	0,668
	RI	1,28	0,22	1,16	0,12	0,002	1,28	0,21	1,21	0,12	0,053
N = 55				N = 40			N = 44		N = 44		
15	TV	175,45	7,20	172,78	6,86	0,070	165,47	6,39	165,36	5,53	0,931
	TH	66,98	13,09	58,51	7,95	< 0,001	56,42	9,43	54,64	7,14	0,321
	TI	70,50	8,55	70,78	6,53	0,857	66,86	4,97	70,51	5,65	0,002
	RI	1,24	0,26	1,13	0,13	0,016	1,24	0,17	1,21	0,16	0,396

Pri porovnaní sledovaného súboru so slovenskou normou z roku 1989 môžeme konštatovať, že za posledné roky došlo k výrazným zmenám v raste. Chlapci sú štatisticky významne vyšší vo vekových skupinách 11, 12, 13-ročných, ako chlapci z roku 1989. Dievčatá sú vyššie vo všetkých vekových skupinách vyššie ako dievčatá v porovnaní s normou, štatisticky významný rozdiel sme zistili iba vo vekovej skupine 11 rokov ($p < 0,001$). Vo

vekovej skupine 15-ročných je minimálny rozdiel, potvrdilo sa, že akcelerácia rastu do výšky pretrváva u chlapcov, u dievčat sa rast do výšky spomaľuje. Pri hodnotení telesnej hmotnosti sme zistili vo všetkých skupinách u oboch pohlaví nárast telesnej hmotnosti. Chlapci aj dievčatá majú štatisticky významne vyššiu telesnú hmotnosť, okrem dievčat vo veku 15 rokov, kde sa štatistická významnosť rozdielov oproti norme nepotvrdila, čo môže súvisieť s dospievaním dievčat, ich potrebou vyzerat' štíhlejšie a krajšie. Pri hodnotení torakálneho indexu majú štatisticky významne vyššie hodnoty chlapci vo vekových skupinách 11, 12, 14 a 15 rokov ($p < 0,001$). Pri Rohrerovom indexe sme zistili, že chlapci majú štatisticky významne vyššie hodnoty vo veku 11 rokov ($p = 0,002$), dievčatá vo veku 13 rokov ($p < 0,001$), čo súvisí aj s pubertálnym vývinom a nástupom menarche. V ostatných vekových skupinách sme nezistili žiadne štatisticky významné rozdiely.

Akceleráciu a sekulárny trend ovplyvňuje výživa a racionálna strava (bohatá na bielkoviny a vitamíny), správny režim dňa s dostatočným odpočinkom a primeranou telesnou činnosťou, systematický pohyb na čerstvom vzduchu a slnku, hygiena, úroveň bývania, lekárska starostlivosť a pravidelný lekársky dohľad, harmonický duševný vývin, urbanizačný faktor, rozpad izolátov, skupín populácie izolovaných vplyvom prírodných podmienok a sociálnych príčin [8].

Záver

Výsledky našej práce poukázali na sekulárny trend u detí v súčasnej populácii. Nakoľko pri porovnaní priemerných hodnôt chlapcov aj dievčat vo veku 11 až 15 rokov, sme zistili, že dnešné deti sú vyššie a ťažšie v porovnanie s dátami Slováková et al. (1989). Napriek tomu, že u dievčat dochádza k spomaleniu rastu telesnej výšky, štatistická významnosť sa nepotvrdila v 12 až 15-ročných dievčat a 14 a 5-ročných chlapcov, čo môže byť ovplyvnené tým, že dievčatá dosahujú rastový špurt skôr ako chlapci, a končí potom tiež skôr. Nárast telesnej hmotnosti pokračuje so stúpajúcim vekom u oboch pohlaví, čo je charakteristické druhou premenou postavy aj u chlapcov aj u dievčat. Výška a telesná hmotnosť jedincov sú dlhodobo považované za dôležitý ukazovateľ výživy a zdravia populácie. Už v minulom storočí bol u detí a dospelých pozorovaný nárast výšky a telesnej hmotnosti, čo odráža zlepšenie výživy a sociálno-ekonomických podmienok. Podľa výsledkov diplomovej práce možno povedať o potrebe vytvorenia nových slovenských štandardov pre deti v predškolskom veku, keďže štandardy minulosti sú zastarané a nezodpovedajú fyzickým parametrom dnešných detí. Výsledky našej práce vytvárajú vhodný základ pre tvorbu nových slovenských noriem.

Zoznam použitej literatúry

- [12] Vignerová J., Riedlová J., Bláha P., et al. (2006) Celoštátny antropologický výskum detí a mládeže 2001. SZÚ, Praha, p. 1
- [13] Lisá L., Kňourková M. (1986) Vývoj dieťaťa a jeho úskalia. Zdrav. Nakladatelství, Praha, p. 7
- [14] Gabarová L., Porubčanová D. (2016) Vybrané kapitoly z vývinovej psychológie. Tribun EU, Brno, p. 109
- [15] Štefanovič J., Greisinger J. (1987) Psychológia. Osveta, Bratislava, p. 9
- [16] Perinová V. (2007) Rast a vývoj detí z Juhomoravského kraja od narodenia do 13 rokov. (Diplomová práca) Masarykova univerzita
- [17] Gerová M., Nižňanská M., Korbel' M., et al. (2008) Nástup menarche, vývoj sekundárnych pohlavných znakov a sekulárny trend u dievčat Bratislavského kraja. Praktická gynekologia, 12, p. 22
- [18] Slováková E., Netriová Y., Potočný V., et al. (1989) Antropometria detí a mládeže a jej využitie v pediatrickej praxi I. ÚZV, Bratislava, p. 8
- [19] Machová J. (2010) Biologie člověka pro učitele. Univerzita Karlova v Praze, Praha, p. 210
- [20] Mojžíšová M. (2008) Rast a vývoj dieťaťa. Grada, Praha, p. 21
- [21] Riegerová J., Přidalová M., Ulbrichová M. (2006) Aplikácia fyzickej antropológie v telesnej výchove a športe: (príručka funkčnej antropológie), Hanex, Olomouc, p. 88
- [22] Slobodníková I. (2013) Hodnotenie výživového stavu detí predškolského a mladšieho školského veku. (Diplomová práca) Masarykova univerzita
- [23] Malá H., Klementa J. (1985) Biológia detí a dospievajúcich. SPN, Bratislava, p. 196

Degradácia PCB bionanočasticami železa z kávového odpadu pripravenými pod inertnou a vzdušnou atmosférou

Jana Gavurová¹, Marcela Tlčíková², Hana Horváthová^{2,3}, Katarína Dercová¹

¹*Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Katedra biotechnológie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika; xgavurova@stuba.sk*

²*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra geochémie, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika*

³*Centrum environmentálnych služieb, s.r.o., Kutlíkova 17, 852 50, Bratislava, Slovenská republika*

Abstract

Degradation of PCBs by iron bionanoparticles from coffee waste prepared under inert and air atmospheres

PCBs, as persistent organic compounds, is a threat to the environment and human health. Their removing is expensive and difficult. By using food or plant waste for the green synthesis of nanoparticles and subsequent application, these harmful substances can be eliminated. In this work we focus on the elimination of PCBs through two approaches – the use of the iron bionanoparticles and the iron bionanoparticles together with the bacteria *Ochrobactrum anthropi* and *Stenotrophomonas maltophilia*. A coffee ground and coffee were used for the synthesis of the iron bionanoparticles in an inert and air atmosphere. According to our results, bionanoparticles prepared in an inert atmosphere are more effective tool for degradation of PCBs. The coffee ground is suitable for the preparation of bionanoparticles. However, coffee provided little better degradation activity of PCBs compared to coffee ground. Application of nanoparticles together with bacteria appear to be the most effective method.

Keywords: coffee ground; green synthesis; inert atmosphere; iron bionanoparticles; PCB

Úvod a formulácia cieľa

Zelená syntéza ponúka atraktívnu alternatívu pre syntézu netoxických, ekonomicky výhodných a ekologických bionanočastíc železa [1]. Bionanočastice pripravené zelenou syntézou vznikajú redukciou soli železa bioaktívnymi látkami prítomnými v rastlinnom extrakte [2]. Počas potravinárskej výroby vzniká veľké množstvo nevyužiteľného odpadu, alternatívy pre jeho opätovné použitie sa hľadajú. Až 42 % potravinového odpadu vzniká v domácnostiach, 39 % straty v priemysle a 14 % v sektore stravovacích služieb, pričom 5 % sa stratí pri distribúcii [3]. V poslednej dobe sa vynaložilo úsilie na premenu zeleného odpadu na komerčne využiteľné produkty, pretože sú bohaté na bioaktívne zlúčeniny (vitamíny, minerály, aminokyseliny a polyfenoly). Jedna z najrozšírenejších skupín fytochemikálií vyskytujúcich sa vo všetkých vegetatívnych orgánoch rastlín a následne konzervovaná v odumretých častiach rastlín identifikovaných v zelenom odpade sú fenoly [4]. Práve fenoly, resp. flavonoidy zabezpečujú oxidačno-redukčnými reakciami tvorbu bionanočastíc [2].

Tieto pripravené nanočastice možno využiť na degradáciu toxických a zdraviu

škodlivých látok. Polychlórované bifenyly (PCB) sú perzistentné organické znečisťujúce látky, ktoré boli zakázané Štokholmským dohovorom v roku 2001. Ide o triedu 209 kongenérovo rôzneho stupňa chlorácie (pri výrobe ich reálne vznikalo asi 80), ktoré sa vyznačujú nízkou rozpustnosťou vo vode, vysokou hydrofóbnosťou a dlhodobou perzistenciou v prostredí. Majú genotoxické a karcinogénne účinky, potláčajú imunitu, vyvolávajú zápalové reakcie a patria medzi endokrinné disruptory [5]. Na Slovensku sa PCB vyrábali 25 rokov (1959 – 1984) v Chemku Strážske, dnes je táto oblasť potvrdenou environmentálnou záťažou.

Cieľom našej práce bolo pripraviť bionanočastice interakciou prekursoru železa a extraktu bioaktívnych látok z kávy a najmä z rastlinného odpadu – kávovej usadeniny, zelenou syntézou v inertnej a vzdušnej atmosfére a následne ich využiť na degradáciu PCB (Delor 103 – komerčne vyrábaný produkt v závode Chemko Strážske). Degradáčnejšie experimenty sa realizovali dvoma spôsobmi – aplikáciou samotných bionanočastíc železa a sekvenčnou aplikáciou bionanočastíc železa a baktérií adaptovaných na PCB, ktoré boli izolované zo sedimentov v oblasti Chemka Strážske, čiže nanobiodegradáciou.

Materiál a metódy

Syntéza bionanočastíc železa

Na prípravu bionanočastíc železa sa použila káva Bellarom – Brazil (100 % arabica) a po jej použití, aj zozbieraná kávová usadenina. Tieto materiály sa následne extrahovali vodou bez prístupu svetla (aby nedošlo k fotooxidácii polyfenolov). Do takto pripravených extraktov sa pridala železnatá soľ ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a syntéza bionanočastíc prebiehala 48 h na rotačnej trepačke pri 20 °C. Polovica bionanočastíc sa syntetizovala vo vzdušnej atmosfére a polovica v atmosfére inertného plynu – argónu. Pripravené bionanočastice sa scentrifugovali a následne sa použili na degradáčnejšie experimenty.

Degradáčnejšie experimenty

Degradácia PCB prebiehala dvomi typmi experimentov (oba vo vzdušnej atmosfére) – aplikáciou bionanočastíc a sekvenčnou aplikáciou bionanočastíc a baktérií adaptovaných na PCB, *Stenotrophomonas maltophilia* a *Ochrobactrum anthropi*.

Aplikácia samotných bionanočastíc železa

Do reagenčných fliaš sa pridalo minimálne minerálne médium (100 ml), prídavok Deloru 103 (priemyselná zmes PCB) ($0,1 \text{ g.l}^{-1}$) a pripravené bionanočastice (3 ml). Následne prebiehala inkubácia na rotačnej trepačke pri 25 °C po dobu 7 a 14 dní.

Sekvenčná aplikácia bionanočastíc železa a baktérií adaptovaných na PCB

Do reagenčných fliaš sa pridalo minimálne minerálne médium (100 ml), prídavok

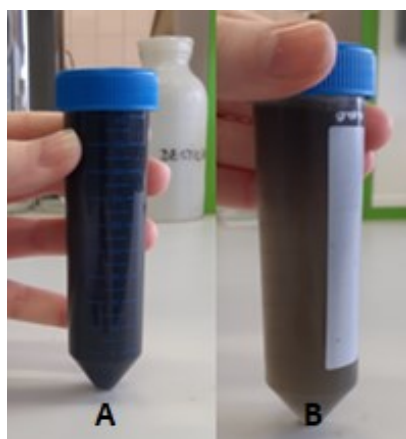
Deloru 103 ($0,1 \text{ g.l}^{-1}$), pripravené bionanočastice (3 ml) a nasledovala 7-dňová inkubácia na rotačnej trepačke. Po inkubácii sa obsah reagenčných fliaš preliat do Erlenmayerových baničiek, uzatvorených vatovou zátkou (vzdušná atmosféra), pridala sa biomasa *Stenotrophomonas maltophilia* alebo biomasa *Ochrobactrum anthropi* (1 g.l^{-1}). Inkubácia pokračovala ďalej po dobu 14 dní.

Nedegradované PCB sa z vodného prostredia vyextrahovali do n-hexánu a následným meraním všetkých vzoriek (merané v tripletoch) na plynovom chromatografe s ECD sa analyzovalo sedem kongenéro PCB : PCB 8 (2,4'-CB), PCB 28 (2,4,4'-CB), PCB 52 (2,2',5,5'-CB), PCB 101 (2,2',4,5,5'-CB), PCB 118 (2,3',4,4', 5-CB), PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-CB) a PCB 138 (2,2',3,4,4',5-CB).

Výsledky a diskusia

Syntéza bionanočastíc železa

Po pridaní prekursora Fe do vodného extraktu bolo možné pozorovať okamžitú zmenu farby z tmavo-hnedej na čiernu u kávy a na tmavo-zelenú u kávovej usadeniny. Zároveň sa vytvoril precipitát, ktorý postupne sedimentoval na dno nádoby. Na základe tohto optického zistenia vieme povedať, že nastala syntéza bionanočastíc železa, čo potvrdzuje aj literatúra [6].

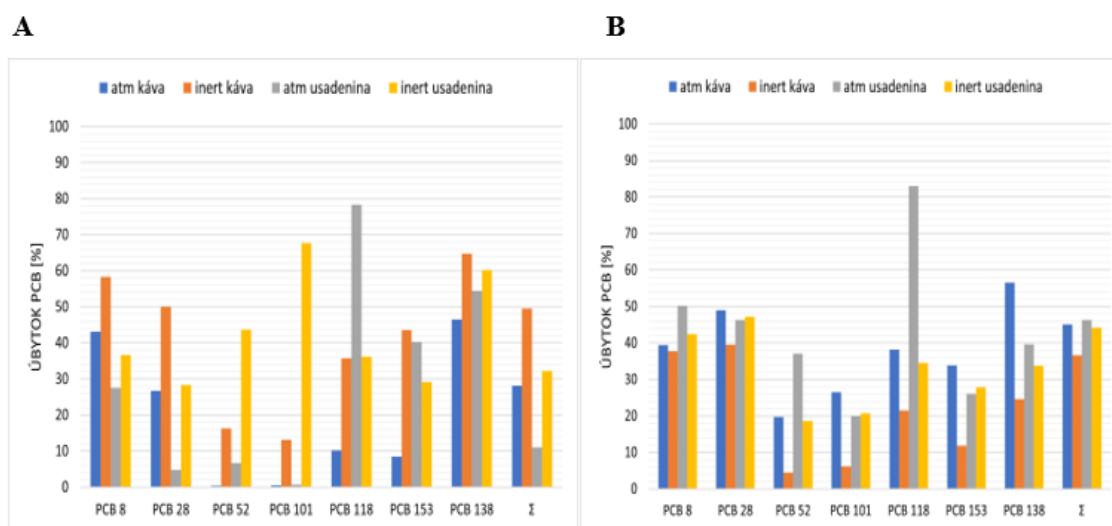


Obr. 1. Syntéza bionanočastíc z kávy a z kávovej usadeniny po pridaní železnatej soli.
A – káva, B – kávová usadenina.

Aplikácia samotných bionanočastíc železa

Vyhodnotenie degradácie PCB samotnými bionanočasticami železa, kde inkubácia trvala 7 a 14 dní je zobrazené na obr. 2. a obr. 3. Po 7-dňovej inkubácii bionanočastice železa z kávy a z kávovej usadeniny pripravené v inertnej atmosfére, vykazovali oveľa vyššiu degradačnú aktivitu takmer u všetkých siedmich kongenéro PCB v porovnaní s

bionanočasticami pripravenými vo vzdušnej atmosfére. Po 14-dňovej inkubácii bol pozorovaný opačný výsledok. Tento jav mohol byť zapríčinený tým, že bionanočastice pripravené v inertnej atmosfére zoxidovali počas degradácie rýchlejšie ako tie, ktoré boli pripravené vo vzdušnej atmosfére a tým pádom klesla ich účinnosť degradácie a začali tvoriť agregáty. Z obr. 2. vyplýva, že bionanočastice železa z kávy pripravené v inertnej atmosfére majú o 22 % vyššiu degradáciu sumy všetkých 7 kongenéro PCB, ako bionanočastice pripravené vo vzdušnej atmosfére. Pri bionanočasticách železa z kávovej usadeniny pozorujeme približne rovnaký percentuálny rozdiel (21 %) úbytku sumy všetkých 7 kongenéro PCB medzi bionanočasticami pripravenými v inertnej a vo vzdušnej atmosfére. Bionanočastice z kávy poskytovali lepšiu degradačnú schopnosť počas 7-dňovej inkubácie. Po 14 dňoch inkubácie je rozdiel v percentuálnych úbytkoch sumy všetkých kongenéro PCB medzi bionanočasticami pripravenými v inertnej a vzdušnej atmosfére oveľa menší. Pri usadenine sú to 2 % a pri káve 8 %. Z výsledkov sa javí, že dlhšia doba inkubácie je na degradáciu PCB efektívnejšia. Kávová usadenina obsahuje menej bioaktívnych látok ako káva. V procese jej prípravy bola časť týchto látok rozpustená vo vodnom prostredí a časť pretrvala v kávovej usadenine. Preto sa domnievame, že káva ako bohatší zdroj týchto látok je schopná tvoriť väčšie množstvo bionanočastíc železa. Daný kávový odpad je však využiteľný na úspešnú prípravu bionanočastíc, ktoré sú následne schopné efektívne degradovať PCB.

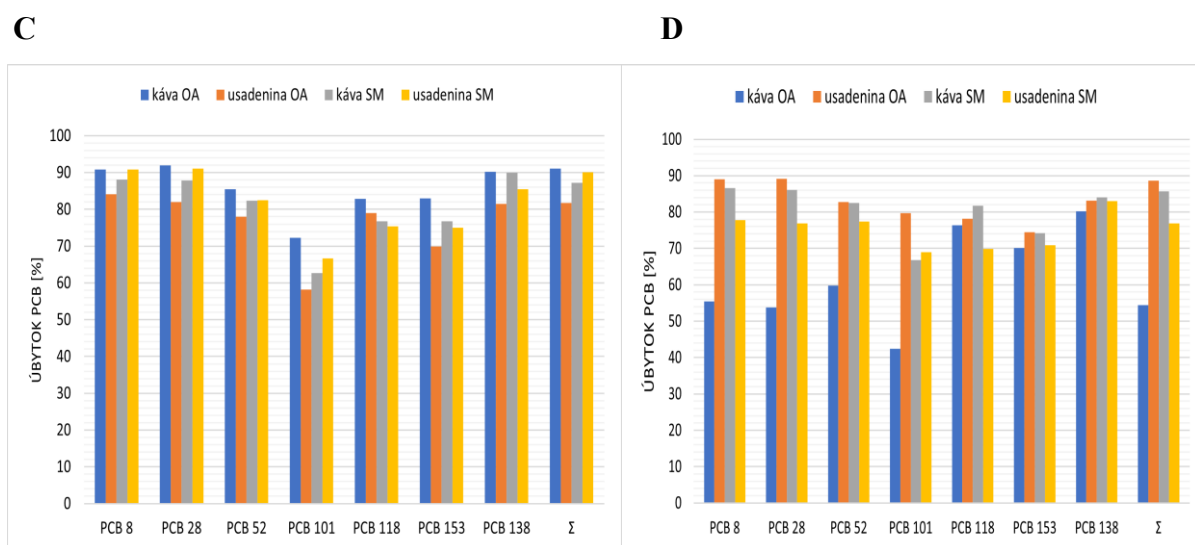


Obr. 2. Percentuálny úbytok kongenéro PCB počas 7-dňovej (A) a 14 dňovej (B) aplikácie bionanočastíc.

Sekvenčná aplikácia bionanočastíc železa a baktérií adaptovaných na PCB

Vyhodnotenie druhého typu experimentu je zobrazené na obr. 4. a obr. 5. Degradácia PCB sekvenčnou aplikáciou bionanočastíc a baktérií sa javí oveľa účinnejšia v porovnaní

s prvou metódou. Podľa informácií z literatúry [2] predpokladáme, že prvotná degradácia samotnými bionanočasticami spôsobila dechloráciu viac chlórovaných kongenéroch na kongenéry s nižším počtom chlórov a tak boli tieto kongenéry prístupnejšie pre následnú degradáciu pridanými baktériami. Najvyššiu degradačnú schopnosť vykazujú bionanočastice železa z kávy pripravené v inertnej atmosfére spolu s *Ochrobactrum anthropi* (91 %). 90 % úbytok PCB bol dosiahnutý aplikovaním bionanočastíc železa z kávovej usadeniny v inertnej atmosfére spolu s biomasou *Stenotrophomonas maltophilia*. Baktérie *Ochrobactrum anthropi* mali podobnú degradačnú účinnosť ako *Stenotrophomonas maltophilia* s bionanočasticami z kávovej usadeniny rovnako tak aj z kávy, pripravenými v inertnej atmosfére s bionanočasticami pripravenými vo vzdušnej atmosfére vidieť značné rozdiely. Bionanočastice pripravené v inertnej atmosfére spolu s baktériami vykazujú vyšší percentuálny úbytok PCB takmer všetkých siedmich kongenéroch PCB ako bionanočastice pripravené vo vzdušnej atmosfére.



Obr. 3. Percentuálny úbytok kongenéroch PCB aplikovaním bionanočastíc pripravených v inertnej (C) a vo vzdušnej atmosfére (D) s následným prídavkom baktérií. OA – *Ochrobactrum anthropi*; SM – *Stenotrophomonas maltophilia*.

Záver

Zelená syntéza bionanočastíc železa z bioaktívnych látok obsiahnutých v káve alebo kávovej usadenine prebehla úspešne. Zistili sme, že bionanočastice železa pripravené v inertnej atmosfére vykazovali takmer vo všetkých prípadoch v oboch typoch experimentu vyššiu schopnosť degradovať PCB ako tie, ktoré boli pripravené vo vzdušnej atmosfére. Z výsledkov taktiež vyplýva, že najlepšia metóda na degradáciu perzistentných polutantov PCB je aplikácia

bionanočastíc železa z kávy, rovnako tak z kávovej usadeniny, pripravených v inertnej atmosfére v následnej kombinácii s baktériami adaptovanými na PCB. Samotné bionanočastice z kávy vykazovali lepšiu degradačnú schopnosť ako z kávovej usadeniny, preto sú vhodnejším materiálom na prípravu bionanočastíc železa, avšak nám slúžili len na porovnanie a pre použitie v praxi počas remediácií sú samozrejme doporučované bionanočastice pripravené z odpadu, teda z kávovej usadeniny.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Behera A., Patra N., Mittu B. (2020) Multifunctional hybrid nanomaterials for sustainable agri-food and ecosystems, p. 639
- [2] Horváthová H., Dercová K., Tlčíková M. (2022) Chem. Listy 116(7), p. 405
- [3] Kumar K., Yadav A., Kumar V. (2017) Bioresources and Bioprocessing 4(1), p. 1
- [4] Kuppusamy S., Thavamani P., Megharaj M. (2015) Environm. Tech. and Innovation 4, p.17
- [5] Di Guardo A., Raspa G., Terzaghi E. (2020) Sci. of the Total Environm. 747, p. 141477
- [6] Rana A., Yadav K., Jagadevan S. (2020) Journal of Cleaner Production 272

Porovnanie monokultúr hybridných topoľov (*Populus x canadensis*) a lužných lesov z hľadiska diverzity podrastu

Karolína Gelaticová

Centrum biológie rastlín a biodiverzity Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Oddelenie biodiverzity a ekológie, Dúbravská cesta 9, 845 23 Bratislava, Slovenská republika; karolina.gelaticova@savba.sk

Abstract

Comparison of hybrid poplar monocultures and floodplain forests based on herb layer diversity

In this work, we compared natural floodplain forests and monocultures of hybrid poplars in terms of undergrowth diversity. We used 106 phytocenological relevés. We obtained 17 of our records by phytocenological imaging according to the methodology of the Zurich-Montpellier School [1, 2] on the area of 400 m² during the vegetation season in 2018. We compared the differences in the representation of neophytes and diagnostic species using a paired t-test in the statistical program R-software (R Core development team 2012). The representation of diagnostic species and their cover tested by paired t-test were higher in natural floodplain forests. On the contrary, the values of the presence and cover of neophytes were lower in natural floodplain forests. The results point to the adverse impact of planting hybrid poplar monocultures on the diversity and invasion of the area and point to the need to change the approach in forestry.

Keywords: *monoculture replacement plantings; twin plots method; plant functional groups*

Úvod a formulácia cieľa

Lužné lesy sú typické ich špecifickými rastlinnými spoločenstvami viazanými na pravidelné povodne. Okrem toho o ich vzniku rozhoduje aj hladina podzemnej vody a pôdna vlhkosť [3]. Pôvodné územia, ktoré vplyvom človeka z anikli, začali intenzívnym hospodárením nahrádzať plantáže introdukovaných alochtónnych druhov drevín. Po desiatkach rokov sa tak veľká časť územia lužných lesov premenila na rozsiahle plantáže nepôvodných topoľových kultivarov [4]. Tieto zmeny boli sprevádzané aj zmenami floristického zloženia bylinnej vrstvy [5], poklesom počtu pôvodných druhov a zvýšením počtu a pokryvnosti neofytov [6].

Cieľom práce bolo porovnanie diverzity a invadovanosti podrastu v lužných lesoch s prirodzeným druhovým zložením a náhradných výsadbách monokultúr hybridných topoľov pomocou párových zápisov (twin plots method).

Zaujímavé územie terénneho výskumu zahŕňa lokality lužných lesov inundačného územia pozdĺž rakúskeho, slovenského a maďarského toku Dunaja a Mošonského Dunaja. V Rakúsku sa jednalo o územie Národného parku Donau-Auen, na slovenskom úseku boli lokality rozmiestnené od Bratislavy po Veľký Lél a v Maďarsku od Dunasziget po Národný park Duna-Dráva. Výskum tiež prebiehal pozdĺž Moravy v blízkosti Moravského Sv. Jána a

Malých Levárov; Váhu v Kolárove a Šali; Malého Dunaja pri obci Potônske Lúky a v CHKO Latorica pozdĺž riek Latorica (pri obci Leles, Kráľovský Chlmec a Sv. Mária) a Laborec (v PR Raškovský luh a pri obci Ižkovce).

Materiál a metódy

Lokality pre párové zápisy boli vyberané prostredníctvom L-GIS – Lesníckeho geografického informačného systému (<http://gis.nlcsk.org/lgis/>). Následne sme výber vhodných lokalít preverili terénnym prieskumom.

V práci sme použili 106 fytocenologických zápisov. 17 zápisov sme získali fytocenologickým snímkaním počas vegetačnej sezóny 2018. Ako ďalší zdroj informácií pre analýzy slúžili fytocenologické zápisy Mikulovej (2015 – 2019), Slabejovej (2015 – 2019), Zedníčka (2016), Šibíkovej (2014 – 2019) a Jarolímk (2014 – 2019). Fytocenologické zápisy sme získali podľa metodiky zürišsko-montpelliarskej školy [1, 2] na ploche 400 m². Odhad pokryvnosti etáží sme zaznamenali pomocou rozšírenej Braun-Blanquetovej kombinovanej 9-člennej stupnice pokryvnosti a početnosti [2]. Poloha zápisov bola zameraná pomocou GPS (GARMIN 600t). Nomenklatúra taxónov je zjednotená podľa Marholda a Hindáka [7], nomenklatúra syntaxónov podľa Jarolímk a Šibíka [8].

Párové zápisy sme vždy zaznamenávali na lokalitách s rovnakou nadmorskou výškou, orientáciou svahu, sklonom a typom pôdy, na rovnakej ploche a v čase vegetačného optima. Jediným rozdielom medzi porastami bol dominantný druh dreviny. S cieľom maximalizovať jednotnosť údajov z hľadiska podmienok prostredia boli zápisy získané na relatívne malej a homogénnej ploche. Vzdialenosť medzi párovými zápsmi bola do 200 m. Aby sme vylúčili vplyv okrajového efektu, ktorý v lesoch siaha do vzdialenosti 30 m od okraja porastu, stanovili sme minimálnu vzdialenosť párových zápisov na 50 m.

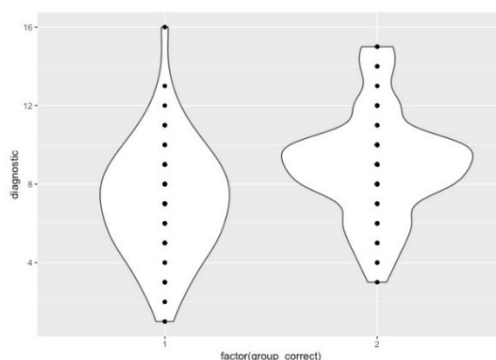
Dáta boli uložené do elektronickej podoby pomocou programu TURBOVEG [9] a boli ďalej spracované pomocou softvéru JUICE [10]. V pripravenom datasete sme v programe JUICE [10] kvôli vypočítaniu počtu a pokryvnosti neofytov a diagnostických druhov označili neofyty podľa Zoznamu nepôvodných druhov Slovenska [11]. Diagnostické druhy pre zväz *Salicion albae* a podzväz *Ulmenion* sme označili na základe relevantných publikácií (Hardwood floodplain forests in Slovakia: syntaxomical revision [12]; Diagnostic, constant and dominant species of the higher vegetation units of Slovakia [8]; Fragmentation of hardwood floodplain forests – how does it affect species composition? [13] a Katalóg biotopov Slovenska [14]). Pre každý zápis bol vypočítaný počet a pokryvnosť neofytov a druhov diagnostických pre lužné lesy.

Rozdiely v zastúpení neofytov a diagnostických druhov boli porovnané v rámci jednotlivých dvojíc pomocou párového t-testu v štatistickom programe R-software (R Core development team 2012, normalita rozdelenia bola testovaná pomocou Shapiro-Wilcoxon testu). Výsledky boli vizualizované pomocou husľového grafu (violin plot, R-software, package ggplot2).

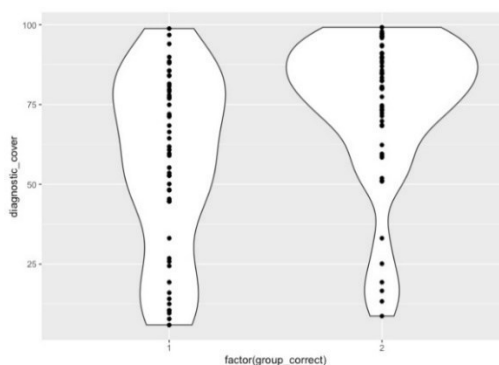
Výsledky a diskusia

V prípade funkčných skupín rastlín boli vo všetkých pozorovaných faktoroch rozdiely signifikantné, pričom najväčší rozdiel možno pozorovať pri pokryvnosti neofytov. Pomocou párového t-testu sme dokázali rozdielnosť v zastúpení funkčných skupín rastlín (konkrétne v počte a pokryvnosti neofytov a diagnostických druhov) lokalít v lužných lesoch s prirodzeným druhovým zložením a lokalít v náhradných výsadbách monokultúr hybridných topoľov.

Výsledky ukazujú, že prirodzené lužné lesy boli z hľadiska zastúpenia diagnostických druhov v porovnaní s monokultúrami bohatšie. V monokultúrach hybridných topoľov bola zaznamenaná väčšia variabilita v počte diagnostických druhov (Obr. 1.).



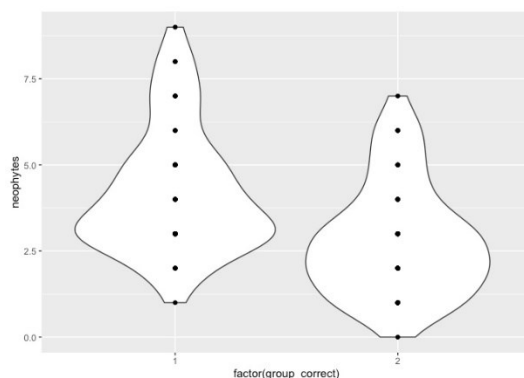
Obr. 1. Porovnanie počtu diagnostických druhov u monokultúr a lužného lesa



Obr. 2. Porovnanie pokryvnosti diagnostických druhov u monokultúr a lužného lesa

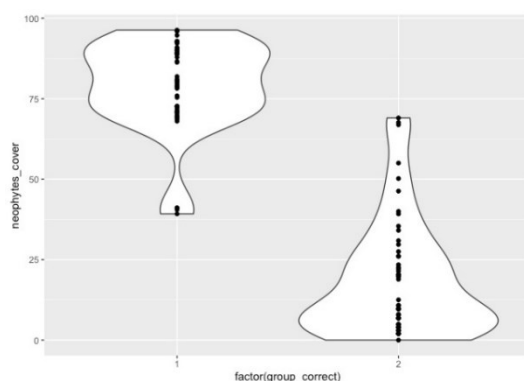
V prirodzených lužných lesoch bola aj výrazne vyššia pokrývnosť diagnostických druhov, pričom najčastejšia hodnota bola 90 % (Obr. 2).

Najčastejší počet neofytov v prirodzených lužných lesoch bol približne 2. V monokultúrach bola táto hodnota približne o 1 hodnotu vyššia – 3.1. Subdataset lokalít v prirodzených lužných lesoch je však bližšie hodnote nula a v porovnaní s subdatasetom monokultúr nepresahuje hodnotu 7.5 neofytov v zápise (Obr. 3).



Obr. 3. Porovnanie počtu neofytov u monokultúr a lužného lesa

V prípade pokrývnosti neofytov výsledky ukazujú medzi prirodzenými lužnými lesmi a monokultúrami výrazný rozdiel. Vo väčšine zápisov v monokultúrach sa pokrývnosť neofytov pohybovala od 70 % – 95 %. V prípade prirodzených lužných lesov sa pokrývnosť neofytov v zápisoch nachádzala v rozmedzí od 0 % – 25 % (Obr. 4).



Obr. 4. Porovnanie pokrývnosti neofytov u monokultúr a lužného lesa

V štúdií Petrášovej et al. (2013) [16] bol jedným z najvýznamnejších faktorov ovplyvňujúcich počet neofytov čas. Počet nepôvodných druhov sa v priebehu času zvyšoval,

čo zodpovedá nálezom z iných lužných biotopov [16, 17]. Čas významne ovplyvňuje aj pôvodnú druhovú bohatosť, ale s opačným efektom – počet pôvodných druhov v priebehu času klesá. Výsledky predloženej práce sú z časového hľadiska získané o 7 rokov neskôr ako posledné dáta zo štúdie Petrášová et al. (2013), pričom priemerný počet neofytov bol na hodnote 2, čo je rovnako ako je uvádzané z roku 2013. Priemerný počet v monokultúrach bol ešte vyšší, čo poukazuje na významnú úlohu monokultúr v podpore šírenia nepôvodných druhov v lužných lesoch.

Záver

V práci sme sa pokúsili zodpovedať otázku, či sa prirodzené lužné lesy líšia od monokultúr hybridných topoľov v diverzite podrastu. Na základe našich výsledkov môžeme konštatovať, že z hľadiska zastúpenia diagnostických druhov sú prirodzené lužné lesy bohatšie ako monokultúry. V prirodzených lužných lesoch bola aj výrazne vyššia pokryvnosť diagnostických druhov. Signifikantný bol aj rozdiel v prítomnosti a pokryvnosti neofytov medzi študovanými porastmi, pričom v prípade monokultúr boli hodnoty výrazne vyššie.

Dobre fungujúce lužné lesy dokážu poskytnúť viaceré ekosystémové služby, ako napríklad filtráciu vody, udržiavanie hladiny podzemnej vody, ochranu proti erózii. Zadržiavaním vody zas znižujú riziko povodní v ľudských sídlach. Taktiež majú významný vplyv pri zachytávaní emisií CO₂, čím prispievajú k zmierneniu zmeny klímy. To má pre našu spoločnosť dôležitý sociálny, ekonomický a ekologický prínos [18]. Regenerácia nížinných lužných lesov s využitím holistických princípov je preto viac ako žiadaná.

PodĎakovanie

Práca bola podporená projektmi APVV 16-0431 a Vega 119/19.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Braun-Blanquet J. (1964) Pflanzensozologie: Grundzüge der Vegetationskunde. Ed. 3. Springer, Wien; New York, p. 39
- [2] Westhoff V., van der Maarel E. (1973) The Braun-Blanquet approach. In: Whittaker R.H. (ed.), Ordination and classification of communities. W. Junk Publishers, The Hague, p. 617
- [3] Obidziński T., Symonides E. (2000) Acta Soc. Botanicorum Poloniae 69(4), p. 311
- [4] Pišút P. (1993a) Biocentrá v inundačnom území Dunaja rkm. 1806 – 1842. Fyziotaktická štúdia. I. Všeobecná časť. OEM ÚZE SAV, Bratislava, p. 1

- [5] Šomšák L. (1999) Flora and Vegetation Conditions in Floodplain Ecosystems. In: I. Mucha (ed.) Gabčíkovo Part of the Hydroelectric Power Project: Environmental Impact Review Based on Six Year Monitoring. Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, p. 241
- [6] Mikulová K., Jarolímek I., Bacigál T., et al. (2019) *Forests* 10(7), p. 548
- [7] Marhold K., Hindák F. (eds.) (1998) Zoznam nižších a vyšších rastlín Slovenska. Veda, Bratislava, p. 116
- [8] Jarolímek I., Šibík J. (eds.) (2008) Diagnostic, constant and dominant species of the higher vegetation units of Slovakia. Veda, Bratislava, p. 318
- [9] Hennekens S. M. (2005) TURBOVEG for Windows 2.16. International single user version. Stephan Hennekens © 1998–2005
- [10] Tichý L. (2002) JUICE, software for vegetation classification. *J. Veg. Sci.* 13, p. 451
- [11] Medvecká J., Kliment J., Májeková J., et al. (2012) *Preslia* 84, p. 257
- [12] Petrášová M., Jarolímek I. (2012) *Biologia* 67(5), p. 889
- [13] Šibíková M., Bacigál T., Jarolímek I. (2017) *Com. Ecol.* 18, p. 97
- [14] Stanová V., Valachovič M. (eds.) (2002) Katalóg Biotopov Slovenska. DAPHNE – Inštitút aplikovanej ekológie, Bratislava, p. 85
- [16] Petrášová M., Jarolímek I., Medvecká J. (2013) *For. Ecol. Manage.* 308, p. 31
- [17] Berg C., Drescher A., Wagner V., et al. (2016) *Preslia* 88, p. 185
- [18] Tóth A. (2016) *Zahrada-park-krajina* 26, p. 36

Úloha mozočka v naučenej vokálnej komunikácii dospelých spevavcov

Rebecca Geröfiová¹, Kristína Lukáčová¹, Ladislav Bačiak², Ľubica Niederoá¹

¹Ústav biochémie a genetiky živočíchov Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Centrum biovied, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovenská republika; rebecca.gerofiova@savba.sk

²Slovenská technická univerzita, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Centrálna laboratória, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

The role of the cerebellum in learned vocal communication in adult songbirds

Cerebellar dysfunctions in patients with cerebellum tumors, ischemia, injury, and lesions point to the role of the cerebellum (Cb) in human speech. Cb is necessary also for song learning. However, its role in adult songbirds has not been established. We created lesions in deep cerebellar nuclei (DCN), the major output of Cb, of adult male zebra finches (*Taeniopygia guttata*) and recorded their songs for up to 4 months. Magnetic resonance imaging (MRI) confirmed the correct position of the lesions. We found that the birds with DCN lesions sang longer songs from 3.5 months post-op, and it was due to a higher number of introductory notes and elongated song after introductory notes. The elongated song consisted of more song motifs as well as more syllables. In contrast, the motif duration was sung faster from 2 months post-op which was caused by faster singing of syllables, but not inter-syllable intervals. To sum up, we demonstrated that DCN lesions affect temporal features of the birdsong. These results indicate the involvement of Cb in learned vocalization also in adult songbirds.

Keywords: cerebellum; deep cerebellar nuclei (DCN); lesions; zebra finch; adult song

Úvod a formulácia cieľa

Úloha mozočka bola donedávna spájaná hlavne s reguláciou motoriky a svalového tonusu [1 – 2]. Mozoček má však významnú úlohu aj pri regulácii nemotorických funkcií, akou je kognícia [3]. Medzi takéto nemotorické funkcie sa radí aj ľudská reč, ktorá bola popísaná v spojitosti s mozočkovou aktivitou v jeho pravej časti [4]. Niektoré deficity reči, ako je napríklad ataxická dysartia, sú spájané s poruchou mozočka, kedy je fonácia a artikulácia reči zhoršená [5]. Môžeme tu pozorovať aj dysprozódii, pri ktorej dochádza k zmenám hlasitosti a tempa reči [6].

Ako vhodný animálny model na skúmanie vlastností naučenej vokalizácie sa využívajú spevavce, ktoré s ľudskou rečou zdieľajú veľa podobností v procese učenia a neuronálnych mechanizmov kontroly [7]. Mozoček spolu s kôrou a bazálnymi gangliami (BG) riadia proces osvojovania si reči v období detstva až po motoriku reči dospelých ľudí [8]. Pomocou anatomických štúdií sa u zebričky červenožobej (*Taeniopygia guttata*) prvýkrát poukázalo na prepojenie medzi hlbokými mozočkovými jadrami (DCN) a striatálnym jadrom Area X cez disynaptické spojenie v dorzálnnej talamickej zóne [9 – 10]. Elektrofyzologické štúdie a lézie potvrdili funkčné prepojenie Area X a DCN [11 – 12]. Stimuláciou DCN boli aktivované neuróny v jadre Area X a lézie v DCN negatívne ovplyvnili schopnosť mladých zebričiek

napodobňovať spev svojich tútorov (dospelých samcov). Mladí samci kopírovali menej slabík piesne. Týmto experimentom bola potvrdená úloha mozočka v procese učenia vokálnej komunikácie spevavcov. Zmeny v speve dospelých samcov po lézii DCN však autori nezistili [11]. Naproti tomu lézie Area X u dospelých zebričiek viedli k štrukturálnym zmenám v DCN, ktoré boli zaznamenané pomocou zobrazovania magnetickou rezonanciou (MRI) [12] a zmenami génovej expresie [13].

Zostáva teda nejasné, do akej miery ovplyvňujú DCN mozočka vokalizáciu dospelých spevavcov. Cieľom tejto štúdie bolo preskúmať vplyv neurotoxického poškodenia DCN na spev dospelých samcov zebričky červenozobej, pričom sme sa bližšie zamerali na temporálne vlastnosti vtácej piesne.

Materiál a metódy

Animálny model

Štúdia bola robená na 18 dospelých samcoch zebričky červenozobej z chovateľskej kolónie Centra biovied Slovenskej akadémie vied, Ústave biochémie a genetiky živočíchov. Štúdia bola schválená Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR. V priebehu experimentu sa spevavce nachádzali vo zvuk tlmiacich boxoch s teplotou 25 ± 3 °C, vlhkosťou 55 ± 5 % a svetelnými podmienkami 14L:10D. Potrava, voda a piesok boli k dispozícii *ad libitum*.

Stereotaxická operácia

Prvej skupine spevavcov sme vytvorili bilaterálne neurotoxické lézie v DCN (n=13), druhá skupina predstavovala kontrolu (n = 5). Počas operácie boli vtáky v anestézii izofluránom (1,5 – 2,7 %, 1 l/min). Lézie sme vytvorili pomocou 69 nl 1 % roztoku kyseliny iboténovej (pH 7,6; Sigma, USA), ktorú sme podali do každej hemisféry cez sklenenú kapiláru pripojenú k tlakovému injektoru Nanoject II (Drummond Scientific, USA). Uhol hlavy bol 50° a koordináty pre DCN boli RC: -2,7/-2,85, ML: $\pm 1,3$ a DV: -3,4/-3,3 od bodu, kde sa mozoček stretáva s hemisférami. Po operácii sme kožu prekryli akrylovým lepidlom a aplikovali lokálne anestetikum Mezocaine (Zentiva, SK). Následne po 1 h zotavovania pod vyhrievacou lampou sme zvieru umiestnili do boxu tlmiaceho zvuk, kde sme zaznamenávali spev.

Magnetická rezonancia

Trinášť samcov podstúpilo MRI vyšetrenie 3 dni po operácii za účelom overenia správneho umiestnenia lézie v DCN. Šestnásť sagitálnych rezov s hrúbkou 0,4 mm sme použili na lokalizáciu lézie pomocou sekvencie 2D fast multislice spin echo s parametrami (TR/TE/NEX=3000/80/12) s priestorovým rozlíšením 200 μ m a celkovým časom merania 10

min. Samce boli počas MRI vyšetrenia v inhalačnej anestézii (izoflurán, 1,5 – 1,7 %, 0,6 l/min.). Dychoú frekvenciu sme udržiavali okolo 50 bpm a okolitú teplotu na 39 °C.

Analýza správania

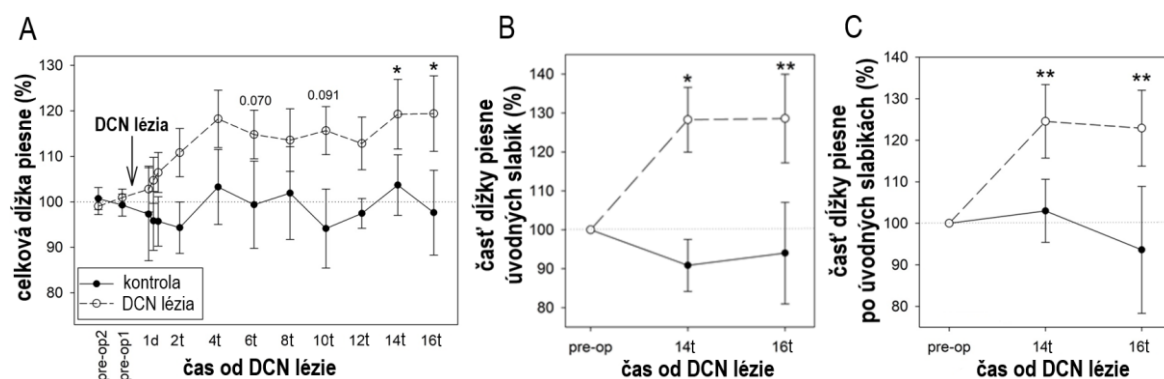
Pomocou softvéru Sound Analysis Pro (SAP, 2011) sme nahrávali nenasmerované piesne (spievané osamote). Analyzovali sme prvých 10 piesní z 2 dní pred operáciou a po operácii v prvých 3 dňoch (1d, 2d, 3d), v 2 týždňoch (2t) a následne každé 2 týždne až po 16. týždeň (16t). Zvyčajne pieseň zebričiek začína úvodnými slabikami, za ktorými nasledujú slabiky dávajúce vznik motívom piesne [14]. Pri analýze sme sa zamerali na: celkovú dĺžku piesne, časť dĺžky piesne úvodných slabík, časť dĺžky piesne po úvodných slabikách, celkový počet slabík piesne, počet úvodných slabík, počet slabík v časti piesne po úvodných slabikách, počet motívov, dĺžku motívov, dĺžku slabík a dĺžku medzi-slabikového priestoru. Získané dáta sme u každého jedinca normalizovali. Za 100 % sme považovali priemer hodnôt sledovaného parametra z dní pred operáciou a následne sme všetky hodnoty po operácii prepočítali na percentá k tomuto priemeru. Každú hodnotu sme prepočítali podľa vzorca $a_{norm} = 100 * a / \text{priemer}_{pre-op/post-op}$, kde a_{norm} predstavuje normalizovanú hodnotu a a je meraná hodnota. Párovým t-testom sme porovnávali 2 hodnoty z predoperačných dní. Jedno-faktorová ANOVA s opakovaním slúžila na porovnanie parametrov piesní pred a po lézii DCN, pričom faktor bol čas. Následne Dunnettov post-hoc test alebo Holm-Sidakov test analyzoval porovnanie jednotlivých pooperačných skupín s kontrolnou skupinou.

Výsledky a diskusia

Najprv sme zisťovali vplyv lézie na dĺžku celej piesne a potvrdili sme významný vplyv času na trvanie piesne (ANOVA: $p=0,003$). Nasledujúci Dunnettov test ukázal, že vtáky spievali dlhšie piesne po 14t a 16t po lézii DCN ($p=0,046$ a $0,039$; Obr.1A). Bližšia analýza odhalila, že predĺženie piesne v 14t a 16t bolo pravdepodobne zapríčinené dlhším trvaním časti piesne s úvodnými slabikami (ANOVA: $p=0,006$, Dunnettov test: 14t $p=0,010$; 16t $p=0,009$; Obr. 1B), ako aj dlhšou časťou piesne po úvodných slabikách (ANOVA: $p=0,006$, Dunnettov test: 14t $p=0,007$; 16t $p=0,006$; Obr. 1C).

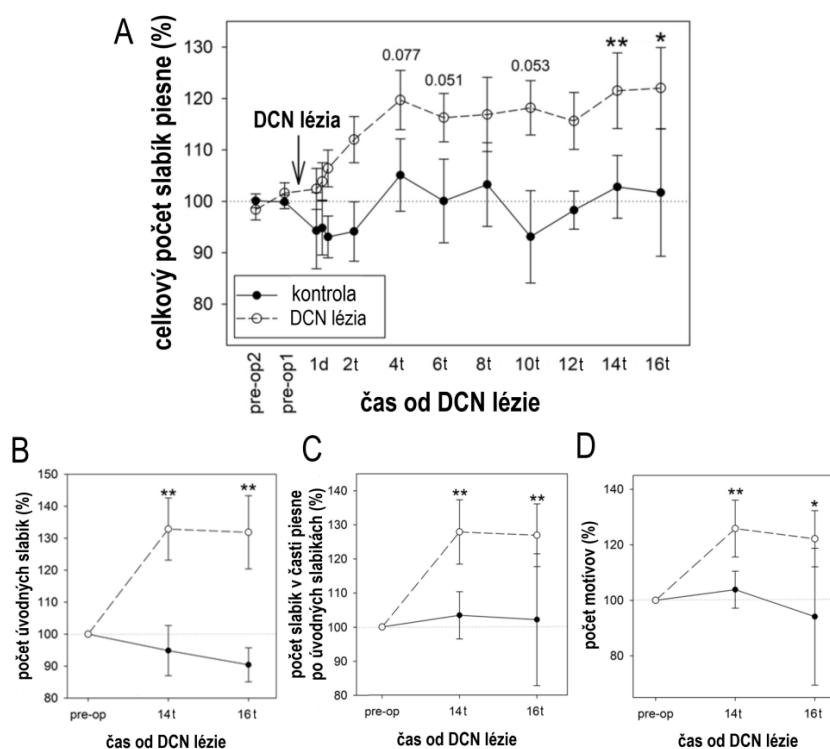
Ďalej sme skúmali, či dlhšie piesne po DCN léziách obsahovali aj viac slabík a motívov. Zistili sme, že čas ovplyvnil počet slabík v celej piesni (ANOVA: $p<0,001$), pričom sa pieseň skladala z výrazne väčšieho počtu slabík v 14t aj 16t po lézii DCN (Dunnettov test: 14t $p=0,008$; 16t $p=0,014$; Obr. 2A). Podrobnejšie analýzy odhalili, že sa zvýšil počet úvodných slabík (ANOVA: $p=0,002$; Dunnettov test: 14t $p=0,004$; 16t $p=0,002$; Obr. 2B), ako aj počet slabík v časti piesne po úvodných slabikách (ANOVA: $p=0,002$; Dunnettov test: 14t $p=0,004$;

16t $p=0,003$; Obr. 2C). Tieto slabiky tvorili motívy piesne, ktorých počet sa takisto zvýšil (ANOVA: $p = 0,006$; Holm-Sidak test: 14t $p=0,006$; 16t $p=0,010$; Obr. 2D).



Obr. 1. Dĺžka piesne. (A) dĺžka celej piesne; (B) časť dĺžky piesne úvodných slabík a (C) časť dĺžky piesne po úvodných slabikách. Každý graf znázorňuje priebeh spevu v čase od prvého predoperačného dňa po 16 týždeň po operácii. Hodnota meraného parametra 100 % je vyznačená bodkovanou priamkou. Jednotlivé časové body znázorňujú priemer a SEM. V prvom grafe šípka vyznačuje deň tvorby lézie v DCN.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

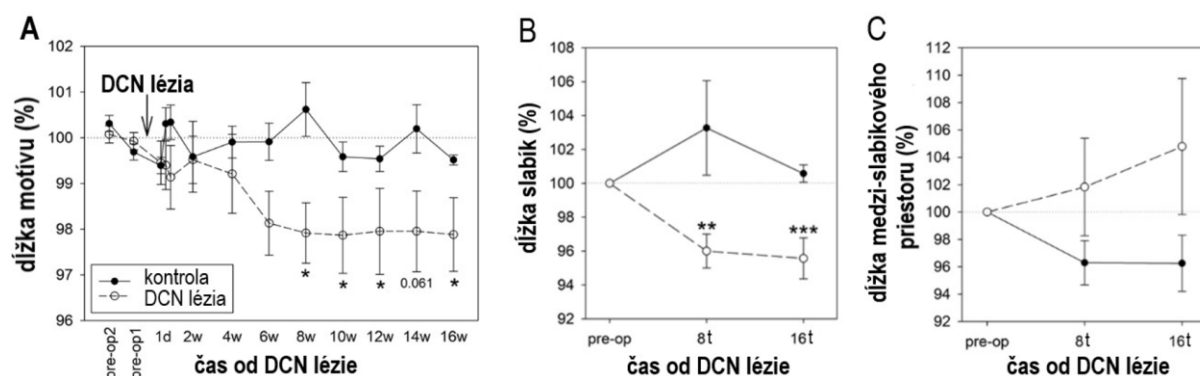


Obr. 2. Počet slabík piesne. (A) celkový počet slabík piesne; (B) počet úvodných slabík; (C) počet slabík v časti piesne po úvodných slabikách a (D) počet motívov. Každý graf znázorňuje priebeh spevu v čase od prvého predoperačného dňa po 16 týždeň po operácii. Hodnota meraného parametra 100% je vyznačená bodkovanou priamkou. Jednotlivé časové body znázorňujú priemer a SEM. V prvom grafe šípka vyznačuje deň tvorby lézie v DCN. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

V ďalšej analýze sme skúmali, či DCN lézie ovplyvnili aj rýchlosť spievania. Preukázali sme, že dĺžka motívu sa zreteľne skrátila od 8t (ANOVA: $p < 0,001$; Dunnettov test:

$p=0,010-0,026$ pre 8t-16t; Obr. 3A). Bližšia analýza preukázala, že motívy boli skrátené v dôsledku skrátenia jednotlivých slabík (ANOVA: $p<0,001$; Dunnettov test: 8t $p=0,002$; 16t $p<0,001$; Obr. 3B), ale dĺžka medzi-slabikového priestoru zostala neovplyvnená (ANOVA: $p=0,484$; Obr. 3C). Porovnateľný jav bol pozorovaný v speve vtákov po lézii Area X taktiež od 2. mesiaca, kedy sa zrýchlil spev [12, 15]. Takisto aj u ľudí poruchy mozočka, ako v prípade ataxickej dysartrie, mutizmu alebo Schmahmannovmu syndrómu, vedú k jazykovým nedostatkom spájaných napríklad s dysprozódiami (zmenou hlasitosti a rýchlosti reči), s dočasnou stratou reči alebo s agramatizmom [5–6, 17–18].

Podobne ľudia s dysfunkciou mozočka nie sú schopní správne rozoznať časové intervaly 10-150 ms, ktoré dĺžkou korešpondujú akustickým segmentom reči [19] a sú podobné dĺžkou slabikám spevu zebričky. Títo ľudia však nemajú problém rozoznať krátke časové intervaly do 10 ms, a podobne zebričky po lézii DCN nezmenili dĺžku medzi-slabikových intervalov v speve.



Obr. 3. Tempo piesne. (A) dĺžka motívu; (B) dĺžka jednotlivých slabík a (C) dĺžka medzi-slabikového priestoru. Každý graf znázorňuje priebeh spevu v čase od prvého predoperačného dňa po 16 týždňov po operácii. Hodnota meraného parametra 100% je vyznačená bodkovanou priamkou. Jednotlivé časové body znázorňujú priemer a SEM. V prvom grafe šípka vyznačuje deň tvorby lézie v DCN. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Záver

Naša štúdia ako prvá preukázala vplyv excitotoxických lézií DCN mozočka na naučený spev dospelých samcov zebričiek červenozobých. Naše výsledky naznačujú, že mozoček ovplyvňuje temporálne vlastnosti naučenej vokalizácie dospelých spevavcov. Takisto štúdie na ľuďoch s rečovými poruchami poukazujú na prepojenie mozočka s BG. Molekulárne mechanizmy týchto zmien však nie sú jasné a mohol by ich odhaliť ďalší výskum na spevavcoch.

PodĎakovanie

Táto práca bola podporená grantmi APVV-20-0344 a VEGA 2/0068/20.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Manto M., Mariën P. (2015) *Cerebellum Ataxias* 2, p. 2
- [2] Starowicz-Filip A., Chrobak A. A., Moskała M. (2017) *Psychiatr. Pol.* 51, p. 661
- [3] Mariën P., Borgatti R. (2018) *Handb. Clin. Neurol.* 154, p. 181
- [4] Petersen S. E., Fox P. T., Posner M. I. (1998) *Nature* 331, p. 585
- [5] Spencer K., Slocomb D. (2007) *Cerebellum* 6, p. 58
- [6] Casper M. A., Raphael L. J., Harris K. S. (2007) *Int. J. Lang. Commun. Disord.* 42, p. 407
- [7] Doupe A. J., Perkel D. J., Reiner A. (2005) *Trends. Neurosci.* 28, p. 353
- [8] Ziegler W., Ackermann H. (2017) *Clinical. Trends Neurosci.* 40, p. 458
- [9] Person A., Gale S. D., Farries M. A. (2008) *J. Comp. Neurol.* 508, p. 840
- [10] Nicholson D. A., Roberts T. F., Sober S. J. (2018) *J. Comp. Neurol.* 526, p. 1550
- [11] Pidoux L., Le Blanc P., Levenes C. (2018) *Elife* 7, p. e32167
- [12] Hamaide J., Lukacova K., Van Audekerke J. (2018) *NeuroImage* 181, p. 190
- [13] Lukacova K., Hamaide J., Baciak L. (2022) *Biology* 11(3), p. 425
- [14] Sossinka R., Böhner J. (1980) *Z. Tierpsychol.* 53, p. 123
- [15] Kubikova L., Bosikova E., Cvikova M. (2014) *Sci. Rep.* 4, p. 6590
- [16] Narula G., Hahnloser R. H. R. (2021) *Anim. Behav.* 175, p. 123
- [17] Manto M., Mariën P. (2015) *Cerebellum Ataxias* 2, p.2
- [18] Ashida R., Cerminara N., Brooks J. (2018) *Handb. Clin. Neurol.* 154, p. 45
- [19] Ackermann H., Graber S., Hertrich I. (1999) *Brain Lang.* 67(3), p. 228

Effect of Gestational Dim Light at Night on Pregnancy Outcomes and Offspring Development in Laboratory Rat

Tereza Gömoryová, Martina Morová, Lucia Olexová, Lucia Kršková

*Comenius University, Faculty of Natural Sciences, Department of Animal Physiology and Ethology, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak republic;
gomoryova6@uniba.sk*

Abstract

Exposure to low levels of artificial light at night (dim light at night, dLAN) is a common phenomenon that many people, including pregnant women, experience today. In our study, we utilized an animal model of gestational exposure to dLAN to study its effect on pregnancy outcomes and the development of rat pups. Gestation length, litter size and proportion of male offspring were compared between control dams exposed to dark nights (0 lx) and dams exposed to 2 lx dLAN throughout gestation. Offspring were checked for the achievement of developmental milestones (fur development, incisor eruption, pinna detachment, ear canal opening, eye opening, testicular descent, vaginal opening) and their neuromotor development was tracked (righting, air righting, negative geotaxis, bar holding test). Body weight was monitored for ~6 postnatal weeks. We found a trend for smaller litters in the dLAN-exposed rats. Analyses of other measures did not provide sufficient evidence to conclude a disruptive effect of dLAN on the selected parameters of prepubertal rat development.

Keywords: *dim light at night; somatic development; neuromotor development; laboratory rat*

Introduction and Objectives

For millions of years, humans and animals have evolved in the presence of a stable light-dark (LD) cycle, and their physiology and behavior adapted to these cyclic changes. The use of artificial light at night, while allowing us to stretch the period of daily activity into late hours, strips the light-dark cycle of its predictability, and is thought to disrupt sleep, hormone secretion and modulate mood [1 – 2]. It is estimated that more than 80 % of the human population lives under light-polluted skies [3]. Many people are exposed to low-intensity artificial light at night (dim light at night, dLAN) due to light trespass from streetlamps, or through the use of electronic devices at night [4]. Pregnant women make up a portion of this population and a study observed an association between higher levels of outdoor light at night and shorter pregnancy, lower birth weight and preterm birth [5]. The developing fetus is vulnerable to the effects of various environmental factors that increase the risks of neurodevelopmental disorders in susceptible individuals [6]. Multiple mechanisms by which a disturbance of the circadian system (a common effect of aberrant light exposure [7]) could contribute to developmental deficits have been suggested [8]. Some studies on laboratory animals have already explored the relationship between manipulation of gestational LD regime and offspring neurodevelopmental outcomes in adulthood, with multiple discovering increased

depressive- and anxiety-like behavior, lower sociability, and impaired cognition in the tested individuals [7, 9 – 11]. The effects on rat development in the earlier postnatal stages have received little attention so far. While the results of the scarce studies point to gestational exposure to light at night negatively impacting fetal physiology and early offspring development in laboratory rodents [7, 10, 12 – 13], most studies use phase shifts of the LD cycle or use the light of high intensity – sometimes up to 400 lx, a light level corresponding to that of a bright office [14]. While such models might, to some extent, mimic the regime shift workers are subjected to, they do not represent the conditions most people are routinely exposed to. For this reason, dLAN exposure – shown to impact the physiology and behavior of adult rats [15], and when applied prenatally shown to contribute to altered development of hormone secretion rhythms in preweaning rats [16] – has been chosen in our study as a more accurate model. We aimed to elucidate its effects on the somatic and neuromotor development of rat pups.

Materials and methods

The parental generation consisted of adult Wistar rats, 16 females and 8 males (Breeding Station of the Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology, Dobrá Voda, Slovak Republic). The animals were housed under standard LD regime 12:12. The ambient temperature was maintained at $21 \pm 1^\circ\text{C}$ and the humidity at $55 \pm 10\%$. The animals had standard laboratory chow (MP-OŠ-06) and water *ad libitum*. In females, the estrous cycle phase was determined daily by examination of vaginal smears. On the day of proestrus female rats were housed with a male rat overnight (2 – 3 females : 1 male). The day of the presence of spermatozoa in the vaginal smear was considered to be gestational day 0 (G0). Pregnant rats were then assigned to either the control group (LD 12:12, 200 lx: 0 lx, CTRL, n = 9) or a group exposed to dLAN from G0 until delivery (LD 12:12, 200 lx: 2 lx; dLAN, n = 7). Following parturition, all dams and their offspring were returned to control conditions. The experiment was approved by the Ethical Committee for the Care and Use of Laboratory Animals at Comenius University in Bratislava, Slovak Republic.

Gestation length, litter size and proportion of males and females in each group on a postnatal day (PND)1 were recorded, along with the offspring's body weight on PND1. Litters were adjusted to 4 pups of each sex per litter on PND2 – 4.

The body weight of offspring was measured daily from PND1 until weaning (PND21), with all females in a litter weighed together, and all males in a litter weighed together. After weaning, animals were weighed individually twice per week, the first time being on PND21 –

25 (depending on the litter) which corresponds to time point 1. A total of five postweaning weight measurements were taken, with four-day intervals between the time points 1 – 2, 3 – 4 and three-day intervals between the time points 2 – 3, 4 – 5. Achievement of developmental milestones was monitored on selected days as follows: fur eruption (PND6), incisor eruption (PND6 – 12), pinna detachment (PND8), ear canal opening (PND11 – 16), eye opening (PND12 – 17), testicular descent (PND15 – 30), vaginal opening (PND32 – 38). The age of the pups at the time of the milestone achievement was noted.

To study the effects of prenatal dLAN on neuromotor and reflex development of pups we employed the following tests: *righting reflex* (the latency to turn over from a supine position was noted; PND5), *air righting reflex* (the ability to turn mid-air from the supine position after being dropped above a padded surface and land on all four paws was evaluated; PND15 – 20), *negative geotaxis* (the latency to turn 180° after being placed on an inclined surface (25°) with the head facing down was measured; PND7 – 9), *bar holding test* (the time the pup kept hanging from an elevated bar by its forelimbs was measured, PND14 – 16).

All body weight measurements, somatic development observations and neuromotor and reflex tests were conducted in the mornings, usually starting immediately after lights were on.

Statistical analyses were conducted in Statistica 14.0 (TIBCO Software Inc., USA) and data visualization was performed in GraphPad Prism 9.5 (GraphPad Software, LLC, USA). Between-group differences in gestation length and litter size were evaluated by the Mann-Whitney test and t-test respectively, and the proportion of males in groups was compared by the Chi-square test. For other parameters, all analyses were conducted separately for each sex, and to control for litter effects, the mean values per litter (separate for each sex) were used. Both pre- and postweaning weights were analyzed by two-way repeated measures analysis of variance (RM ANOVA) (factors: group [CTRL vs. dLAN], age) with Greenhouse-Geisser correction. Parameters of somatic maturation and performance of the righting reflex and the air righting reflex (determined separately for each day) were analyzed by t-test or the Mann-Whitney test when the data remained non-normal even after transformation. Performance in the negative geotaxis test and the bar holding test was evaluated by two-way RM ANOVA (factors: group [CTRL vs. dLAN], age), in the case of negative geotaxis on log₁₀ transformed data. For *post hoc* analysis we used Unequal N HSD test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results and discussion

No significant differences between groups were seen in gestation length, the proportion of male offspring, or offspring body weight on PND1. These findings agree with other studies that exposed rodents to aberrant light regimes during pregnancy. The studies also reported a lack of significant difference between groups in litter size [11, 13]. While the between-group difference in this parameter did not reach statistical significance in our study either, we did observe a trend for smaller litters in dLAN compared to CTRL rats ($t_{14} = 2.14$, $p = 0.05$, Fig. 1.).

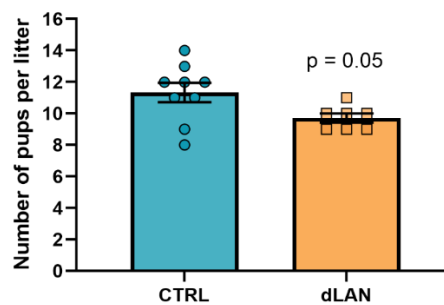


Fig. 1. Litter size in control rats (CTRL, $n = 9$) and rats exposed to dim light at night throughout gestation (dLAN, $n = 7$). Data represent the mean $\pm$ SEM.

Smaller litter size has been found, together with longer pregnancy and lower offspring birth weight, in mice exposed to 50 lx light at night throughout gestation. The authors also observed the disruptive effects of light at night on multiple parameters of female reproductive physiology, including a decrease in progesterone levels, that may have contributed to the outcomes [17].

Body weight kept increasing in both sexes both before (females: $F_{1.49, 20.84} = 2538.06$, $p < 0.001$, males: $F_{1.55, 21.67} = 2354.233$, $p < 0.001$) and after weaning (females: $F_{1.81, 25.28} = 3380.344$, $p < 0.001$, males: $F_{1.73, 24.29} = 2045.56$, $p < 0.001$) with no differences between groups during the pre-weaning period. After weaning, a trend for lower weight in dLAN males ($F_{1, 14} = 4.036$, $p = 0.06$) and a significant interaction of age*group in this sex could be seen ($F_{1.73, 24.29} = 4.802$, $p < 0.05$, Fig. 2.); however, post hoc analysis did not reveal significant differences between body weight of CTRL and dLAN males at any time point. The observed effect of prenatal LD cycle manipulations on body weight differs between studies with some finding increased, other decreased body weight in treated rodents and some not finding any difference [7, 9 – 13]. Nevertheless, because of the order in which litters were born in our study there was a one-day difference in the mean age of CTRL and dLAN pups at all postweaning weight measurement time points. Based on the weight gain rate in the days before weaning,

and on the estimated postweaning mean daily weight gain, we do not think it would be correct to attribute the observed results to the effect of treatment rather than age difference, nor discount the possible contribution of the prenatal insult.

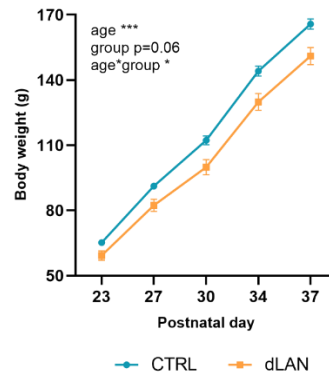


Fig. 2. Body weight changes in the period from weaning to adolescence in male rats of control group (CTRL) and group prenatally exposed to dim light at night (dLAN). The x-axis shows the mean age of the animals on the time points when the measurements were taken. Data represent the mean $\pm$ SEM. CTRL n = 9, dLAN n = 7. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

Fur and detached pinna were already present in all animals on the day of observation. We were unable to find significant differences between groups in the timing of incisor eruption, ear canal opening, eye opening, testicular descent and vaginal opening. The discrepancies between our results and those of some other studies could be because of the different timing of exposure and light intensities used [12 – 13]. No significant differences between groups were observed in either of the righting tests, nor in the latency to turn in the negative geotaxis test, although in this task, the effect of age on performance was significant both in males ($F_{2, 28} = 4.060$, $p < 0.05$) and females ($F_{2, 28} = 4.122$, $p < 0.05$), with animals requiring less time to turn on PND9 than on PND7. The differences in pups' endurance in the bar holding test did not prove to be significant between groups.

While the measures of early development seemingly have not been affected by prenatal dLAN, it is still possible that some consequences of the prenatal insult on offspring's physiology and behavior will manifest later during life, considering a study in mice found heightened anxiety-like behavior in adults prenatally exposed to 5 lx dLAN [9]. Also, compared to humans, in rats the nervous system is rather immature at birth and undergoes accelerated postnatal development [18]. It is, therefore, possible that prolonging the exposure to dLAN to include the week after birth could lead to more pronounced effects on rat development.

Conclusion

To our knowledge, our study is the first to investigate the effects of low-intensity light at night on the early somatic and neuromotor development of rat pups. We were unable to confirm a negative effect of prenatal exposure to dLAN on the observed measures of development. The trend for smaller litter size in dLAN-exposed dams hints at the possible effects of dLAN on the reproductive physiology of the dams. Further research using larger samples is needed to confirm the effect of gestational dLAN exposure on mothers, and both short- and long-term outcomes of offspring.

Acknowledgment

The study was supported by APVV-17-0178, APVV-20-0241, VEGA 2/0154/20 grants.

References

- [1] Stebelová K., Roška J., Zeman M. (2020) *Int. J. Mol. Sci.* 21(20), Art. No. 7736
- [2] Esaki Y., Obayashi K., Saeki K., et al. (2020) *Chronobiol. Int.* 37(6), p. 887
- [3] Falchi F., Cinzano P., Duriscoe D., et al. (2016) *Sci. Adv.* 2(6), Art. No. e1600377
- [4] Cao M., Xu T., Yin D. (2023) *J. Environ. Sci. (China)* 127, p. 589
- [5] Argys L. M., Averett S. L., Yang M. (2021) *South. Econ. J.* 87(3), p. 849
- [6] Doi M., Usui N., Shimada S. (2022) *Front. Endocrinol.* 13, Art. No. 860110
- [7] Vilches N., Spichiger C., Mendez N., et al. (2014) *PLoS ONE* 9(3), Art. No. e91313
- [8] Abdul F., Sreenivas N., Kommu J. V. S. (2022) *Rev. Neurosci.* 33(1), p. 93
- [9] Borniger J. C., McHenry Z. D., Abi Salloum B. A., et al. (2014) *Physiol. Behav.* 133, p. 99
- [10] Zhang P., Li G., Li H., et al. (2017) *Sci. Rep.* 7(1), Art. No. 12641.
- [11] Smarr B. L., Grant A. D., Perez L., et al. (2017) *Sci. Rep.* 7(1), Art. No. 3326
- [12] Fontanetti P. A., de Lucca R. C., Mandalunis P. M., et al. (2013) *Arch. Oral. Biol.* 58(11), p. 1643
- [13] Xu L. N., Li H. T., Liu S., et al. (2022) *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 241, Art. No. 113723
- [14] Gaston K. J., Bennie J., Davies T. W., et al. (2013) *Biol. Rev.* 88(4), p. 912
- [15] Molčan L., Šutovská H., Okuliarová M., et al. (2019). *Life Sci.* 231, Art. No. 116568.
- [16] Dzirbiková Z., Stebelová K., Kováčová K., et al. (2022) *Int. J. Mol. Sci.* 23, p. 14544
- [17] Das M., Minocha T., Kumar D., et al. (2022) *Photochem. Photobiol. Sci.* 21(7), p. 1217
- [18] Zeiss C. J. (2021) *Toxicol. Pathol.* 49(8), p. 1368

Vybrané telesné parametre a parametre minerálnej kostnej denzity u žien trpiacich astmou

Tatiana Grejtáková, Darina Falbová, Lenka Vorobeľová

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra antropológie,
Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
grejtakovatana@gmail.com*

Abstract

Anthropometry and bone mineral density parameters in women with asthma

The aim of this study is to determine the relationship between the occurrence of asthma in women and anthropometric parameters and indices. The studied group consisted of 69 women aged 23-87 years with an average age of 59.32 ± 13.27 years. The group of women with asthma consisted of 44 women (with a mean age of 58.73 ± 12.36 years) and the comparison group consisted of 25 women (with a mean age of 60.36 ± 14.94 years). Subjects completed a validated questionnaire and their bone mineral density was measured using the MiniOmni device. Statistical analysis showed that women who had asthma had statistically significantly lower mean values of body height ($p = 0.014$) and Z-score ($p = 0.033$). On the other hand, statistically significantly higher mean values were recorded for body weight ($p = 0.011$), waist circumference ($p = 0.027$), BMI ($p = 0.001$) and WHtR ($p = 0.009$). The same results were observed in correlation analysis.

Keywords: *asthma, bone density; anthropometry*

Úvod a formulácia cieľa

Astma je zápalové ochorenie dolných dýchacích ciest typické svojou chronicitou, ktorá sa rozvinie pri dráždení dýchacích ciest alergénmi alebo inými látkami. Zápal spôsobuje nadmernú činnosť dýchacích ciest prejavujúci sa stiahnutím bronchiálneho svalstva, zvýšenou sekréciou sliznice a následne jej opuchom. Tento patofyziologický proces spôsobuje postihnutému sipot, dýchavičnosť, kašeľ a tlak na hrudníku, avšak tieto symptómy sa líšia v intenzite a frekvencii ich výskytu [1, 2].

Morbidita astmy sa rokmi zvyšuje a postihuje nielen dospelých, ale aj deti. V súčasnosti týmto ochorením trpí približne 300 miliónov ľudí [1]. Samotný výskyt astmy je podmienený aj vekom a pohlavím. U chlapcov pred obdobím puberty sa astma vyskytuje častejšie ako u dievčat, avšak počas dospievania a v dospelosti je prevalencia výskytu astmy vyššia u žien než u mužov. Tieto intersexuálne rozdiely sú dôsledkom rôznych anatomických, imunologických a hormonálnych faktorov. V prípade žien zohrávajú najdôležitejšiu úlohu pohlavné hormóny, čo zvyčajne signalizuje ťažší priebeh ochorenia, s čím súvisí aj zhoršená kvalita života [3, 4].

Dlhodobé užívanie inhalačných kortikoidov, ako jedna z foriem liečby astmy, predstavuje zvýšené riziko vzniku osteopénie či osteoporózy [5]. Cieľom práce je preto zistiť,

či existuje vzťah medzi vybranými antropometrickými parametrami, kostnou denzitou a výskytom astmy u žien v slovenskej populácii.

Materiál a metódy

Sledovaný súbor tvorilo 69 žien vo veku 23 – 87 rokov (s priemerným vekom $59,32 \pm 13,27$ rokov) pochádzajúcich z okresu Prešov. Súbor žien s astmou pozostával zo 44 žien (s priemerným vekom $58,73 \pm 12,36$ rokov) a porovnávací súbor tvorilo 25 žien (s priemerným vekom $60,36 \pm 14,94$ rokov). Použité dáta boli zozbierané od januára do februára 2023. Probandky, ktoré sa zúčastnili výskumu podpísali informovaný súhlas s účasťou na výskume a vyplnili validovaný dotazník. Biomedicínsky výskum je schválený aj etickou komisiou s číslom ECH19021. Použitý dotazník obsahoval otázky týkajúce sa zdravotného stavu jedincov, prioritne pľúcnych ochorení, fajčenia, užívania glukokortikoidov, vitamínu D, fyzickej aktivity a životného štýlu. Následne prebiehalo meranie minerálnej kostnej denzity na ľavej hornej končatine v distálnej časti vretennej kosti pomocou prístroja MiniOmni (Sunlight, Izrael). Výsledkom merania boli hodnoty T-skóre (hodnoty nad -1 SD boli vyhodnotené ako normálne; v rozmedzí od -1 SD do -2,5 SD ako osteopenické; pod -2,5 SD ako osteoporotické), Z-skóre (hodnoty nad -2 boli vyhodnotené ako normálne; pod a vrátane -2 ako znížená kostná denzita pod očakávaným rozsahom pre danú vekovú skupinu) a SOS (sound of speed). Hodnoty telesnej výšky a telesnej hmotnosti probandky uviedli vo validovanom dotazníku. Z antropometrických meraní bol jedincom zmeraný obvod pásu a obvod bokov. Z nameraných údajov boli vypočítané nasledovné indexy: BMI (Body Mass Index, index telesnej hmotnosti), WHR (Waist to Hip Ratio, pomer obvodu pásu k obvodu bokov) a WHtR (Waist to Height Ratio, pomer obvodu pásu k telesnej výške) podľa uvedených vzorcov:

$$\text{Body Mass Index (BMI)} = \text{telesná hmotnosť (kg)} / \text{telesná výška}^2 \quad [\text{I.}]$$

$$\text{Waist to Hip Ratio (WHR)} = \text{obvod pásu (cm)} / \text{obvod bokov (cm)} \quad [\text{II.}]$$

$$\text{Waist to Height Ratio (WHtR)} = \text{obvod pásu (cm)} / \text{telesná výška (cm)} \quad [\text{III.}]$$

Jednotlivé získané parametre boli štatisticky spracované v programe SPSS verzia 20.0. Normalita dát bola sledovaná Kolmogorovov-Smirnovovým testom. Pri premenných s normálnou distribúciou dát bol použitý dvoj výberový nezávislý T-test a pri premenných s nie

normálnou distribúciou dát bol použitý Mann-Whitneyov U-test. Na korelačnú analýzu asociácie prítomnosti astmy u žien a vybraných antropometrických parametrov či indexov a hodnôt kostnej denzity bol využitý Pearsonov korelačný test pre premenné s normálnou distribúciou dát a Spearmanov korelačný test pre premenné s asymetrickou distribúciou. Hodnoty na hladine významnosti $\alpha = 0,05$ s hodnotou významnosti $p < 0,05$ boli považované za štatisticky signifikantné.

Výsledky a diskusia

Pri porovnaní priemerných hodnôt vybraných antropometrických parametrov a indexov medzi klinickým súborom žien s astmou a porovnávacím súborom žien bez astmy boli zaznamenané štatisticky významné rozdiely (tab. 1). Ženy trpiace astmou vykazovali štatisticky významne nižšie priemerné hodnoty telesnej výšky ($p = 0,014$) a Z-skóre ($p = 0,033$). Štatisticky významne vyššie priemerné hodnoty boli zaznamenané pri telesnej hmotnosti ($p = 0,011$), obvode pásu ($p = 0,027$) a pri BMI ($p = 0,001$) a WHtR indexe ($p = 0,009$). Pri hodnotách T-skóre neboli zistené štatisticky významné súvislosti.

Tab. 1. Porovnanie antropometrických parametrov a indexov u žien vzhľadom na prítomnosť astmy.

N – počet jedincov, x – priemer, SD – smerodajná odchýlka, p – hodnota významnosti, TV – telesná výška, TH – telesná hmotnosť, BMI – Body Mass Index, WHR – Waist to Hip Ratio, WHtR – Waist to Height Ratio, SOS – sound of speed

Sledované parametre a indexy	Ženy s astmou			Porovnávací súbor			P
	N	priemer	SD	N	priemer	SD	
TV (cm)	44	161,955	5,742	25	165,920	7,059	0,014
TH (kg)	44	77,386	12,642	25	69,240	11,837	0,011
Obvod pásu (cm)	44	96,200	16,002	25	87,580	13,607	0,027
Obvod bokov (cm)	44	110,136	12,207	25	104,616	11,965	0,173
BMI (kg/m ²)	44	29,528	4,812	25	25,254	4,596	0,001
WHR	44	0,871	0,095	25	0,836	0,062	0,101
WHtR	44	0,594	0,102	25	0,530	0,086	0,009
T-skóre	44	-1,389	1,361	25	-0,916	1,630	0,201
Z-skóre	44	-0,159	1,134	25	0,556	1,575	0,033
SOS (m/s)	44	4032,800	132,641	25	4078,800	159,688	0,203

Korelačná analýza (tab. 2) medzi astmou a vybranými antropometrickými parametrami a indexami v súbore žien preukázala štatisticky významné súvislosti medzi výskytom astmy

a priemernými hodnotami telesnej hmotnosti ($p = 0,011$), telesnej výšky ($p = 0,014$), obvodom pása ($p = 0,027$), BMI ($p = 0,001$), WHtR ($p = 0,009$) a Z-skóre ($p = 0,033$). U žien s astmou vykazujú parametre telesnej hmotnosti, obvodu pása, BMI a WHtR pozitívny korelačný koeficient, z čoho vyplýva, že ženy trpiace astmou majú vyššie priemerné hodnoty týchto parametrov ako ženy, ktoré astmou netrpia. Negatívny korelačný koeficient vykazovali parametre telesnej výšky a Z-skóre, z čoho vyplýva, že astmatické probandky majú nižšie priemerné hodnoty týchto parametrov v porovnaní s porovnávacou skupinou žien. Yanik et al. [6] vo svojej štúdii zaznamenali, že hodnoty T- skóre a Z-skóre boli nižšie u porovnávacej skupiny, avšak rozdiel nebol štatisticky významný. Naša štúdia nezaznamenala súvislosti medzi hodnotami T-skóre a výskytom astmy no preukázala vyššie hodnoty Z-skóre u porovnávacej skupiny. Štúdia Wang et al. [7] zistila asociáciu medzi vysokými hodnotami BMI a prevalenciou astmy, no neuvádzajú štatisticky významné korelácie medzi BMI a výskytom astmy u žien s astmou a bez astmy. Podobne aj štúdia Petermann-Rocha et al. [8] zistila súvislosť medzi vyššími hodnotami BMI a obvodom pása u ľudí trpiacich astmou, avšak tieto dve štúdie neuvádzajú štatisticky významné korelácie nezávisle od pohlavia.

Tab. 2. Korelačná analýza medzi astmou a telesnými parametrami a indexami v sledovanom súbore

N – počet jedincov, r – korelačný koeficient, p – hodnota významnosti, TV – telesná výška, TH – telesná hmotnosť, BMI – Body Mass Index, WHR – Waist to Hip Ratio, WHtR – Waist to Height Ratio, SOS – sound of speed, $p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,001$

Sledované parametre a indexy	N = 69	
	r	P
Astma	1	-
TV (cm)	-0,296*	0,014
TH (kg)	0,306*	0,011
Obvod pása (cm)	0,267*	0,027
Obvod bokov (cm)	0,165	0,175
BMI (kg/m^2)	0,403**	0,001
WHR	0,199	0,101
WHtR	0,311*	0,009
T-skóre	-0,156	0,201
Z-skóre	-0,258*	0,033
SOS (m/s)	-0,155	0,203

Záver

Zistili sme štatisticky významné rozdiely vo vybraných antropometrických parametroch a indexoch medzi klinickým súborom žien s astmou a porovnávacím súborom žien bez astmy. Štatisticky významné nižšie priemerné hodnoty sme zaznamenali v klinickom súbore u žien pri telesnej výške a Z-skóre a štatisticky významne vyššie priemerné hodnoty pri parametroch telesnej hmotnosti, obvodu pása, BMI a WHtR indexe v porovnaní s kontrolnou skupinou. Identifikované štatisticky významné faktory, ktoré súvisia s astmou, môžu byť predmetom záujmu v klinickej praxi a môžu byť prínosné pre ďalšie jej sledovanie.

PodĎakovanie

PodĎakovanie patrí pľúcnej ambulancii PULMO s.r.o v Prešove a predovšetkým MUDr. Ľuboslave Frajtovej za možnosť realizácie výskumu. Táto publikácia je výsledkom realizácie projektov: KEGA 046UK-4/2023 a Vedeckého parku Univerzity Komenského v Bratislave podporeného z Operačného programu Výskum a vývoj financovaného z ERDF. [Grant number: ITMS 26240220086, ITMS2014p: 313021D075].

Zoznam použitej literatúry

- [1] Kumarathas I., Harsløf T., Andersen C. U., et al. (2020) Eur. Clin. Respir. J. 7(1), p. 1763612
- [2] Gordon B. R. (1996) Ear Nose Throat J. 75(2), p. 97
- [3] Zhang G. -Q., Bassios A., Rådinger M., et al. (2020) Expert Rev. Respir. Med. 14(6), p. 543
- [4] Kanyk J. A., Mastronarde J. G., McCallister J. W. (2011) Curr. Opin. Pulm. Med. 17(1), p. 6
- [5] Heffler E., Madeira L. N. G., Ferrando M., et al. (2018) J. Allergy Clin. Immunol. 6(3), p. 776
- [6] Yanik B., Ayrim A., Ozol D., et al. (2009) Clinics 64(4), p. 313
- [7] Wang L., Wang K., Gao X., et al. (2015) Respir. Med. 109(8), p. 955
- [8] Petermann-Rocha F., Rocha C., Martinez-Sanguinetti M. A., et al. (2019) Rev. Med. Chil. 147(6), p. 733

Vplyv rekreačnej športovej aktivity na obsah minerálov v kostiach u mladých dospelých

Frederika Hanuliaková, Lenka Vorobeľová, Darina Falbová, Viktória Kovalčíková, Barbara Matzenauerová, Dominika Lechmanová

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra antropológie,
Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
frederika1.hanuliakova@gmail.com*

Abstract

The effect of recreational sports activity on bone mineral content in young adults

The aim of this study was to examine the association between recreational physical activity and bone mineral content in young Slovak adults. Our sample consisted of 712 individuals (mean age 21.63 ± 2.36 years), with a predominance of women (492 female – mean age 21.32 ± 2.24 years, 220 male – mean age 22.31 ± 2.47 years). Data on physical activity were collected at the personal interview using a standardized questionnaire. The examined bone parameter (mineral content) was measured using diagnostic device InBody770. In the present study, a statistically significant association was found between recreational physical activity and mineral content values in bones. A more detailed analysis revealed a significant correlation with recreational sports activities in both sexes.

Keywords: recreational physical activity; bone; mineral content

Úvod a formulácia cieľa

Minerálne látky v ľudskom organizme zohrávajú veľmi dôležitú úlohu. Predstavujú esenciálne zložky potrebné pri mnohých regulačných, oxido – redukčných mechanizmoch a zároveň sú potrebné pre tvorbu kostí a zubov (vápnik, zinok, horčík). Minerálne látky tvoria približne 4 % z celkovej telesnej hmotnosti človeka, pričom až 8 % z nich je uchovávaných priamo v kostnom tkanive. Obsah minerálov v kostiach označujeme ako BMC – Bone Mineral Content [1].

Mineralizácia kostí je fyziologický proces, ktorý začína počas intrauterinného vývinu približne v treťom trimestri tehotenstva a pretrváva až do konca dospievania. Nadobúdanie BMC je ovplyvnené najmä hormonálnymi faktormi (70 – 80 %) a faktormi prostredia (20 – 30 %) [2]. Medzi najznámejšie exogénne faktory prostredia, ktoré sú schopné ovplyvniť hodnoty BMC zaraďujeme fyzickú aktivitu, sedentarizmus a diétne obmedzenia [3]. Ukázalo sa, že fyzická aktivita je schopná vo veľmi veľkej miere ovplyvňovať samotnú remodeláciu kostí a zároveň predstavuje vhodný nástroj na zlepšenie kostnej hmoty [4-5].

Čím sú hodnoty BMC vyššie, tým je kostné tkanivo hustejšie, silnejšie a menej náchylné na zlomeniny. BMC je možné merať v celom tele alebo na špecifických miestach ako je napríklad horná alebo dolná končatina. Hodnoty BMC sú vyjadrené v kilogramoch (kg)

a slúžia na výpočet BMD (Bone Mineral Density – kostná minerálna hustota). BMC a BMD sa považujú za najlepšie indikátory rizika osteoporózy a zlomenín [6].

Cieľom tejto štúdie je preskúmať vzťah medzi rekreačnou športovou aktivitou a obsahom minerálov v kostiach u mladých dospelých mužov a žien zo Slovenska.

Materiál a metódy

Analyzovaný súbor pozostával zo 712 jedincov kaukazoidnej variety mladej slovenskej populácie vo veku 18 – 30 rokov s priemerným vekom $21,63 \pm 2,36$. Zber údajov prebiehal na pracovisku Katedry antropológie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave (Prif UK). Prevažnú časť súboru tvorili ženy ($n = 492$) s priemerným vekom $21,32 \pm 2,24$, zatiaľ čo priemerný vek mužov ($n = 220$) bol $22,31 \pm 2,47$. Výskumu sa zúčastnili iba tí jedinci, ktorí vopred poskytli informovaný súhlas so spracovaním dát na vedecké účely v rámci projektu „Analýza biologických a behaviorálnych determinantov kvality a zdravia periférneho skeletu v ranej dospelosti“ schváleného etickou komisiou (ECH19021).

Dáta boli získané pomocou štandardizovaného dotazníka Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO), ktorý obsahoval základné informácie ako je pohlavie, vek, telesná výška (TV) a telesná hmotnosť (TH) a aj otázky týkajúce sa zdravotného stavu a životného štýlu probanda (fyzická aktivita, fajčenie, stravovacie návyky). V rámci pravidelnosti vykonávania fyzickej aktivity, skúmaní jedinci odpovedali na otázku „Ako často športujete?“, pričom na výber mali z viacerých možností (denne, 5 – 6 dní do týždňa, 3 – 4 dni do týždňa, 1 – 2 dni do týždňa, 1 – 3 dni do mesiaca, menej ako raz do mesiaca, nešportujem). Na základe získaných odpovedí boli následne rozdelení na dve kategórie: športujúci (denne, 5 – 6 dní do týždňa, 3 – 4 dni do týždňa, 1 – 2 dni do týždňa) a nešportujúci (1 – 3 dni do mesiaca, menej ako raz do mesiaca, nešportujem). V prípade otázok týkajúcich sa jednotlivých druhov športov (beh, posilňovanie, cyklistika, plávanie atď.) mali jedinci na výber z dvoch odpovedí (áno, nie).

Skúmaní jedinci následne podstúpili komplexnú analýzu zloženia ľudského tela pomocou diagnostického prístroja InBody 770. Prístroj InBody 770 využíva patentovanú technológiu BIA (bioelektrická impedančná analýza), pri ktorej dochádza k prechodu striedavého elektrického prúdu s nízkou intenzitou biologickými štruktúrami [7]. InBody 770 nám poskytol množstvo užitočných informácií vrátane množstva minerálnych látok v tele, obsahu minerálov v kostiach, podiele aktívnej telesnej hmoty, množstve viscerálneho tuku, svalového tkaniva či segmentálnu analýzu tela.

Na vyhodnotenie získaných dát sme použili program Microsoft Excel (2010) a štatistický program SPSS verziu 20.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). Na určenie normality dát sme použili Kolmogorovov-Smirnovov test a následne vhodný parametrický (t-test pre nezávislé výbery) alebo neparametrický test (Mann Whitney U test), jednofaktorovú analýzu rozptylu a Spearmanovu korelačnú analýzu. Výsledky štatistických analýz sú vyjadrené pomocou hodnoty významnosti (p). Za štatisticky významné boli považované hodnoty $p < 0,05$.

Výsledky a diskusia

Výsledky našej štúdie preukázali, že až 77,4 % mužov a 70,5 % žien z našej vzorky vykonávalo fyzickú aktivitu. Športujúci jedinci tak predstavovali prevažnú väčšinu sledovaného súboru (72,6 %), pričom zvyšných 27,4 % predstavovali jedinci, ktorí sa nezúčastňovali žiadnych športových aktivít. Signifikantné rozdiely v BMC medzi skupinami športujúcich a nešportujúcich jedincov boli zaznamenané v celom súbore ($p < 0,001$), ale aj v samostatnej skupine mužov ($p = 0,027$) a v samostatnej skupine žien ($p = 0,018$), pričom vyššie hodnoty BMC mali práve športujúci (Tab.1). Témou fyzická aktivita a BMC sa zaoberali viaceré štúdie ako je Grimm et al. (2016) a Bettis, Kim a Hamrick (2018), ktorí taktiež potvrdili jej pozitívny vplyv na hodnoty BMC.

Na základe získaných výsledkov sme realizovali podrobnejšiu analýzu zameranú na preskúmanie asociácií medzi konkrétnym druhom športu a BMC v závislosti od pohlavia. Medzi najčastejšie vykonávané športy u mužov patrili posilňovanie (58,5 %), beh (28,1 %) a cyklistika (24,6 %). V prípade žien to boli športy ako je posilňovanie (52,3 %), beh (27,5 %) a joga (15,3 %). U mužov bol zaznamenaný štatisticky významný vzťah v prípade tanečných športov ($p = 0,020$), zatiaľ čo v skupine žien boli zaznamenané viaceré signifikantné lineárne vzťahy, a to v prípade basketbalu ($p = 0,023$), volejbalu ($p = 0,011$) a jogy ($p = 0,012$; Tab. 2). Je dôležité poznamenať, že sme zaznamenali nielen pozitívnu, ale i negatívnu koreláciu.

Tab. 1. Obsah minerálov v kostiach (kg) u športujúcich a nešportujúcich mužov a žien.

Vysvetlivky: n – počet jedincov, SD – smerodajná odchýlka, p – hodnota významnosti

	Skupina	n	p	Priemer $\pm$ SD	Minimum	Maximum
Spolu	športujúci	517	< 0,001	3,02 $\pm$ 0,66	1,82	5,43
	nešportujúci	195		2,82 $\pm$ 0,61	1,94	5,53
Ženy	športujúci	346	0,018	2,66 $\pm$ 0,32	1,82	3,78
	nešportujúci	145		2,58 $\pm$ 0,33	1,94	3,60
Muži	športujúci	171	0,027	3,75 $\pm$ 0,57	2,49	5,43
	nešportujúci	50		3,53 $\pm$ 0,68	2,32	5,53

Tab. 2. Vzťah medzi obsahom minerálov v kostiach a rôznymi druhmi športu u fyzicky aktívnych mužov a žien

Vysvetlivky: n – počet jedincov, r – korelačný koeficient, p – hodnota významnosti

Druh športu		Muži (n = 171)	Ženy (n = 346)	Druh športu		Muži (n = 171)	Ženy (n = 346)
Beh	r	- 0,149	0,076	Volejbal	r	- 0,006	0,136
	p	0,051	0,160		p	0,935	0,011
Posilňovanie	r	0,022	0,036	Joga	r	- 0,078	-0,136
	p	0,774	0,502		p	0,308	0,012
Cyklistika	r	- 0,128	0,057	Bojové športy	r	0,104	0,052
	p	0,096	0,292		p	0,177	0,332
Plávanie	r	0,126	0,092	Tanečné športy	r	-0,177	-0,037
	p	0,100	0,087		p	0,020	0,493
Futbal	r	- 0,018	0,086	Basketbal	r	0,104	0,122
	p	0,818	0,109		p	0,177	0,023

Naše výsledky dokumentované v Tab. 3 ukazujú, že priemerné hodnoty BMC sú vyššie vo väčšine prípadov športujúcich žien (beh, posilňovanie, cyklistika, plávanie, futbal, basketbal, volejbal, bojové športy). Ich pozitívny vplyv na BMC potvrdzujú aj viaceré štúdie (futbal – Zouhal et al. 2020; posilňovanie – Chen et al. 2020). Štatisticky signifikantné rozdiely medzi nešportujúci a športujúcimi ženami, sme pozorovali v prípade basketbalu, volejbalu a jogy, pričom vyššie hodnoty BMC boli zaznamenané u športujúcich jedincov basketbalu a volejbalu (Tab. 3). Pozitívny vplyv volejbalu a plávania na hodnoty BMC je zaznamenaný aj v štúdií Valente-Dos-Santos et al. (2018).

Totožnú analýzu na základe rovnakých kritérií sme následne vykonali v prípade skupiny športujúcich mužov (n = 171). Štatisticky signifikantný rozdiel v BMC sme zaznamenali medzi skupinami mužov vykonávajúcimi a nevykonávajúcimi tanečné športy, pričom vyššie hodnoty BMC boli zaznamenané práve u netancujúcich mužov (Tab. 4). Zvýšené hodnoty BMC, ale štatisticky insignifikantné, boli zaznamenané u jedincov venujúcich sa posilňovaniu, plávaniu, basketbalu a bojovým športom (Tab. 4). Naše výsledky potvrdzujú štúdie Zribi et al. (2014), ktorá preukázala pozitívny vplyv basketbalu na BMC a štúdia Nygaard et al. (2015), ktorá sa zaoberala vplyvom posilňovania na BMC.

Tab. 3. Porovnanie priemerných hodnôt obsahu minerálov v kostiach (kg) u fyzicky aktívnych žien (n = 346) v závislosti od druhu športu.

Poznámky: n – počet jedincov, SD – smerodajná odchýlka, p – hodnota významnosti

		n	priemer ± SD	p			n	priemer ± SD	p
Beh	nie	251	2,65 ± 0,33	0,160	Volejbal	nie	326	2,65 ± 0,32	0,011
	áno	95	2,69 ± 0,31			áno	20	2,86 ± 0,37	
Posilňovanie	nie	164	2,65 ± 0,33	0,429	Joga	nie	293	2,68 ± 0,32	0,012
	áno	181	2,67 ± 0,32			áno	53	2,57 ± 0,32	
Cyklistika	nie	305	2,65 ± 0,32	0,292	Bojové športy	nie	341	2,66 ± 0,32	0,332
	áno	41	2,71 ± 0,33			áno	5	2,92 ± 0,60	
Plávanie	nie	303	2,65 ± 0,32	0,087	Tanečné športy	nie	313	2,66 ± 0,33	0,492
	áno	43	2,74 ± 0,32			áno	33	2,61 ± 0,26	
Futbal	nie	344	2,66 ± 0,32	0,109	Basketbal	nie	339	2,65 ± 0,32	0,024
	áno	2	3,02 ± 0,27			áno	7	2,92 ± 0,25	

Tab. 4. Porovnanie priemerných hodnôt obsahu minerálov v kostiach (kg) u fyzicky aktívnych mužov (n = 171) v závislosti od druhu športu.

Poznámky: n – počet jedincov, SD – smerodajná odchýlka, p – hodnota významnosti

		n	priemer ± SD	p			n	priemer ± SD	p
Beh	nie	123	3,80 ± 0,60	0,050	Volejbal	nie	155	3,75 ± 0,57	0,780
	áno	48	3,61 ± 0,47			áno	16	3,71 ± 0,63	
Posilňovanie	nie	70	3,74 ± 0,65	0,955	Joga	nie	170	3,75 ± 0,57	-
	áno	100	3,75 ± 0,51			áno	1	-	
Cyklistika	nie	129	3,78 ± 0,55	0,176	Bojové športy	nie	163	3,73 ± 0,56	0,104
	áno	42	3,64 ± 0,61			áno	8	4,07 ± 0,75	
Plávanie	nie	142	3,71 ± 0,57	0,100	Tanečné športy	nie	167	3,76 ± 0,56	0,016
	áno	29	3,90 ± 0,56			áno	4	3,07 ± 0,45	
Futbal	nie	138	3,75 ± 0,59	0,888	Basketbal	nie	165	3,73 ± 0,56	0,068
	áno	33	3,73 ± 0,51			áno	6	4,16 ± 0,74	

Záver

Naša štúdia preukázala významnú asociáciu medzi hodnotami BMC a rekreačnou fyzickou aktivitou. Pri podrobnejších analýzach sa nám podarilo preukázať signifikantný vzťah medzi basketbalom, volejbalom a jogou u žien a tanečnými športmi u mužov s BMC. U žien vo väčšine prípadov (beh, posilňovanie, cyklistika, plávanie, futbal, basketbal, volejbal, bojové športy) vykonávanie rekreačnej športovej aktivity pozitívne vplývalo na BMC. U mužov sme pozorovali pozitívny vplyv na BMC len v prípade posilňovania, plávania, basketbalu a bojových športov. Napriek tomu, že sú potrebné ďalšie výskumy, naše výsledky možno využiť v oblasti klinickej a športovej antropológie pre lepšie porozumenie vplyvu rekreačnej športovej aktivity na obsah minerálov v kostiach u mladých dospelých.

PodĎakovanie

Ďakujeme Katedre antropológie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, jej študentom a všetkým zúčastneným dobrovoľníkom, vĎaka ktorým bola príprava tohto článku možná. Táto publikácia je výsledkom projektu: Vedecký park Univerzity Komenského v Bratislave podporeného z Operačného programu Výskum a vývoj financovaného z ERDF. [Číslo grantu: ITMS 26240220086, ITMS2014p: 313021D075].

Zoznam použitej literatúry

- [1] Poráčová J., Koréneková B., Sedlák V., et al. (2017) Minerálne látky. In: Poráčová J., Koréneková B., Sedlák V., et al. (ed.) Základné zložky potravy a ich význam pre zdravie človeka. Prešovská univerzita v Prešove, Prešov, p. 108
- [2] Nikander R., Sievänen H., Heinonen A., et al. (2010) BMC Med. 8, p. 47
- [3] Iuliano-Burns S., Stone J., Hopper, J. L., et al. (2005) Osteoporos. Int. 16(10), p 1225
- [4] Castrogiovanni P., Trovato F. M., Szychlinska M. A., et al. (2016) Histol. Histopathol. 31(11), p. 1183
- [5] Musumeci G. (2017) J. Funct. Morphol. Kinesiol. 2(2), p. 17
- [6] Salehi M., Leung-Pineda V. (2021) Disorders of calcium and phosphate metabolism in infants and children. In: Dietzen D., Bennett M., Wong E., et al. (ed.) Biochemical and Molecular Basis of Pediatric Disease. Elsevier Science Publishing Co Inc., Amsterdam, 5, p. 379
- [7] Jesseniova lekárska fakulta v Martine, [Citované 15. marec 2023] <<https://www.jfmed.uniba.sk/fileadmin/jlf/Pracoviska/ustav-fyziologie/26SK-InBody.pdf>>
- [8] Grimm D., Gross J., Wehland, M., et al. (2016) Bone 87, p. 44
- [9] Bettis T., Kim B., Hamrick M. (2018) Osteoporos. Int. 29(8), p. 1713
- [10] Zouhal H., Hammami A., Tijani J. M., et al. (2020) Sports Med. 50(5), p. 987
- [11] Chen F., Su Q., Tu Y., et al. (2020) Medicine 99(6), p.e19050
- [12] Zribi A., Zouch M., Chaari H., et al. (2014) J. Clin. Densitom. 17(1), p. 156
- [13] Nygaard H., Slettalokken G., Vegge G., et al. (2015) PLoS ONE 10(3), p. e0121367
- [14] Santos V. D. J., Tavares O. M., Duarte J. P., et al. (2018) BMC Pediatr. 18(1), p. 212

Hodnotenie arteficiálneho presahu na plantograme vzhľadom na konkrétne oblasti plantogramu

Katarína Hanzelyová, Petra Švábová, Mária Chovancová

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra antropológie,
Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
hanzelyova7@uniba.sk*

Abstract

Evaluation of ghosting in footprints with respect to a specific area of the footprint

The aim of this study is to analyze the presence of ghosting phenomenon in the studied footprints to facilitate the distinction between dynamic and static footprints using ghosting in footprints. Dynamic footprints often contain a phenomenon called ghosting. To evaluate ghosting in footprints, the most general definition was followed – if the footprint contains a lighter area around the tips of one or more toes, or an area like a shadow on the back of the heel, it is considered ghosting. Ghosting was evaluated on all five toes on both the left and right footprints, as well as on the heel of both footprints. Ghosting was most frequently found on the second left toe and the first left toe. Ghosting on all ten toes was present in five individuals (2.94%). On the prints of the left foot, ghosting was present on all five toes in 22 subjects (12.94%), while on the right foot in 15 subjects (8.82%). The results of this study indicate that ghosting in footprints is an important feature and needs to be considered when evaluating footprints.

Keywords: *dynamic footprints; ghosting phenomenon; prevalence; forensic podiatry*

Úvod a formulácia cieľa

Napriek tomu, že odtlačky chodidiel nebývajú často zanechané na mieste činu, v prípade nálezu majú výpovednú hodnotu. Dopomáhajú k vytvoreniu biologického profilu v prípade metrických charakteristík a môžu mať identifikačný charakter, avšak je potrebné mať porovnávací materiál. Odtlačky chodidla môžu byť zanechané na tvrdom povrchu rôznymi látkami. Ak sa zistí súvislosť medzi trestným činom a zanechaným odtlačkom, a telesná výška sa dá odhadnúť z rozmerov tohto odtlačku, ide o relevantný dôkazový materiál [1]. V mnohých prípadoch sa na mieste činu nachádzajú práve dynamické odtlačky chodidiel. Hlavným rozdielom medzi dynamickými a statickými odtlačkami je spôsob ich vzniku. Statické odtlačky vznikajú pri položení bosého chodidla na podložku a následným zdvihnutím chodidla vertikálne a naopak dynamické odtlačky vznikajú pri chôdzi, keď sa chodidlo odvíja od podložky [2]. Ďalším rozdielom, ktorý sa len nedávno začal spájať s dynamickými odtlačkami chodidiel [1, 2, 3] je, že dynamické odtlačky sa líšia od statických stôp prítomnosťou ďalších markantov okolo zadnej časti päty a vrcholov oblastí odtlačkov prstov. Tieto markanty nazývame arteficiálny presah plantogramu [3]. Skúmanie arteficiálneho presahu na plantogramoch môže dopomôcť k rozlíšeniu, či je odtlačok chodidla na mieste činu statický alebo dynamický. Viacerí autori zistili, že arteficiálny presah na plantogramoch sa

v ojedinelých prípadoch vyskytuje aj na statických odtlačkoch chodidiel [1, 3, 4, 5, 6]. Arteficiálny presah plantogramu je však relevantná charakteristika dynamického odtlačku, ktorú treba brať do úvahy pri meraní rozmerov plantogramov, ktoré sú následne využívané pri predikcii telesnej výšky a hmotnosti [6].

Existujú dva spôsoby hodnotenia arteficiálneho presahu na plantogramoch. Burrow [2] opísal arteficiálny presah ako svetlejšie tiene, ktoré sú predĺžením jedného alebo viacerých prstov príp. päty na plantograme. Vernon et al. [3] však popísal arteficiálny presah ako vonkajšiu svetlú oblasť, ktorá sa líši od vnútornej tmavej oblasti odtlačku chodidla, ktorá sa nachádza v prednej časti prstov a v zadnej oblasti päty. Momentálne neexistuje jednotná definícia tohto pojmu a jeho hodnotenia.

Cieľom tejto štúdie bolo preskúmať prevalenciu arteficiálneho presahu na jednotlivých oblastiach plantogramu a vypočítať intervaly spoľahlivosti pre širšiu vzorku populácie. Jedná o pilotnú štúdiu, ktorá môže byť nápomocná pri ďalšom výskume zameranom na rozlíšenie dynamických a statických odtlačkov, ale aj bližšie objasnenie tohto, zatiaľ málo prebádaného, fenoménu.

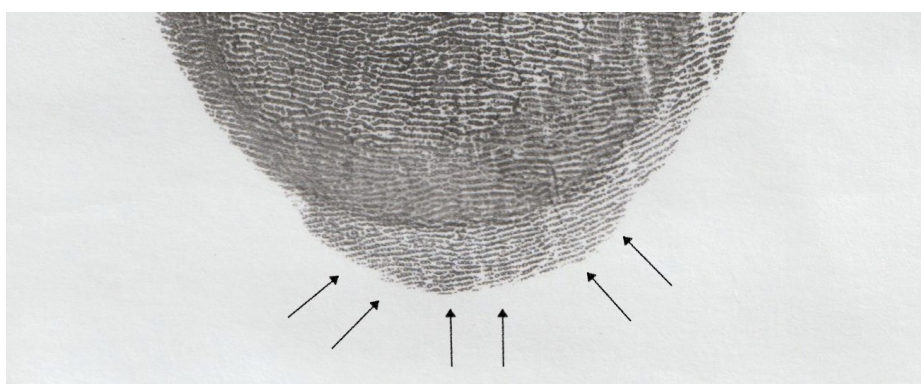
Materiál a metódy

Súbor pozostáva zo 170 jedincov, študentov Prírodovedeckej fakulty UK, z ktorých je 74 mužov a 96 žien, vo veku od 18 do 30 rokov. Všetci zúčastnení boli starší ako 18 rokov, z dôvodu požiadavky ukončenia rastu kostí nohy a jedinci bez akejkoľvek deformácie chrbtice, deformácií dolných končatín, chorôb či chirurgických zákrokov. Odber odtlačkov chodidiel prebiehal od januára 2020 do decembra 2022 na Prírodovedeckej fakulte na Katedre antropológie. Výskum bol schválený etickou komisiou (Etická komisia PriF UK, projekt ECH19004). Všetci zúčastnení probandi podpísali informovaný súhlas, ktorý poskytol základné informácie k výskumu a účasť na výskume bola dobrovoľná.

Prítomnosť arteficiálneho presahu sme vyhodnocovali podľa štúdie Vernon et al. [3] rovnako ako v štúdií Švábová et al. [7]. Na hodnotenie arteficiálneho presahu (obr. 1, obr. 2) sme sa riadili najvšeobecnejšou definíciou [3] – ak odtlačok chodidla obsahuje svetlejšiu oblasť okolo špičiek jedného, alebo viacerých prstov, prípadne oblasť podobnú tieňu na zadnej strane päty ide o arteficiálny presah. Presah sme hodnotili na všetkých piatich prstoch na ľavom aj na pravom odtlačku chodidla a taktiež na päte oboch odtlačkov [3]. Na štatistické spracovanie a vyhodnotenie údajov sa použil program MS Office Excel 2016 a IBM SPSS Statistics 28. V programe SPSS sme na štatistické spracovanie použili chí-kvadrát test.



Obr. 1. Prítomnosť arteficiálneho presahu na prvom, druhom a treťom prste plantogramu



Obr. 2. Prítomnosť arteficiálneho presahu na päte plantogramu

Výsledky a diskusia

Na odobratých odtlačkoch sme sledovali prítomnosť arteficiálneho presahu na prvom až piatom prste (T1 – T5) a na päte. Arteficiálny presah bol zaznamenaný aspoň na jednom mieste z analyzovaných častí plantogramu na 150 (88,24 %) odtlačkoch z celkového počtu 340. Prevalencia a intervaly spoľahlivosti pre jednotlivé oblasti sú zobrazené v tab. 1. Výsledky sme porovnávali so štúdiami, ktoré sú zamerané na arteficiálny presah plantogramov, avšak týchto štúdií je momentálne veľmi málo. Najväčší výskyt arteficiálneho presahu bol zaznamenaný na druhom ľavom prste a prvom ľavom prste. Tretie najčastejšie miesto výskytu arteficiálneho presahu bol tretí prst na ľavej nohe, po ňom nasledovali prvé dva prsty na pravej nohe.

Výsledky nekorešpondujú so štúdiou Nirenberga et al. [4], kde bolo najčastejšie miesto výskytu prvý prst na ľavej nohe, za ním nasledoval prvý prst na pravej nohe a druhý prst na ľavej nohe. V štúdií Burrow [2] boli výsledky rovnaké ako u Nirenberga et al. [4]. Rozdiely môžu byť spôsobené rozdielnou metódou hodnotenia arteficiálneho presahu.

Tab. 1. Frekvencia výskytu arteficiálneho presahu (AP) na jednotlivých prstoch na odtlačku chodidla a pätách s 95 % intervalom spoľahlivosti (IS) v súbore podľa pohlavia a laterality
 Legenda tabuľky – T1/T2/T3/T4/T5 – prvý až piaty prst na nohe

Oblasť plantogramu	Ľavý plantogram			Pravý plantogram		
ženy	Počet	Výskyt AP	IS (95 %)	Počet	Výskyt AP	IS (95 %)
T1	51	53,13 %	43,1 – 63,1	46	47,92 %	37,9 – 57,9
T2	55	57,29 %	47,4 – 67,2	42	43,75 %	33,8 – 53,7
T3	49	51,04 %	41,0 – 61,0	32	33,33 %	23,9 – 42,8
T4	38	39,58 %	29,8 – 49,4	30	31,25 %	21,9 – 40,6
T5	38	39,58 %	29,8 – 49,4	34	35,42 %	25,8 – 45,0
päta	30	31,25 %	21,9 – 40,6	30	31,25 %	21,9 – 40,6
muži	Počet	Výskyt AP	IS (95 %)	Počet	Výskyt AP	IS (95 %)
T1	40	54,05 %	42,8 – 65,3	34	45,95 %	34,7 – 57,2
T2	38	51,35 %	40,0 – 62,7	28	37,84 %	26,8 – 48,9
T3	32	43,24 %	32,0 – 54,5	21	28,38 %	18,1 – 38,7
T4	22	29,73 %	19,3 – 40,2	16	21,62 %	12,1 – 31,2
T5	19	25,68 %	15,6 – 35,7	17	22,97 %	13,3 – 32,7
päta	28	37,84 %	26,8 – 48,9	24	32,43 %	21,8 – 43,1

Prítomnosť arteficiálneho presahu na plantogramoch sme následne vypočítali pre 57 rôznych kombinácií výskytu. Všeobecne pre túto vzorku platí, že frekvencia arteficiálneho presahu na plantogramoch klesá s narastajúcim počtom oblastí výskytu na plantogramoch. Výnimkou je kombinácia prvého a druhého ľavého prsta a kombinácia prvého, druhého a tretieho ľavého prsta. Tento fakt môže byť spôsobený tým, že tieto dva resp. tri prsty sú zvyčajne najdlhšie a najviac zaťažované pri chôdzi. Pri chôdzi tlačíme na zem palcom a potom prenášame váhu na druhý, príp. tretí prst, pričom štvrtý a piaty prst sú menej zaťažené. Má to súvis s dynamickým charakterom mediálneho oblúka klenby nohy a jeho výraznejším zapojením do lokomócie a zároveň menšou pevnosťou väzív a šliach a zvýšenou laxnosťou laterálneho oblúka [1, 8]. Arteficiálny presah na všetkých desiatich prstoch bol prítomný u piatich jedincov (2,94 %). Na odtlačkoch ľavého chodidla bol arteficiálny presah na všetkých piatich prstoch prítomný u 22 probandov (12,94 %), pričom na pravom plantograme u 15 probandov (8,82 %). Ak berieme do úvahy aj pätu tak na ľavom plantograme je arteficiálny presah na všetkých oblastiach prítomný len u piatich probandov (2,94 %) a na pravom u štyroch probandov (2,35 %).

Rozdiely medzi výskytom arteficiálneho presahu na plantogramoch v sledovanom súbore a v súbore Nirenberga et al. [4] a Burrowa [2] možno vysvetliť rozdielnou metódou odberu odtlačkov či subjektívnym hodnotením pozorovateľa. Rozdielne prevalencie môžu byť

vysvetlené aj faktom, že vo výskume sme hodnotili prítomnosť arteficiálneho presahu na odtlačkoch vyhotovených postavením probanda a následným vykročením, pričom Nirenberg et al. [4] a Burrow [2] odoberali odtlačky chôdze a vybrali štvrtý – šiesty odtlaček. Dôležitými faktormi sú určite populačná špecificita, rozdielny spôsob chôdze, či rôzne spôsoby obúvania a druhy samotnej obuvi.

Intersexuálne rozdiely boli signifikantné len v prípade arteficiálneho presahu na piatom prste ľavého plantogramu (tab. 2).

Tab. 2. Intersexuálne rozdiely v sledovanom súbore vzhľadom na oblasť výskytu arteficiálneho presahu (AP) na plantograme

Legenda tabuľky: T1/T2/T3/T4/T5 – prvý/druhý/tretí/štvrtý/piaty prst na nohe, p – hodnota významnosti

Oblasť odtlačku	Výskyt AP (počet) na ľavom plantograme			Výskyt AP (počet) na pravom plantograme		
	Muži	Ženy	p	Muži	Ženy	p
T1	40	51	0,829	34	46	0,799
T2	38	55	0,628	28	42	0,404
T3	32	49	0,313	21	32	0,489
T4	22	38	0,183	16	30	0,161
T5	19	38	0,045	17	34	0,082
päta	28	30	0,369	24	30	0,870

Dôvodom môže byť, že v niektorých prípadoch sa piaty prst neodtlačil, prípadne rozdielnym rozložením telesnej hmotnosti pri vykročení. Tieto výsledky súhlasia so štúdiou vykonanou Mendelovou [6].

V súbore boli významné bilaterálne rozdiely vzhľadom na výskyt arteficiálneho presahu na jednotlivých oblastiach odtlačku len na druhom ($p = 0,013$) a treťom prste ($p = 0,002$). Vzhľadom na lateralitu sme teda pozorovali častejší výskyt arteficiálneho presahu na prstoch a päte ľavej nohy, čo predstavuje zhodu so štúdiami Nirenberg et al. [4] a Burrow [2]. Taktiež je to v súlade s výsledkami práce Mendelová [6], ktorá však hodnotila statické odtlačky chodidiel. K limitom tejto štúdie patria rozdielne spôsoby hodnotenia arteficiálneho presahu na plantogramoch či rozdielny spôsob odberu odtlačkov. Napriek tomu, že problematike arteficiálneho presahu plantogramov sa v súčasnosti venuje veľmi málo štúdií, tento fenomén sa pomerne často sa vyskytuje na dynamických plantogramoch. Taktiež chýbajú štúdie, ktoré vyhodnocujú presah na statických odtlačkoch resp. štúdie, ktoré porovnávajú arteficiálny presah na statických a dynamických odtlačkoch chodidiel.

Záver

Z výsledkov tejto štúdie vyplýva, že ide o relevantnú charakteristiku dynamického odtlačku chodidla. Vzhľadom na lateralitu sme pozorovali v celom súbore častejší výskyt arteficiálneho presahu na prstoch a päte ľavej nohy. Najväčší výskyt arteficiálneho presahu bol zaznamenaný na druhom ľavom prste a prvom ľavom prste. V prípade nálezu dynamického odtlačku chodidla na mieste činu je potrebné brať do úvahy tento presah, čo následne môže viesť k úspešnejším odhadom telesnej výšky a vypracovaniu presnejšieho biologického profilu. Keďže ide o jednu z prvých štúdií tohto typu, je potrebné ďalšie preskúmanie arteficiálneho presahu na plantogramoch a jeho dôležitosti pri rozlíšení dynamických a statických odtlačkoch chodidla.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Reel S., Rouse S., Vernon Obe W., et al. (2012) *Forensic Sci. Int.* 219(1-3), p. 283
- [2] Burrow J. G. (2015) *J. Forensic Identif.* 65(5), p. 884
- [3] Vernon W., Simmonite N., Reel S., et al. (2017) *Sci. Justice* 57(4), p. 276
- [4] Nirenberg M., Ansert E., Campbell J., et al. (2020) *Sci. Justice* 60(5), p. 432
- [5] DiMaggio J. A., Vernon J. A. (2017) *Forensic podiatry: Principles and Methods*. 2. vyd., CRC Press, Boca Raton, p. 75.
- [6] Mendelová K. (2021) *Porovnanie metodík odoberania plantogramov a vybraných telesných parametrov pre potreby aplikovanej antropológie*. (Diplomová práca) Univerzita Komenského v Bratislave
- [7] Švábová (nee Uhrová) P., Caplova Z., Beňuš R., et al. (2022) *Forensic Sci. Int.* 330, p. 1
- [8] Hughes J., Clark P., Klenerman L. (1990) *J. Bone Joint Surg. Br.* 72(2), p. 245

Bioaktívne komplexy prechodných kovov na báze chinazolinónov – ich interakcie s DNA ľudských buniek ovplyvnených H₂O₂ *in vitro*

Peter Hergott¹, Zuzana Hricovíniiová², Eva Horváthová³

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; hergott7@uniba.sk

²Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika

³Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Ústav experimentálnej onkológie, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Bioactive transition metal complexes based on quinazolinones – potential interactions with DNA of human cells treated with H₂O₂ *in vitro*

Effective treatment of cancer is one of the main challenges of modern medicine. One approach in cancer therapy is a chemotherapy. Despite the wide use of cisplatin in the treatment mixtures for different cancer types, it has huge disadvantages manifested in the high toxicity, severe side effects and the emergence of frequent drug resistance. However, quinazolinones represent new possibilities to deal with these difficulties. These substances display a wide spectrum of biological activity, moreover they can form complexes with metal ions which makes them a potential replacement for cisplatin. Our study is focused on 2,3-substituted quinazolinones and their metal complexes. We tested them with the MTT and the Comet assay. The results showed higher cytotoxicity and increased genotoxicity of copper complexes in the presence of H₂O₂; the quinazolinone ligands exhibited much lower toxicity and trend to protect human hepatoma HepG2 cells against H₂O₂.

Keywords: cancer; chemotherapy; cisplatin; quinazolinones; MTT assay; Comet assay

Úvod a formulácia cieľa

Cisplatina (cisPt) je jedným z najefektívnejších a najčastejšie používaných chemoterapeutík založených na báze bioaktívneho komplexu kovu [1]. V roku 1845 bola cisPt objavená talianskym chemikom Micheleom Peyronem [2]. Avšak za opísanie jej biologickej aktivity vdáčíme Barnettovi Rosenbergovi, ktorý detegoval inhibíciu proliferácie nádorových buniek po jej aplikovaní [3]. CisPt má široké spektrum využitia pri terapii nádorových ochorení, ako sú napríklad: rakovina semenníkov, vaječníkov, močového mechúra, pľúc, hlavy, krku, krčku maternice a žalúdka [1, 4, 5]. Aj keď je cisPt takým úspešným liečivom, veľmi dobre je známa aj jej temná stránka, t.j. profil toxicity a vedľajších účinkov cisPt, ako sú: nefrotoxicita, ototoxicita, hepatotoxicita, neurotoxicita, gastrointestinálna toxicita, silné alergické reakcie, znížená aktivita imunitného systému, krvácanie či nauzea a zvracanie [4, 5]. Ďalším vážnym problémom pri používaní tejto látky je vznik rezistencie nádorov na účinok cisPt, čo sa môže prejaviť už pri podaní prvej dávky chemoterapie, teda bunky disponujú rezistenciou prakticky od začiatku. Naopak, ak vzniká počas jednotlivých opakovaní cyklov chemoterapie, hovoríme o získanej rezistencii [1]. Tieto problémy nútia vedcov pripravovať

nové biologicky aktívne molekuly, ktoré by vykazovali cytotoxickú aktivitu selektívne zameranú na nádorové bunky. Nové objavy by mohli viesť k zníženiu aplikovaného množstva a intenzity vedľajších účinkov na chemoterapiu a rovnako by mohli byť potlačené stále pribúdajúce problémy s rezistenciou na liečivo. Takéto primárne požiadavky by mohli spĺňať deriváty chinazolínov a chinazolinónov. Sú to zlúčeniny so širokým spektrom biologickej aktivity, napr.: antimikrobiálnymi, antioxidačnými, protizápalovými, antikonvulzívnymi, antidepresívnymi a antimalarickými účinkami [6], a dokonca niektoré z nich vykazujú aj protinádorovú aktivitu [7]. My sme sa zamerali na 2,3-substituované chinazolinónové deriváty (Q3 a Q10), ktoré sú schopné vytvárať bioaktívne komplexy s iónmi prechodných kovov, napr. s Cu^{2+} . Testovali sme deriváty Q3, Q10, ktoré vystupujú v úlohe ligandov, a ich med'naté komplexy Q3-Cu(II), Q10-Cu(II). Ako model sme si zvolili ľudskú hepatokarcinómovú bunkovú líniu HepG2. MTT test sme použili na určenie cytotoxicity študovaných látok, získané hodnoty nám pomohli pri výbere koncentrácií pre kométový test. Pomocou neho sme skúmali protektívny a/alebo genotoxický potenciál študovaných látok. Na vyvolanie oxidačného stresu v bunkách sme použili peroxid vodíka (H_2O_2).

Materiál a metódy

Modelová bunková kultúra

Bunková línia ľudského hepatokarcinómu bola odobratá pätnásťročnému pacientovi s diferencovaným hepatocelulárnym karcinómom [8]. Bunky sa kultivovali ako adherentná bunková línia v Dulbeccovom modifikovanom Eaglovom médiu (DMEM) doplnenom o 5 ml roztok penicilínu/streptomycínu a 10% fetálnym hovädzím sérom. Bunky HepG2 rástli na Petriho miskách a platničkách s médiom v termostate vo vlhkej atmosfére 5% CO_2 pri 37°C.

MTT test – cytotoxicita

Miera cytotoxicity zlúčenín (Q3, Q10, Q3-Cu(II), Q10-Cu(II)) bola detegovaná kolometrickým MTT testom. Počas inkubácie dochádza k farebnej zmene žltej tetrazóliovej soli 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazóliumbromid (MTT), ktorá je redukovaná mitochondriálnymi enzýmami metabolicky aktívnych buniek na purpurový formazán a ten je následne spektrofotometricky kvantifikovaný [9]. Exponenciálne rastúce bunky boli vystavené rôznym koncentráciám ligandov (1-1000 μM) a komplexov (0,1-10 μM) 48 h. Negatívna kontrola predstavovala bunky ošetrované médiom s DMSO (koncentrácia prislúchajúca najvyššej testovanej koncentrácii). Po 48 h vplyve sme bunky premyli PBS a nechali inkubovať so 100 μl média a 50 μl roztoku MTT farbičky (1 mg/ml v PBS) 4 h pri 37°C. Následne sme odstránili

médium s MTT farbičkou a vytvorené kryštáliky formazánu v 96-jamkovej platničke sme rozpustili v DMSO 30 min na trepačke. Intenzitu absorpcie svetla sme zmerali použitím xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) pri excitácii 540 nm a emisnej vlnovej dĺžke 690 nm. Každý experiment bol zopakovaný trikrát a relatívna cytotoxicita bola percentuálne prepočítaná vzhľadom k negatívnej kontrole (NK; 100% životaschopných buniek). Pre výpočet sme použili vzorec:

$$\text{Viabilita (\%)} = (A \text{ ovplyvnených buniek} / A \text{ kontrolných buniek}) \times 100 \quad [\text{I.}]$$

Z výsledkov sme vypočítali aritmetické priemery $\pm$ smerodajné odchýlky a štatisticky ich porovnali s NK Studentovým *t*-testom.

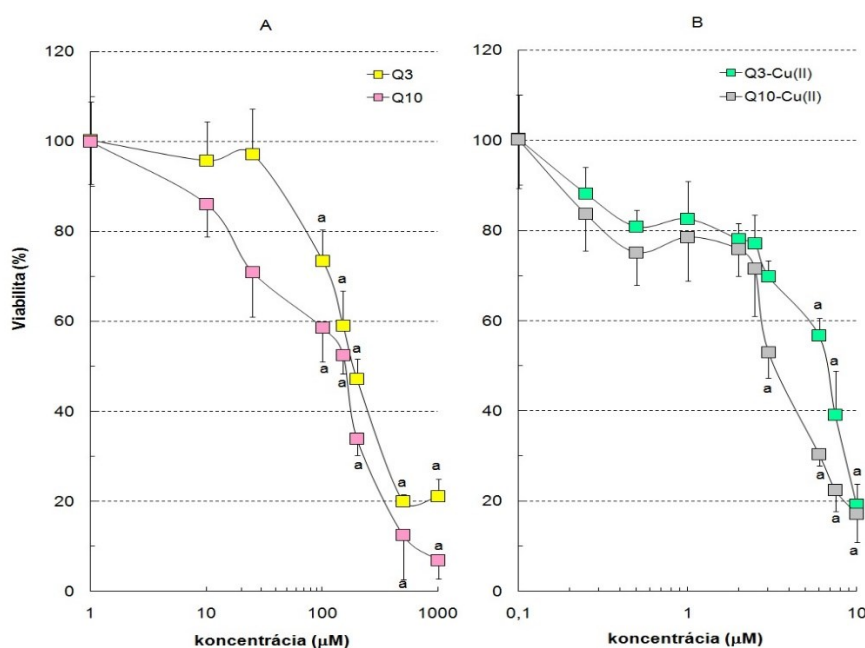
Kométový test (test jednobunkovej gélovej elektroforézy)

Na detekciu protektívneho a/alebo genotoxického účinku testovaných látok v bunkách HepG2 sme použili alkalickú kométovú analýzu podľa Singha a kol. [10]. Exponenciálne rastúce bunky sme vystavili 48 h vplyvu študovaných látok v netoxických koncentráciách, ktoré sme vybrali na základe výsledkov MTT testu. V negatívnej kontrole (NK) boli bunky vystavené iba médiu s DMSO v koncentrácii prislúchajúcej najvyššej koncentrácii látky pre kométový test. Po ukončení vplyvu sme bunky spracovali nasledovne: bunky sme opláchli PBS, trypsinizovali a $1,5 \times 10^5$ buniek sme centrifugovali 10 min pri 2000 rpm. Pelet sme rozsuspendovali v 0,75 % LMP agaróze, aplikovali na podložné sklička, ktoré boli pokryté vrstvou 1 % NMP agarózy a prikryli krycím sklíčkou. Po stuhnutí agarózy sme odstránili krycie sklíčka a polovicu vzoriek sme vystavili H_2O_2 (500 μM) na 5 min v chlade a tme; sklíčka so vzorkami NK ovplyvnené H_2O_2 predstavujú pozitívnu kontrolu (PK). Potom nasledovala lýza v lyzujúcom pufri (2,5 M NaCl + 0,1 M Na_2EDTA + 10 mM Tris-HCl, pH=10, 1 % Triton X-100) pri 4°C v tme 1 h. Následne sme sklíčka presunuli do elektroforetického roztoku (dH_2O + 5 M NaOH + 0,2 M Na_2EDTA) na odvíjanie (40 min v tme pri 4°C). Hneď potom sme spustili elektroforézu a nechali putovať fragmenty DNA v elektrickom poli (25 V, 300 mA, 30 min, 4°C). Na záver sme vzorky neutralizovali (0,4 M Tris-HCl, pH=7,5) a farbili etídium bromidom (5 $\mu\text{g/ml}$). Kométy sme analyzovali pomocou fluorescenčného mikroskopu Carl Zeiss AxioImager.Z2 automatizovaným vyhodnocovacím programom Metafer 5 (MetaSystems Hard & Software GmbH, Altlüßheim, Nemecko). Ako parameter poškodenia DNA sme použili percento DNA v chvoste komét. Experiment sme zopakovali minimálne 3-krát pre každú testovanú látku. Z výsledkov sme vypočítali aritmetické priemery $\pm$ smerodajné

odchýlky a štatisticky ich porovnali s negatívnou resp. pozitívnou kontrolou (neovplyvnené bunky resp. neovplyvnené bunky vystavené H_2O_2) Studentovým *t*-testom.

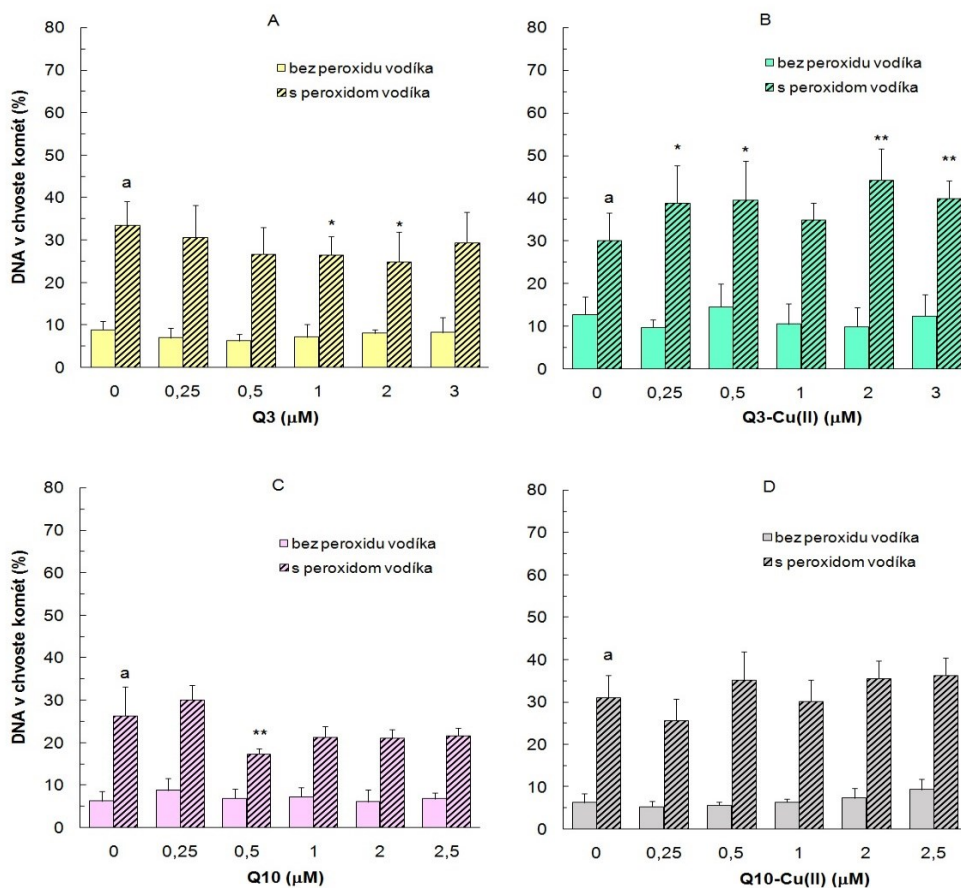
Výsledky a diskusia

Cytotoxické vlastnosti zlúčenín sme testovali na HepG2 bunkách z dôvodu ich enzymatickej výbavy a metabolickej aktivity. Na analýzu a zhodnotenie toxického pôsobenia zlúčenín sa všeobecne používa MTT test, ide o výhodnú metódu na meranie bunkovej metabolickej aktivity, čo slúži ako ukazovateľ cytotoxicity. Výsledky testu ukázali rôzne inhibičné aktivity skúmaných látok: Q3, Q10 a Q3-Cu(II), Q10-Cu(II). Ligandy a ich med'naté komplexy ovplyvnili viabilitu buniek HepG2 spôsobom závislým od koncentrácie. Pri analýze výsledkov chinazolinónových ligandov sme pozorovali hodnoty IC_{50} okolo 200 μM (Q3) a 150 μM (Q10) (Obr. 1A).



Obr. 1. Cytotoxicita chinazolinónových ligandov a Cu(II) komplexov detegovaná MTT testom
Grafy znázorňujú prežívanie buniek HepG2 po 48 h ovplyvnení rôznymi koncentraciami (1-1000 μM) ligandov (A) Q3 (žltá) a Q10 (ružová) a rôznymi koncentraciami (0,1-10 μM) med'natých komplexov (B) Q3-Cu(II) (zelená) a Q10-Cu(II) (šedá). ^a $p < 0,001$ znázorňuje štatisticky preukazný pokles viability buniek voči NK

V prípade med'natých komplexov sme pozorovali prudký nárast cytotoxicity, ich hodnoty IC_{50} sú 6 μM Q3-Cu(II) a 3 μM Q10-Cu(II) (Obr. 1B). Z výsledkov je vidieť, že deriváty Q10 vykazujú mierne vyššiu cytotoxicitu ako Q3. Prudký nárast toxicity med'natých komplexov je spôsobený prítomnosťou medi v molekule týchto zlúčenín.



Obr. 2. Poškodenie DNA indukované kombinovaným ovplyvnením chinazolinónovými derivátmi (48 h) a H₂O₂ (5 min na ľade v tme) detegované kométoým testom

Grafy znázorňujú vzťah medzi % DNA v chvoste a použitou koncentráciou študovanej látky pre ligand Q3 (A - žltý) a komplex Q3-Cu(II) (B - zelený), ligand Q10 (C - ružový) a komplex Q10-Cu(II) (D - šedý). ^ap<0,001 znázorňuje štatistickú preukaznosť PK (H₂O₂ 5 min na ľade v tme – šrafovaný stĺpec 0) voči NK (farebný stĺpec 0); *p<0,05 a **p<0,01 znázorňujú štatisticky významné zníženie/zvýšenie hladiny poškodení DNA v porovnaní s PK

Kométoý test sme použili na detekciu poškodení DNA, ktoré sme sledovali na vzorkách nevystavených H₂O₂, pričom nedošlo k žiadnej výraznej zmene voči negatívnej kontrole (Obr. 2, farebné stĺpce 0,25-3 μM). Protektívny účinok voči oxidačnému činidlu H₂O₂ sme zaznamenali pri oboch ligandoch Q3, Q10, kedy došlo k zníženiu % DNA v chvostoch komét v porovnaní s PK (Obr. 2A a C). Na druhej strane, mednaté komplexy vykazujú genotoxický účinok, keďže ešte zvýšili hladinu poškodení DNA indukovaných samotným H₂O₂ (Obr. 2B a D). Zvýšenie genotoxického účinku Cu(II) komplexov v prítomnosti H₂O₂ mohlo byť spôsobené potencovaním oxidačného stresu, ktorý bol zapríčinený reakciou Cu(II) komplexu s H₂O₂. Prechodné kovy, ako sú železo alebo meď, môžu katalyzovať rozklad H₂O₂ prostredníctvom Fentonovej reakcie, pri ktorej vznikajú hydroxylové radikály indukujúce poškodenie DNA. Existujú však aj iné mechanizmy, ktoré vedú k poškodeniu DNA v

prítomnosti iónov prechodných kovov. Napr. Robbins a Drago [11] navrhli, že peroxid sa môže koordinačne spojiť s kovom bez toho, aby zmenil jeho oxidačný stav. Takéto spojenie vedie k tvorbe peroxo- alebo hydroxyperoxo-komplexu. Ak sa vytvorí takýto hydroperoxid medi ($\text{Cu}^{2+}\text{-OOH}$), dokáže veľmi rýchlo reagovať so substrátom, čo by mohlo mať za následok zvýšenie poškodenia DNA v bunkách ovplyvnených komplexami Q3-Cu(II), Q10-Cu(II) v porovnaní s pozitívnou kontrolou.

Záver

Výsledky experimentov naznačujú, že chinazolinónové deriváty Q3 a Q10 sú schopné chrániť DNA pred oxidačným stresom. Naopak, ich med'naté komplexy Q3-Cu(II) a Q10-Cu(II) vykazujú zvýšenú genotoxicitu v prítomnosti oxidantu H_2O_2 , čo môže byť zapríčinené zvýšenou produkciou vysoko reaktívnych voľných radikálov, ktoré vznikajú interakciou Cu(II) komplexu a H_2O_2 .

PodĎakovanie

Táto práca bola finančne podporená z grantov VEGA 2/0071/22 a 1/0460/21, z Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Posilnenie výskumných, vývojových a inovačných kapacít translačného biomedicínskeho výskumu ľudských ochorení, kód ITMS: 313021BZC9, spolufinancovaný zo zdrojov ERDF a z projektu TRANSMED ITMS: 26240120008 a ITMS: 26240220071 podporeného Operačným programom Výskum & Vývoj financovaným ERDF.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Ghosh S. (2019) *Bioorg. Chem.* 88, p. 102925
- [2] Kauffman B. (2010) *Platinum Metals Rev.* 54(4), p. 250
- [3] Rosenberg B., Vancamp L., Trosko J., et al. (1969) *Nature* 222, p. 385
- [4] Ho G. Y., Woodward N., Coward J. I. G. (2016) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 102, p. 37
- [5] Dasari S., Tchounwou P. B. (2014) *Eur. J. Pharmacol.* 740, p. 364
- [6] Hricovíniová J., Hricovíniová Z., Kozics K. (2021) *Int. J. Mol. Sci.* 22(2), p. 610
- [7] Selvam T. P., Kumar P. V. (2011) *Res. Pharmacy.* 1(1), p. 1
- [8] Aden D. P., Fogel A., Plotkin S., et al. (1979) *Nature* 282(5739), p. 615
- [9] Kumar P., Nagarajan A., Uchil P. D. (2018) *Cold Spring Harb Protoc.* 2018(6)
- [10] Singh N. P., McCoy M. T., Tice, R. R., et al. (1988) *Exp. Cell Res.* 175, p. 184
- [11] Pham A. N., Xing G., Miller C. J., et al. (2013) *J. Catalysis* 301, p. 54

Katechín prehlbuje účinok azolov proti patogénnym kvasinkám *Candida glabrata*

Natália Chovancová, Daniel Eliaš, Yvetta Gbelská, Nora Tóth Hervay

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
chovancova86@gmail.com

Abstract

Catechin enhances the effect of azoles in the pathogenic yeast *Candida glabrata*

The rising number of invasive fungal infections caused by drug-resistant *Candida* strains is one of the greatest challenges for the development of novel antifungal strategies. The scarcity of available antifungals has drawn attention to the potential of natural products as antifungals and in combinational therapies. One of these are catechins- polyphenolic compounds- flavanols of the flavonoid family, found in a variety of plants. In this work, we evaluated the changes in the susceptibility of *Candida glabrata* strain grown in the simultaneous presence of catechin-hydrate and antifungal azoles.

Keywords: *Candida glabrata*; catechin; fluconazole; miconazole; antifungal resistance; ROS

Úvod a formulácia cieľa

Kvasinka *Candida glabrata*, ľudský oportúnny patogén, je druhou najčastejšou príčinou invazívnych kandidóz. Infekcie zapríčinené kvasinkami rodu *Candida* radíme medzi celosvetovo najčastejšie hubové ochorenia. Invázne kandidózy spôsobujú život ohrozujúce stavy najmä u imunokompromitovaných pacientov. Miera mortality sa u infikovaných môže pohybovať okolo 50% [1, 2, 3].

Vhodne zvolená antifungálna terapia je nevyhnutná pre úspešné zvládnutie mykotických infekcií. Azoly patria v súčasnosti k zlatému štandardu v liečbe infekcií spôsobovaných kvasinkami rodu *Candida* [4,5].

Nárast v počte kmeňov kvasiniek rezistentných voči konvenčným antifungálnym látkam stimuluje hľadanie alternatívnych spôsobov terapie. Jednou z možností je dizajn nových liečiv alebo posilnenie účinku už existujúcich. Samozrejmým cieľom je aj používanie nižšej koncentrácie antifungálnych látok, čo by sa dalo dosiahnuť pridávaním rastlinných výťažkov, ako sú napr. katechíny. Katechíny patria k prírodným polyfenolovým zlúčeninám, ktoré sa nachádzajú v bobuľovom ovocí, v červenom víne, hrozne, hruškách, v čokoláde, hlavným zdrojom je však zelený čaj. Katechíny sa vyznačujú protizápalovými, protirakovinovými, antioxidantnými, antimikrobiálnymi ako aj prooxidačnými účinkami. Katechíny sú schopné vychytávať voľné radikály, či reaktívne formy kyslíka. Publikované údaje poukazujú na

synergický účinok katechínov s antimikrobiálnymi látkami proti patogénnym druhom baktérii a húb [6,7].

Cieľom prezentovanej práce je analyzovať vplyv katechínu na rast kvasiniek *C. glabrata* a zistiť, či prítomnosť katechínu prehĺbi antifungálny účinok azolov. Pomocou qRT-PCR sa preštuduje, či efekt katechínu ovplyvní expresiu génu *CgCDR1*, ktorý kóduje ABC transportný proteín u kvasiniek *C. glabrata*. Využitím sondy H₂DCFDA sa odsleduje tvorba reaktívnych foriem kyslíka (ROS) v prítomnosti katechínu, azolov ako aj v ich kombinácii.

Materiál a metódy

Použité mikroorganizmy: V práci bol použitý laboratórny kmeň kvasinky *C. glabrata* Cg 2001HT *lig4Δ (lig4Δ::HIS3 trp1Δ)* (ďalej označovaný ako štandardný kmeň).

Použité kultivačné médiá: Na kultiváciu kvasiniek bolo použité tekuté YPD médium (2% (w/v) glukóza, 2% (w/v) peptón, 1% (w/v) kvasničný extrakt). Na prípravu tuhých médií bol použitý agar (2% (w/v)).

Použité inhibítory: flukonazol (FLU), katechín-hydrát (CAT), mikonazol (MIC)

Stanovenie citlivosti kvasiniek na inhibítory/ antifungálne látky: Citlivosť kvasiniek sa stanovila pomocou metódy tzv. kvapkových testov. Nočná kultúra kvasiniek bola nariedená v sterilnej destilovanej vode na koncentrácie 1 x 10⁷ b/ml, 1 x 10⁶ b/ml, 1 x 10⁵ b/ml a 1 x 10⁴ b/ml. Nariedené kultúry boli vykvapkané na tuhé komplexné YPD médium v objeme 5 µl. Do YPD média boli pred stuhnutím primiešané inhibítory v stanovených koncentráciách. Rast kvasiniek sa odčítal po 48h inkubácie pri 30 °C.

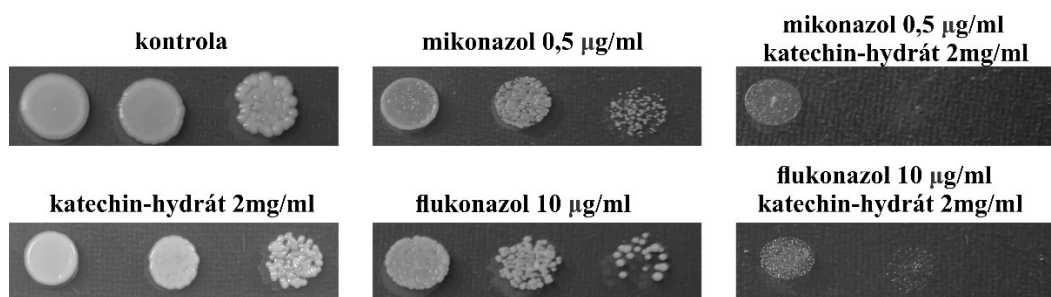
Detekcia intracelulárnej hladiny ROS v bunkách kvasiniek: Nočná kultúra kvasiniek v koncentrácii 1 x 10⁹ b/ml bola naočkovaná do čerstvého YPD média a opracovaná katechín-hydrátom (2 mg/ml), mikonazolom (0,5 µg/ml) alebo oboma látkami pri teplote 30 °C počas 2 hodín. Narastené bunky boli premyté fyziologickým roztokom PBS. Suspenzia buniek v koncentrácii 1 x 10⁵ b/ml bola pripravená v PBS roztoku a inkubovaná v 96 jamkovej platničke spolu s 25 µM dihydrofluoresceín diacetátom (H₂DCFDA). Fluorescenčný signál sme zaznamenali v 0, 30, 60 a 90 minútových intervaloch pri excitačnej a emisnej vlnovej dĺžke 475 a 500- 550 nm.

Izolácia RNA a stanovenie exprese génov: Celková RNA sa izolovala kyslým fenolom z kultúry kvasiniek rastúcich v exponenciálnej fáze v YPD médiu. Expresia génov sa stanovila qRT-PCR metódou. Vzorky cDNA sa pripravili prepisom z 1 µg očistenej RNA pomocou enzýmu reverzná transkriptáza Revert AID™ H Minus Reverse Transcriptase (200 U/µl)

(ThermoScientific, EÚ). Na kvantitatívnu PCR sa použil 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, EÚ). qPCR amplifikácia sa uskutočnila v prístroji 7900 HT Fast Real- Time PCR system (Applied Biosystems, USA). Zmeny v expresii génov sa vyhodnotili Livakovou metódou. Uvedené výsledky sú priemerom troch experimentov $\pm$ SD. Expresia génov sa normalizovala pomocou génu *CgACT1*.

Výsledky a diskusia

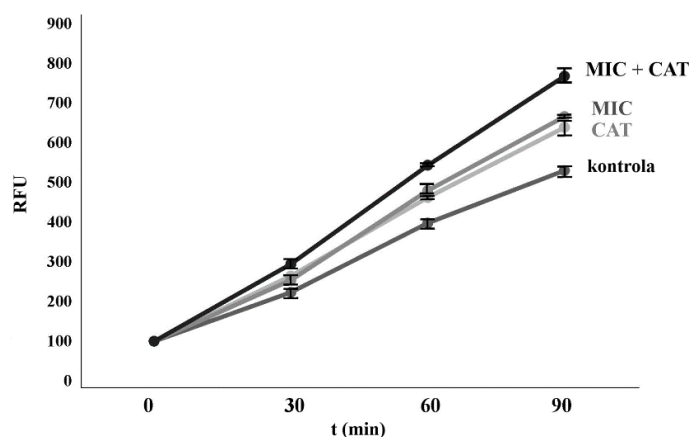
Fenotypová analýza preukázala, že samotný katechín-hydrát neinhibuje rast štandardného kmeňa kvasinky *C. glabrata* (Obr. 1). Kultivácia buniek v prítomnosti kombinácie antifungálneho azolu a katechín-hydrátu preukázala, že katechín-hydrát posilňuje účinok azolu voči kvasinkám *C. glabrata* (Obr. 1).



Obr. 1. Rast štandardného kmeňa kvasiniek *C. glabrata*
Rast bol zdokumentovaný po 48 hodinách.

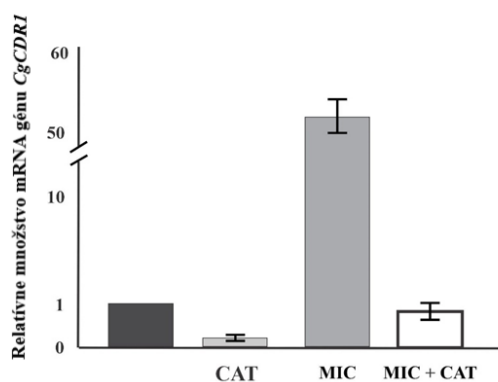
S cieľom bližšie preskúmať vplyv katechínu na antifungálnu aktivitu mikonazolu u kvasiniek *C. glabrata* sme sa zamerali na produkciu reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a mieru expresie génu efluxnej pumpy *CgCDR1*.

Pomocou sondy H₂DCFDA sme analyzovali vplyv mikonazolu a katechín-hydrátu na tvorbu ROS u štandardného kmeňa *C. glabrata*. Ako ukazuje obr. 2, najvyššiu produkciu intracelulárnych ROS sme zaznamenali pri kultivácii buniek štandardného kmeňa *C. glabrata* v prítomnosti kombinácie mikonazolu a katechín-hydrátu (0,5 µg/ml + 2 mg/ml). Zvýšená produkcia ROS môže byť príčinou zvýšenia antifungálneho pôsobenia mikonazolu v kombinácii s katechín-hydrátom. V porovnaní s kontrolnou vzorkou sme pozorovali vyššiu produkciu intracelulárnych ROS aj pri kultivácii buniek so samotným katechín-hydrátom (2 mg/ml) alebo mikonazolom (0,5 µg/ml) (Obr. 2).



Obr. 2. Produkcia intracelulárnych ROS štandardným kmeňom *C. glabrata*
Štandardný kmeň bol inkubovaný v prítomnosti mikonazolu (MIC), katechín-hydrátu (CAT) a kombinácii mikonazolu a katechín- hydrátu (MIC+CAT).
RFU- relative fluorescence unit (jednotka relatívnej fluorescence).

V nasledujúcom experimente sme pomocou qRT-PCR metódy sledovali vplyv mikonazolu a katechín-hydrátu na expresiu génu *CgCDR1*. Gén *CgCDR1* kóduje kľúčový transportér zodpovedajúci za rezistenciu kvasiniek *C. glabrata* voči azolom. Obr. 3 demonštruje, že inkubácia buniek v prítomnosti katechín-hydrátu (2 mg/ml) vedie k signifikantnému zníženiu expresie génu *CgCDR1*. V prítomnosti mikonazolu (0,5 µg/ml) došlo v bunkách štandardného kmeňa k 50- násobnému zvýšeniu expresie génu *CgCDR1*. Pri raste kvasiniek v prítomnosti kombinácie mikonazolu a katechín-hydrátu (2 mg/ml) nedochádzalo k indukcii expresie génu *CgCDR1*.



Obr. 3. Hladiny expresie génu *CgCDR1* v štandardnom kmeni *C. glabrata*
Na obrázku zľava- kontrola, štandardný kmeň *C. glabrata* ošetrovaný katechín- hydrátom (CAT), ošetrovaný mikonazolom (MIC) a ošetrovaný mikonazolom a katechín-hydrátom (MIC+CAT). Expresia bola normalizovaná vzhľadom na gén *CgACT1*.

Záver

Analýzou rastu štandardného kmeňa kvasinky *C. glabrata* v prítomnosti azolových antimykotík v kombinácii s katechín-hydrátom sme ukázali, že katechín-hydrát zosilňuje antifungálnu aktivitu flukonazolu a mikonazolu. Kombinácia týchto liečiv s katechín-hydrátom viedla k inhibícii rastu štandardného kmeňa kvasinky *C. glabrata*. Dokázali sme tvorbu intracelulárnych ROS u štandardného kmeňa *C. glabrata* v prítomnosti samotného mikonazolu a samotného katechín-hydrátu. Ich kombinácia tvorbu intracelulárnych ROS ešte posilnila. Naše výsledky tiež zodpovedajú predchádzajúcim zisteniam, ktoré ukázali, že katechíny ako aj azoly sú schopné vyvolať tvorbu ROS [8, 9]. Expresia génu *CgCDRI* u štandardného kmeňa *C. glabrata* bola v prítomnosti mikonazolu výrazne zvýšená, ale tento efekt bol potlačený spoločným pôsobením katechín-hydrátu a mikonazolu. Na základe dosiahnutých výsledkov predpokladáme, že zvýšená tvorba intracelulárnych ROS a neschopnosť indukovať expresiu génu *CgCDRI* môže spôsobovať pozorovaný zvýšený inhibičný účinok azolov v kombinácii s katechín-hydrátom. Pre objasnenie mechanizmu pôsobenia katechín-hydrátu na expresiu génu *CgCDRI* budú potrebné ďalšie experimenty. Predpokladáme, že vyvolanie oxidačného stresu pôsobením kombinácie mikonazolu a katechín-hydrátu môže pôsobiť ako negatívny regulátor transkripčnej odpovede, ktorá vedie k antifungálnej rezistencii.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Mota S., Alves R., Carneiro C., et al. (2015) Front. Microbiol. 6, p. 919
- [2] Pfaller M. A., Diekema D. J. (2007) Clin. Microbiol. Rev. 20(1), p. 133
- [3] Logan C., Martin-Loeches I., Bicanic T. (2020) Intensive Care Med. 46(11), p. 2001
- [4] Pappas P. G., Rex J. H., Sobel J. D., et al. (2004) Clin. Infect. Dis. 38(2), p. 161
- [5] Arendrup M. C., Patterson T. F. (2017) J. Infect. Dis. 216(suppl_3), p. 445
- [6] Reygaert W. C. (2018) AIMS Microbiol. 4(3), p.1
- [7] Bernatoniene J., Kopustinskiene D. (2018) Molecules 23(4), p. 965
- [8] Ouyang J., Zhu K., Liu Z., et al. (2020) Oxid. Med. Cell. Longev. p. 1
- [9] Francois I., Cammue B., Borgers M., et al. (2006) Anti-Infective Agents Med. Chem. 5(1), p. 3

Krvné parazity radu Haemosporida (krvinkovky) a ich možný vplyv na fyziologický stres u vtákov

Eva Chrappová¹, Alžbeta Šujanová², Matúš Tibenský³, Martin Matejka¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra zoológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; chrappova11@uniba.sk

²Ústav zoológie Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Dúbravská Cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovenská republika

³Slovenská technická univerzita, Stavebná fakulta, Katedra matematiky a deskriptívnej geometrie, Radlinského 11, 810 05 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Blood parasites of the order Haemosporida and their possible impact to physiology stress of avian host. Physiological stress and parasite prevalence could enable us to develop early warning indicators for the health status and general condition of entire bird communities. As a first step towards this understanding, we monitored host-parasite interactions and physiological stress in a bird community. We captured and took blood samples of 143 individuals belonging to 16 bird species. Blood parasites (Haemosporidians) were identified and the ratio of heterophiles to lymphocytes (H/L ratio) was used as a measure for physiological stress. We detected haemosporidian infections in half of the samples (51 %). Our findings suggest that the prevalence of haemosporidian parasites is not equally distributed across the bird community and might be tightly linked to physiological fitness responses of birds.

Keywords: *Haemosporida parasites; physiology stress; white blood cells; birds*

Úvod a formulácia cieľa

Krvinkovky (Haemosporida) sú jednobunkové organizmy patriace do kmeňa Apicomplexa, ktoré napádajú krvné bunky stavovcov. V porovnaní s inými stavovcami sú u vtákov najviac rozšírené, dosahujú najvyššiu prevalenciu a genetickú diverzitu [1]. Môžu mať negatívny vplyv na svojich hostiteľov, keďže infekcie často zapríčiňujú zníženie reprodukčných schopností a telesnej kondície [2]. Krvinkovky považujeme za medicínsky a veterinárne významné patogény, ktoré môžu spôsobovať rozličné ochorenia. Viditeľné príznaky u hostiteľov sa však neprejavujú v každej fáze infekcie. Parazitóza je obvykle najnebezpečnejšia počas akútnej fázy infekcie, pri ktorej dochádza k vysokému nárastu parazitov v krvinkách. Typickými príznakmi sú neurologické poruchy, anémia, letargia, dýchavičnosť až smrť. Počas chronickej fázy infekcie je parazitóza nízka a často prechádza do latentnej fázy, pri ktorej sa krvný parazit presúva do tkanív hostiteľa, v ktorých je schopný zotrvať roky [3].

Fyziologický stres je u mnohých živočíchov dôležitým činiteľom, ktorý napomáha reflektovať ich životné podmienky v zajať aj vo voľnej prírode [4]. Najpoužívanější metóda na sledovanie fyziologického stresu živočíchov sú leukocytové profily, pri ktorých sa

zohľadňujú pomery jednotlivých typov bielych krviniek v krvnej vzorke jedinca [5]. Najdôležitejším ukazovateľom fyziologického stresu je pomer heterofilov alebo neutrofilov ku lymfocytom (H/L alebo N/L) v reakcii na rozličné stresory, ako napríklad infekcia. Zvýšené počty lymfocytov v krvi jedinca väčšinou napovedajú o optimálnom zdravotnom stave hostiteľa, pričom zvýšený počet heterofilov napovedá zvyčajne o prítomnosti novej infekcie. Táto metóda môže poskytnúť aspoň čiastočné informácie, či je daný jedinec vystavený stresu z rôznych faktorov [6].

Cieľom štúdie bolo zistiť prítomnosť, prevalenciu a intenzitu krvných parazitov (*Haemoproteus*, *Leucocytozoon* a *Plasmodium*) a určiť či hladina fyziologického stresu koreluje s parazitáciou krvinkovkami. Imunitnú odpoveď sme určovali pomocou leukocytových profilov vtákov, čo je štandardne používaná metóda na určenie imunitnej kondície mnohých stavovcov.

Materiál a metódy

Výskum zameraný na odber krvi vtákov sa uskutočňoval na troch rôznych lokalitách počas rokov 2022 a 2023 na území Slovenskej republiky. Prvou lokalitou bol Ornitologický stacionár Drienovec (48°36'59" SŠ 20°54'56" VD) nachádzajúci sa na východnom Slovensku, kde sa vtáky odchyťovali pomocou nárazových sietí. V poradí druhou lokalitou bolo územie zoologickej záhrady Bratislava (ZOO), ktorá sa nachádza v Mlynskej doline v Bratislavskej mestskej časti Karlova Ves (48°9'49" SŠ 17°4'14" VD). Treťou lokalitou bolo okolie Prírodovedeckej fakulty UK (48°8'56" SŠ 17°4'17" VD), v Mlynskej doline v Bratislavskej mestskej časti Karlova Ves. Na oboch lokalitách (ZOO Bratislava a Prírodovedecká fakulta UK) boli vtáky vyberané z búdok počas ich nocovania a po odbere krvi boli vrátené na pôvodné miesto. Krv sme odoberali z krídlovej žily pomocou sterilných inzulínových injekcií a kapilár. Krvné roztery sme zafarbili metódou Giemsa-Romanowski [3] a neskôr boli krvné parazity morfológicky určované z krvného rozteru pomocou svetelného mikroskopu [7]. Intenzitu infekcie sme sledovali podľa počtu krvných parazitov. Nízka intenzita infekcie je považovaná pri 1-10 parazitov v jednom krvnom roztere, stredná intenzita infekcie je pri 11-100 parazitov v jednom krvnom roztere a vysoká intenzita infekcie je pri viac ako 10 parazitov v jednom mikroskopickom zornom poli [8]. Fyziologický stres sme analyzovali pomocou metódy leukocytových profilov, pri ktorom bolo spočítaných 100 bielych krviniek v každej krvnej vzorke. Vyhodnocovali sme percentuálne zastúpenie jednotlivých typov bielych krviniek a pre každú vzorku sme vypočítali pomer H/L [9]. Dáta boli štatisticky analyzované v programoch PAST 4.04.exe (korelačná analýza) a R 4.2.2 (párový t-test).

Výsledky a diskusia

Analyzovali sme 143 krvných vzoriek 16-tich druhov vtákov. Celková prevalencia sledovaných parazitov bola 51,05 %. Vtáky boli infikované všetkými tromi rodmi parazitov – *Haemoproteus*, *Plasmodium* a *Leucocytozoon*, pri analýzach sme však infekciu špecifickým rodom nevyhodnocovali. Infikovanosť sa pri jednotlivých druhoch líšila. Najviac infikované druhy vtákov boli penica čiernohlavá (93,75 %) a glezg obyčajný (83,33 %). Na lokalitách ZOO a PRIFUK boli odchytené len tri druhy vtákov, čo je spôsobené sezónou a metódou odchyty – na lokalite Drienovec boli vtáky odchyťované počas hniezdnej sezóny do nárazových sietí, na zvyšných lokalitách sa odchyty nocujúcich vtákov v búdkach vykonávali mimo hniezdnej sezóny (tabuľka 1 a 2).

Tab. 1. Celkový prehľad druhov vtákov odchytených (n) na lokalite Drienovec a ich prevalencia

Druhy vtákov		n jedincov	Prevalencia (%)
Penica čiernohlavá	<i>Sylvia atricapilla</i>	16	93,75
Glezg obyčajný	<i>Coccothraustes coccothraustes</i>	12	83,33
Červienka obyčajná	<i>Erithacus rubecula</i>	11	27,00
Trsteniarik spevavý	<i>Acrocephalus palustris</i>	9	33,33
Sýkorka veľká	<i>Parus major</i>	7	14,00
Slávik obyčajný	<i>Luscinia megarhychos</i>	5	20,00
Drozd čierny	<i>Turdus merula</i>	4	50,00
Drozd plavý	<i>Turdus philomelos</i>	4	25,00
Lastovička obyčajná	<i>Hirundo rustica</i>	3	33,33
Kolibiarik spevavý	<i>Phylloscopus trochilus</i>	2	50,00
Ďateľ veľký	<i>Dendrocopos major</i>	2	0,00
Kolibiarik čipčavý	<i>Phylloscopus collybita</i>	2	0,00
Sýkorka belasá	<i>Cyanistes caeruleus</i>	2	0,00
Strnádka žltá	<i>Emberiza citrinella</i>	1	0,00
Sojka obyčajná	<i>Garrulus glandarius</i>	1	100,00

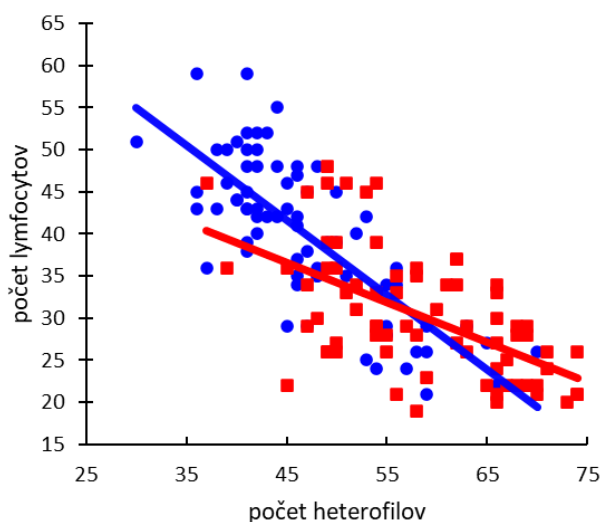
Tab. 2. Celkový prehľad druhov vtákov odchytených (n) na lokalitách ZOO Bratislava a Prírodovedecká fakulta UK a ich prevalencia

Druhy vtákov		n jedincov	Prevalencia (%)
(ZOO) Sýkorka veľká	<i>Parus major</i>	30	63,33
Brhlík obyčajný	<i>Sitta europaea</i>	8	0,44
(PRIFUK) Sýkorka veľká	<i>Parus major</i>	24	37,50

Vysoká intenzita infekcie bola zaznamenaná u 18,31 % vtákov, stredná intenzita u 7,04 % vtákov a nízka intenzita infekcie bola zaznamenaná u 85,91 % vtákov zo všetkých troch lokalít.

Priemerný pomer heterofilov k lymfocytom (H/L) u infikovaných jedincov bol 0,90, u neinfikovaných len 0,73, pričom rozdiely sú vysoko signifikantné (párový t-test, $p=2,19 \cdot 10^{-12}$). Vyšší pomer H/L zistený u infikovaných vtákov evidujú aj iní autori [10], avšak tento parameter môže byť ovplyvnený rôznymi faktormi a preto sa nedá s určitosťou povedať či zvýšený pomer H/L súvisí s výskytom parazitov [5]. Všetky jedince, infikované i neinfikované boli vystavené stresu z odchyty a manipulácie, čo mohlo zvýšiť pomery H/L. Z tohto dôvodu sme vykonali ďalšie štatistické testy na upresnenie zvýšeného pomeru H/L.

Počet lymfocytov a heterofilov na 100 bielych krviniek vysoko štatisticky negatívne koreloval pri jedincoch infikovaných (t-test, $p=4,43 \cdot 10^{-15}$) aj neinfikovaných (t-test, $p=9,18 \cdot 10^{-8}$). Modely lineárnych závislostí pomerného zastúpenia lymfocytov od zastúpenia heterofilov sa však medzi infikovanými a neinfikovanými významne líšia (t-test, $p=7,37 \cdot 10^{-4}$). Prišli sme k záveru, že pokiaľ sa navýšil počet heterofilov, tak sa znížil počet lymfocytov u infikovaných aj neinfikovaných jedincov, ako je zrejmé aj z obrázku 1. Avšak u infikovaných sme zaznamenali vyšší nárast heterofilov v porovnaní s neinfikovanými, čo nám môže indikovať stres spôsobený spomínanými krvnými parazitmi.



Obr. 1. Modely závislosti zastúpenia lymfocytov od zastúpenia heterofilov u infikovaných a neinfikovaných jedincov modrá = infikované, červená = neinfikované jedince

Záver

Zo 143 analyzovaných krvných vzoriek vtákov sme zistili infekciu krvinkovkami

u 51 % jedincov. Z toho 18,31 % vykazovalo vysokú intenzitu infekcie, čo nám napovedá o akútnej fáze infekcie. Výsledky štatistickej analýzy párového t-testu potvrdili zvýšené pomery H/L u infikovaných vtákov. Zvýšené počty heterofilov u infikovaných jedincov sme zistili pomocou negatívnej korelácie medzi infikovanými a neinfikovanými vtákmi. Tento výsledok potvrdzuje našu hypotézu, že zvýšený fyziologický stres môže byť spôsobený infekciou krvnými parazitmi.

PodĎakovanie

Tento výskum bol finančne podporený Vedeckou grantovou agentúrou Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied v rámci projektu 2/0023/20.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Bensch S., Hellgren O., Pérez-Tris J. (2009) Mol. Eco. Res. 9, p. 1353
- [2] Palinauskas V., Valkiūnas G., Bolshakov C. V., et al. (2008) Exp. Parasitol. 120, p. 372
- [3] Valkiūnas G. (2005) Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, p. 17
- [4] Wikelski M., Cooke S. J. (2006) Conservation physiology. Trends in Ecology and Evolution, 21, p. 38
- [5] Davis A. K., Maney D. L., Maerz J. C. (2008) The use of leukocytes profiles to measure stress in vertebrates: A review for ecologists. Functional ecology, p. 760
- [6] Davis A. K. (2005) Effects of handling time and repeated sampling on avian white blood cell counts. Journal of Field Ornithology, 76, p. 334
- [7] Valkiūnas G., Iezhova T.A. (2018) Keys to the avian malaria parasites; Malar. J. 17, 212:, p. 4
- [8] Godfrey R. D., Fedynich A. M., Pence D. B., (1987) Quantification of haematozoa in blood smears, Journal of Wildlife Diseases, 23, p. 558
- [9] Campbell T. W. (1995) Avian Hematology and Cytology, Chapter 9, Iowa State University Press, Ames, Iowa, p. 180
- [10] Norte A. C., Araújo P. M., Sampaio H. L. (2009) Haematozoa infections in a Great Tit *Parus Major* population in Central Portugal: relationships with breeding effort and health, Ibis, 151, p. 681

Vplyv fosforylácie na interakciu GlyT2 so syntenin-1 prostredníctvom domén PDZ

Iveta Jahodová, Martina Baliová, František Jurský

*Ústav molekulárnej biológie Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Oddelenie biochémie a štruktúry proteínov, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovenská republika;
iveta.jahodova@savba.sk*

Abstract

Effect of phosphorylation on the PDZ interaction of GlyT2 with syntenin-1

Glycine is an inhibitory neurotransmitter in the central nervous system. Its extracellular concentration in the synaptic cleft is maintained by glycine transporters GlyT1 and GlyT2, members of the SLC6 family of sodium/chloride-dependent transporters. GlyT1 and GlyT2 are membrane proteins with both N- and C-terminal regions oriented into the cytoplasm. The cytoplasmic C-terminus of GlyT2 contains a PDZ binding motif recognized by PDZ proteins. One of the interaction partners of GlyT2 is syntenin-1 which mediates interaction via its PDZ domain. Syntenin-1 binds to syntaxin 1A, which is known to regulate the plasma membrane insertion of several neurotransmitter transporters. This work aims to study the posttranslational modification of amino acid, phosphorylation, as a possible regulation of the PDZ interaction between GlyT2 and syntenin-1. For this purpose we used phosphomimetic mutation in the PDZ-binding motif GlyT2. Results suggest that the interaction of GlyT2 with syntenin-1 is regulated by phosphorylation.

Keywords: *glycine transporter GlyT2; syntenin-1; PDZ interaction*

Úvod a formulácia cieľa

Glycín ako aminokyselina (AA) je dôležitým neuroprenášačom v mnohých inhibičných synapsách zadnej časti mozgu a miechy. Jeho vychytávanie z extracelulárneho prostredia synaptickej štrbiny, v ktorom pôsobí viazaním sa na glycínové receptory v dendritoch postsynaptických neurónov, naspäť do axónov presynaptických neurónov je zabezpečené prostredníctvom transportérov. Glycínové transportéry, GlyT1 a GlyT2, patria do rodiny SLC6 sodíkovo/chloridovo-závislých transportérov neuroprenášačov. GlyT2 sa v centrálnej nervovej sústave vyskytuje v mieche, mozgovom kmeni a mozočku a z hľadiska štruktúry má 12 transmembránových častí s N- a C- koncom orientovaným do cytoplazmy [1 – 3]. Pri transporte glycínu cytoplazmatické konce nezohrávajú žiadnu priamu úlohu, avšak mohli by slúžiť na reguláciu alebo zmenu funkcie transportéra prostredníctvom rôznych modifikácií na N- alebo C-konci, alebo naviazaním interakčného partnera na tieto konce v cytoplazme. Napríklad oproti ostatným SLC6 transportérom, nezvyčajne dlhý (200 AA) neusporiadaný N-koniec GlyT2, môže byť štiepený kalpainovou proteázou [4, 5]. Na C-konci GlyT2 je zároveň väzbový motív pre PDZ (PBM), ktorý je rozpoznávaný proteínmi s doménou PDZ.

Doména PDZ je jeden z najviac využívaných proteínových interakčných modulov a bola pomenovaná po prvých troch identifikovaných proteínov, ktoré obsahovali túto doménu,

a to postsynaptický denzný proteín PSD95, proteín DLG1 a proteín tesných spojení ZO-1. PDZ je relatívne malá doména obsahujúca 80 až 100 AA. Pozostáva z ôsmich častí vytvárajúcich sekundárne štruktúry, a to zo šiestich β -vlákien a dvoch α -helixov, pričom sekvenciou sa od seba jednotlivé PDZ odlišujú, ale ich štruktúra zostáva konzervovaná. Interakcia s PDZ je väčšinou podmienená rozpoznávaním C-konca ligandu, ktorý sa označuje ako PBM. V PBM sú kľúčové dve pozície, a to úplne posledná AA na C-konci v pozícii 0 (P0), ktorá je hydrofóbná z dôvodu interakcie s hydrofóbnym vreckom PDZ a tretia AA od C-konca v P-2, ktorá zodpovedá za špecifickosť interakcie s PDZ [6].

Príkladom interakčného partnera s PDZ pre GlyT2 je syntenin-1, ktorý interaguje zároveň aj s komponentom komplexu SNARE, syntaxin 1A, zabezpečujúci nasmerovanie GlyT2 k membráne, a teda pomocou PDZ interakcie by mohol byť tento proces regulovaný [7]. V našej práci sme sa zamerali na skúmanie regulácie interakcie medzi syntenin-1 a GlyT2, či môže potenciálna fosforylácia v PBM GlyT2 (-LELGTCQ) ovplyvniť identifikovanú interakciu, pretože obsahuje fosforylovateľnú AA treonín 795 v P-2 podľa nomenklatury PDZ. Cieľom práce bolo pripraviť si fúzne proteíny a fosfomimetického mutantu T795D, ktoré sme po ich izolácii využili v *in vitro* interakciách a na ich základe sme sledovali vplyv potenciálnej fosforylácie v PBM na PDZ interakciu.

Materiál a metódy

Príprava konštruktov

Na vytvorenie konštruktov sme využili plazmid pGEX-5X-1 (Amersham Biosciences AB) pre vytvorenie fúzneho proteínu s glutatión-S-transferázou (GST), pET21a(+) (Novagen, Germany) pre vytvorenie fúzneho proteínu s doménou viažucou sa na celulózu (CBD) a pET28a (Novagen, Germany) pre vytvorenie fúzneho proteínu s hexahistidínovým motívom. Vektory sme v prvom kroku poštípili pomocou vhodných restriktčných endonukleáz a následne sme do nich vložili fragmenty – gén pre syntenin-1, syntenin-1-PDZ1, syntenin-1-PDZ2, syntenin-1-PDZ1-2, s tým, že tieto sekvencie obsahovali na začiatku (EcoRI) a na konci (SalI) sekvencie štiepne mieste prislúchajúce daným restriktčným endonukleázam, s T4 DNA ligázou (NEB, USA). Pripravené vektory sme transformovali do buniek *E.coli* XL10-Gold (Agilent, USA) a vysiali sme ich na platne s Luria broth (LB) médiom s obsahom príslušného antibiotika (Ampicilín 100 μ g/ml, Kanamycín 50 μ g/ml). Prítomnosť narastených rekombinantov sme overili pomocou kolóniovej PCR s vizualizáciou na agarózovom géli. Po izolácii plazmidovej DNA použitím komerčnej sady GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) podľa návodu výrobcu sme správnosť

rekombinantov overili aj pomocou sekvenovania (Eurofins Genomics, Germany).

Expresia a izolácia proteínov

Overené rekombinatné plazmidy sme transformovali do kompetentných buniek *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen, Germany) a následne sme malé inokulum kultivovali v LB médiu s príslušným antibiotikom (Ampicilín 100 µg/ml, Kanamycín 50 µg/ml) pri 37 °C cez noc. Ďalší deň sme odobrali z nočnej kultúry do väčšieho objemu nového LB média v pomere 1:30 a kultivovali 2 hodiny pri 37 °C a 180 rpm. Potom sme kultúry presunuli na 16 °C a po 30 minútach sme pridali IPTG na finálnu koncentráciu 0,3 mM, a tým sme indukovali expresiu proteínov. Indukciu sme realizovali počas noci pri 16 °C a 180 rpm.

Bunkovú kultúru po expresii sme sedimentovali a v prípade proteínov fúzovaných s GST a CBD sme na ich rozsuspendovanie použili homogenizačný roztok (25 mM Tris-HCl pH = 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA pH = 7,5, 1 % Triton-X100) a pri rekombinantnom proteíne celého syntenin-1 s hexahistidínovým motívom sme použili homogenizačný roztok (25 mM fosfátový roztok pH = 7,5, 150 mM NaCl, 20 mM imidazol pH = 7,5, 1 % Triton X-100). Po sonikácii sme bunkové extrakty v prípade fúzných proteínov s CBD rovno použili na interakciu a v prípade fúzných proteínov s GST alebo s hexahistidínovým motívom sme ešte inkubovali s glutatión-sefarózou (Amersham Biosciences AB, Sweden) alebo s Ni-NTA agarózou (Sigma, USA), na ktorú sme proteíny naviazali. Takto pripravené vzorky sme si overili pomocou polyakrylamidovej gélovej elektroforézy v prítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) v 12 % géli a následne sme ich uložili na -20 °C pre ďalšie experimenty.

Príprava intaktného GlyT2 a jeho mutovanej formy exprimovaných v N2a bunkách

Myšaciu neuroblastómovú bunkovú líniu N2a (American Type Culture Collection Rockville, USA) sme transfekovali *in vitro* s plazmidom pEGFPN1Δ [8], do ktorého sme vložili pomocou lineárneho polyetylénimínu (PEI) [9] gén pre celý GlyT2, prípadne jeho mutovanú formu GlyT2-T795D pripravenú pomocou Quick-change mutagenesis kit (Agilent, USA). Pre kultiváciu N2a sme využili DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Sigma, USA) s penicilínom a streptomycínom (Sigma, USA), pričom N2a sme inkubovali v prítomnosti 5 % CO₂ a teplote 37 °C. Po kultivácii sme bunky zaliali extrakčným roztokom (25 mM Tris-HCl pH = 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA pH = 7,5, 1 % Triton X-100) a po 1 hod v ľade sme bunkový extrakt separovali od jadier centrifugáciou 15 min, 13 000 g, 4 °C. Pripravený proteínový lyzát sme priamo využili pri *in vitro* interakciách.

In vitro interakcie

Na sledovanie interakcií sme využili takzvanú metódu pull-down assay. K 1 ml extraktom s fúznymi proteínmi s CBD sme pridali 30 µl proteínu fúzaného s GST

imobilizovaného na glutatión-sefaróze. Po 1 hod interakcii pri RT sme proteíny premyli a eluovali pomocou SDS vzorkového roztoku (0,125 mM Tris-HCl pH = 6,8, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) 2 –merkaptoetanol, 0,05 % (w/v) brómfenolová modrá, 6 M močovina). Štúdium *in vitro* interakcií sme sledovali pomocou 12 % SDS-PAGE s vizualizovaným farbením s Coomassie Brilliant Blue R-250.

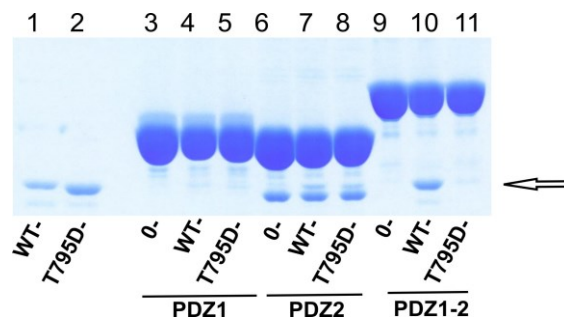
K 1 ml pripravenému proteínovému lyzátu z N2a sme pridali 30 µl imobilizovaného proteínu s hexahistidínovým motívom na Ni-NTA agarózu. Po 5 hod interakcii pri RT sme proteíny premyli a eluovali pomocou SDS vzorkového roztoku. Štúdium *in vitro* interakcií sme sledovali pomocou 7,5 % SDS-PAGE a následnej Western blot analýzy.

Western blot analýza

Na prenos proteínov z interakcií separovaných pomocou SDS-PAGE sme využili polyvinylidénfluoridovú (PVDF) membránu, pričom prenos prebiehal v roztoku (25 mM Tris-HCl pH = 8,3, 192 mM glycín). Po ukončení sme PVDF membránu blokovali po dobu 60 minút v 3 % odtučnenom sušenom mlieku v roztoku (25 mM Tris-HCl pH = 7,5, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20) pri RT. Následne sme PVDF membránu inkubovali 60 minút v špecifickej králičej primárnej protilátke anti-GlyT2N [5]. K premytej membráne sme pridali kozie anti-králičie sekundárne protilátky konjugované s chrenovou peroxidázou (Merck, Germany) s riedením v roztoku 3 % mlieka v roztoku (25 mM Tris-HCl pH = 7,5, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20) a inkubovali ju 30 minút pri RT. Po premytí PVDF sme detekovali protilátky chemiluminiscenčne zachytávaním vyžiareného svetla na RTG film. Hodnoty optickej hustoty jednotlivých signálov na RTG filme boli analyzované v ImageJ [10] a GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Software, USA).

Výsledky a diskusia

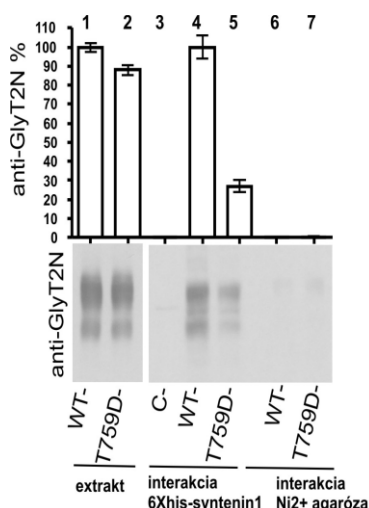
GlyT2 je zložený zo 797 AA, pričom jeho C-koniec obsahuje PBM. V tejto časti dochádza k interakcii so syntenin-1, ktorý by mohol zohrávať úlohu pri nasmerovaní GlyT2 na membránu, keďže interaguje aj so syntaxin 1A [7]. Pri PDZ interakcii sú dôležité pozície P0 a P-2, ale okrem nich sa na špecificite PDZ podieľajú AA, ktoré sú ďalej od C-konca. Selekčná špecificita viazania ligandu bola pozorovaná až na 8 AA na C-konci po pozíciu P-7 [11]. Preto pre naše počiatkové experimenty sme si pripravili fragmenty C-konca GlyT2, ktorý obsahoval posledných 7 AA. Po pripravení príslušných fúzných proteínov sme sledovali vplyv PDZ1, PDZ2 a tandemu PDZ1-2 synteninu-1 na C-koniec GlyT2 a jeho mutovanej formy T795D, ktorá mimikuje fosforyláciu (fosfomimetická mutácia) (Obr. 1).



Obr. 1. SDS-PAGE analýza interakcie C-terminálneho 7 AA PBM divého typu (WT) GlyT2 a jeho mutovanej formy T795D s PDZ doménami synteninu-1. 1. dráha: proteínový extrakt C-konca GlyT2 fúzovaný s CBD (WT), 2. dráha: proteínový extrakt C-konca GlyT2 s fosfomimetickou mutáciou T795D fúzovaný s CBD, 3., 4. a 5. dráha: interakcie PDZ1 syntenínu-1 fúzovanej s GST s kontrolným tlmivým roztokom (0) a extraktami (WT) a (T795D). Podobné interakcie kontrolného roztoku a extraktov s PDZ2 synteninu-1 fúzovanej s GST v dráhach 6, 7, 8 a s tandemom oboch domén PDZ1-2 synteninu-1 fúzovanej s GST v dráhach 9, 10 a 11.

Overili sme, že syntenin-1 interaguje s oboma doménami PDZ, ale hlavne s tandemom domén PDZ1-2 GlyT2, ako uvádzali autori [7]. Zároveň sme sledovali vplyv potenciálnej fosforylácie na PDZ interakciu medzi syntenin-1 a GlyT2 a fosfomimetická mutácia mala veľmi malý vplyv pri samotnej PDZ2 synteninu-1, ale pri tandeme PDZ1-2 sme zistili, že dochádza k signifikateľne zníženej interakcii oproti interakcii s divým typom GlyT2. Je to pravdepodobné spôsobené zbalenejšou štruktúrou syntenin-1, nie je to iba jedna samotná PDZ.

Následne sme overili, či k potenciálnemu zníženiu dochádza aj v prípade intaktného GlyT2 exprimovaného v N2a bunkách spolu s celým syntenin-1, ktorý je fúzovaný s krátkym hexahistidíovým motívom (Obr. 2).



Obr. 2. Sledovanie vplyvu fosfomimetickej mutácie T795D v intaktnom Glyt2 na interakciu s celým syntenin-1 metódou Western blotu spolu s kvantifikáciou signálov 1. dráha: proteínový extrakt GlyT2 (WT) z N2a, 2. dráha: proteínový extrakt GlyT2 s fosfomimetickou mutáciou T795D z N2a, 3. dráha: syntenin-1 s hexahistidíovým motívom (C), 4.dráha: interakcia GlyT2 (WT) so synteninom-1, 5. dráha: interakcia GlyT2-T795D so synteninom-1. 6. a 7. dráha: interakcia extraktov WT a T795D so samotnou Ni-NTA agarózou.

Expresia v N2a bunkách je oveľa nižšia, a preto sme na detekciu interakcie využili Western blot analýzu. Z analýzy je možné pozorovať, že interakcia medzi syntenin-1 a celým GlyT2 s mutovaným T795D je slabšia ako v prípade interakcie s divým typom GlyT2, čo nasvedčuje, že potenciálne fosforylovateľný treonín na P-2 podľa PDZ nomenklatury v GlyT2 môže pomocou jeho fosforylácie ovplyvniť PDZ interakciu so syntenin-1. Tieto výsledky ukazujú, že proces nasmerovania GlyT2 do membrány by mohol byť regulovaný prostredníctvom posttranslačnej modifikácie, fosforylácie, treonínu 795 v PBM GlyT2, ktorá ovplyvní PDZ interakciu so syntenin-1.

Záver

V predloženej práci sme úspešne izolovali fúzne proteíny fragmentu C-konca GlyT2, jeho mutovanej formy T795D a domén PDZ syntenin-1. Potvrdili sme, že pri *in vitro* interakcii PDZ-väzbového motívu GlyT2 so syntenin-1 sa priamo podieľa druhá PDZ syntenin-1. Zároveň sme sledovali, že fosfomimetická mutácia lokalizovaná v PBM GlyT2, T795D, viditeľne znižovala interakciu v prípade prítomnosti tandemu domén PDZ syntenin-1. Na interakciu a negatívny vplyv fosfomimetickej mutácie sme taktiež poukázali s intaktným exprimovaným GlyT2 v N2a bunkách spolu s celým syntenin-1.

PodĎakovanie

Táto práca bola podporená z projektu VEGA, Grant 2/0127/21.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Gundersen R. Y., Vaagenes P., Breivik T., et al. (2005) Acta Anaesthesiol. Scand. 49, p. 1108
- [2] Kristensen A. S., Andersen J., Jorgensen T. N., et al. (2011) Pharmacol. Rev. 63, p. 585
- [3] Jursky F., Nelson N. (1995) J. Neurochem. 64, p. 1026
- [4] Baliova M., Jursky F. (2020) J. Mol. Neurosci. 70(8), p. 1216
- [5] Baliova M., Betz H., Jursky F. (2004) J. Neurochem. 88, p. 227
- [6] Doyle D. A., Lee A., Lewis J. (1996) Cell 85, p. 1067
- [7] Ohno K., Koroll M., Far O. E., et al. (2004) Mol. Cell. Neurosci. 26, p. 518
- [8] Baliova M., Jursky F. (2005) Neurochem. Res. 30, p. 1093
- [9] Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M. A. (1995) PNAS USA 92, p. 7297
- [10] ImageJ [Citované: 21. marec 2023] <<http://imagej.nih.gov/ij>>
- [11] Songyang Z., Fanning A. S., Fu C., et al. (1997) Science 275 (5296), p. 73

Molekulárna fylogenéza rodu *Dolichophis* (Reptilia: Colubridae)

Adam Javorčík, Daniel Jablonski

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra zoológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; javorcik.adam@gmail.com

Abstract

Molecular phylogeny of the genus *Dolichophis* (Reptilia: Colubridae)

The molecular phylogeny of the genus *Dolichophis*, which comprises four species distributed from central Europe to the Middle East and Central Asia, remains poorly understood. To shed light on the phylogeography of known species, we reconstructed their evolutionary history and relationships using mitochondrial DNA sequences (cyt b). This study presents the most extensive dataset on the studied subject to date, comprising 199 genetically analyzed individuals. The resulting molecular-phylogenetic tree shows six well-supported clades, some of which correspond geographically to currently recognized taxa. Our findings provide a comparative view of the whole genus and especially the first molecular insights into the intraspecific genetic diversity of *Dolichophis jugularis*.

Keywords: Colubridae; Western Palearctic; genetic diversity; taxonomy

Úvod a formulácia cieľa

Druh *Coluber jugularis* opísal Carl Linné v roku 1758 [1]. Do rodu *Coluber* (sensu lato) boli v minulosti zahrnuté druhy obývajúce Ameriku, Európu, Áziu a Afriku [2]. Okolo druhu *Coluber jugularis* bolo od začiatku veľa nejasností, od rôzne uvádzaných morfometrických údajov typového exempláru až po chybnú typovú lokalitu. Ruský prírodovedec Ivan Ivanovich Lepechin opísal pri svojich výskumoch povodia Volgy a oblasti Kaspického mora hada, ktorému však nedal binominálne pomenovanie [3]. Aj keď opis Johanna Friedricha Gmelina v 13. vydaní *Systema Naturae* (1789) je len prekladom Lepechinovho opisu, tak sa Gmelin podľa pravidiel taxonómie považuje za autora opisu *Coluber caspius* [4]. Nikolsky v roku 1909 opísal druh *C. schmidtii* na základe juvenilného jedinca, pričom dospelého pôvodne určil ako iný druh [5]. Taktiež druh *Coluber caspius* bol v minulosti považovaný za poddruh *C. jugularis* na základe faktu, že melanistické formy sa vyskytujú vo všetkých populáciách [6]. Nejasnosti v tejto skupine, pretrvávajúce od čias Carla Linného, reevidoval vo svojej práci Zinner v roku 1972 [7]. Na základe morfologických znakov, etológie a ekológie, rozdelil zástupcov tejto skupiny do dvoch druhov s tromi poddruhmi a opísal dva nové poddruhy. Boli to *C. j. jugularis* Linnaeus 1758, *C. j. asianus* Böttger 1880, *C. j. cypriacus* Zinner 1972, *C. caspius* Gmelin 1789, *C. c. schmidtii* Nikolsky 1909, *C. c. eiselti* Zinner 1972. Schätti v roku 1993 zaradil európske druhy rodu *Coluber* do troch morfologicky rozdielnych skupín, na základe rozdielov v štruktúre hemipenisov, kresby a biochemických znakov. *Coluber caspius* a *C. schmidtii* radil

do jednej skupiny taxónov, zatiaľ čo *C. jugularis* je podľa neho možné definovať na základe morfológie, ekológie a zoogeografie ako iný rod. Taktiež uvádzal že rod *Coluber* s. l. predstavuje heterogénny taxón s rôznymi evolučnými tendenciami [8].

Molekulárno-fylogenetické štúdie naozaj ukázali, že systematické usporiadanie rodu *Coluber* Linnaeus, 1758 s. l. zahŕňalo rôzne staré evolučné línie hadov. Tvorili ho dva hlavné klady zodpovedajúce druhom nového a starého sveta [9, 10]. V prácach zameraných na revíziu tohto parafyletického taxónu bol na základe molekulárnych analýz vyčlenený klad *Hierophis* Fitzinger 1829. Jeho parafýlia bola potvrdená na základe štyroch mitochondriálnych a jedného jadrového génu. Následne bol rozdelený na rody *Hierophis*, *Eirenis* Jan, 1863 a *Dolichophis* Gistel, 1868 [9, 11]. Najaktuálnejšia štúdia, ktorá sa zaoberá fylogenezou čeľade Colubridae v oblasti západného palearktu na základe molekulárnych a osteologických analýz radí do rodu *Dolichophis* druh predtým známy ako *Hierophis andreanus* (Werner, 1917). Multilokusový fylogenetický strom tvoria tri hlavné klady, pričom jeden zahrnuje *D. caspius* a *D. schmidtii*, ktorý je sesterský ku kladom reprezentujúcim *D. jugularis* a *D. andreanus* [12].

V súčasnosti sú do tohto rodu radené veľké aj menšie palearktické druhy s nasledovnými typovými lokalitami [9, 12, 13, 14]:

D. andreanus (Werner, 1917) - provincia Fars, juhozápadný Irán

D. caspius (Gmelin, 1789) - Jaikské stepi, severné pobrežie Kaspického mora.

D. jugularis (Linnaeus, 1758) - okolie oblastí Selcuk and Ephesus, juhozápad Turecka

D. schmidtii (Nikolsky, 1908) - Eschaktchi, región Lenkoran a Tbilisi, Južný Azerbajdžan.

Jediný polytypický druh je *D. jugularis*. Je zastúpený štyrmi poddruhmi. Dvomi kontinentálnymi vo východnom Stredomorí:

D. j. jugularis (Linnaeus, 1758) - juhozápad Turecka, okolie oblastí Selcuk and Ephesus

D. j. asianus (Boettger, 1880) – typová lokalita nie je určená

a dvomi ostrovnými:

D. j. cypriacus (Zinner, 1972) - Cyprus

D. j. zinneri Cattaneo, 2012 - Laerma, Rhodos.

Cieľom tejto práce je prostredníctvom molekulárnych dát poodhaliť evolučné vzťahy ako medzi, tak aj v rámci jednotlivých fylogenetických línií rodu *Dolichophis*. Zmapovať vnútrodruhovú genetickú diverzitu je dôležité hlavne v oblasti Anatólie a Levanty, ktoré sú zásadné, ale málo poznané. V tomto príspevku prezentujeme prvé výsledky založené na analýzach mtDNA, ktoré vďaka rozsiahlemu súboru dát prinášajú komplexnejší pohľad na fylogenezu tohto rodu a vôbec prvýkrát prezentujú vnútrodruhovú genetickú diverzitu taxónu *Dolichophis jugularis*.

Materiál a metódy

Vzorky boli získané nedeštruktívnym spôsobom zo živých zvierat, uhynutých alebo muzeálnych jedincov a to odberom krvi, slín, šupín. Materiál bol zafixovaný v 96% etanole. DNA bola extrahovaná podľa protokolu dodávaného ku komerčnému kitu E.Z.N.A. Tissue DNA Kit (Omega biotek, Norcross, GA, USA). Následne bola DNA amplifikovaná pomocou PCR. Celkový počet cyklov reakcie bol 40 s programom: Počiatočná denaturácia (94 °C, 7 min), denaturácia (94 °C, 40 sek), anelácia (53 °C, 30s), elongácia (72 °C, 1 min), záverečná elongácia (72 °C, 7 min). V prípade potreby bola anelačná teplota upravená na základe teplotného gradientu. Pre genetické analýzy bol použitý gén cytochróm B o dĺžke 1117bp. Použité boli primery H16064, L14910, L14919 [15]. Z niektorých muzeálnych a starých vzoriek bol amplifikovaný krátky úsek pomocou primerov CB1, CB2 [16]. V prípade nedostatočnej kvality sekvencie bol PCR produkt sekvenovaný obojstranne. Novo získaný súbor dát bol doplnený sekvenciami z databázy GenBank. Počty sekvencií z jednotlivých druhov boli nasledujúce: *D. caspius* spolu 134 sekvencií, pričom z databázy GenBank bolo 14, *D. schmidtii* 17 sekvencií (dve sekvencie z databázy GenBank), *D. jugularis* 47 sekvencií (dve sekvencie z databázy GenBank). Pri druhu *D. andreanus* bola jedna sekvencia z databázy GenBank. Celkový súbor dát použitý pre analýzy obsahoval 199 sekvencií. Ako outgroup boli zahrnuté druhy: *Coluber constrictor* Linnaeus, 1758, *Eirenis collaris* (Ménétries, 1832), *Eirenis coronelloides* (Jan, 1863), *Eirenis decemlineatus* (Duméril, Bibron & Duméril), *Eirenis levantinus* Schmidtler & Eiselt, 1991), *Eirenis modestus* (Martin, 1838), *Hemorrhois algiris* (Jan, 1863), *Hemorrhois hippocrepsis* (Linnaeus, 1759), *Hemorrhois ravergeri* (Ménétries, 1832), *Hierophis cypriensis* (Schätti, 1985), *Hierophis gemonensis* (Laurenti, 1768), *Hierophis viridiflavus* (Lacépède 1789), *Natrix helvetica* (Lacépède 1789), *Natrix astreptophora* (Seoane, 1885), *Macroprotodon cucullatus* (Geoffroy Saint-Hilaire, 1827), *Platycephalus collaris* (Müller, 1878), *Platycephalus najadum atayevi* (Tuniyev & Shammakov, 1993), *Platycephalus rhodorachis* (Jan, 1863), *Spalerosophis diadema* (Schlegel, 1837).

Na manuálnu kontrolu sekvencií DNA a následnú tvorbu alignmentu bol použitý softvér Geneious Prime. Fylogenetický strom bol počítaný metódou maximálnej vierohodnosti (ML). Podpora stromu bola testovaná metódou bootstrap. Hodnota nad 70 je považovaná ako podporená. Mapové výstupy boli spracované v programoch QGIS 2.18.22 a Adobe Photoshop 23.2.0.

Výsledky a diskusia

Náš súbor sekvencií výrazne rozširuje doteraz publikované pokrytie areálu. Vzorky *D.*

caspius z databázy GenBank pochádzajú z krajín: Maďarsko, Grécko, Rumunsko, Srbsko, Turecko [19]. Naše nové vzorky okrem ďalších lokalít z týchto krajín pokrývajú areál rozprestierajúci sa na území Albánska, Bulharska, Severného Macedónska, Ukrajiny, Kosova, Čiernej Hory. Dve sekvencie *D. schmidt*i z databázy GenBank pochádzajú z Arménska a Turkmenistanu [18,9]. Okrem zvýšenia počtu arménskych lokalít, nové vzorky taktiež pokrývajú lokality na území Turecka, Gruzínska a Ruska. *Dolichophis andreas* je v súbore dát zastúpený publikovanou sekvenciou z Iránu [9]. Pri druhu *D. jugularis* k dvom publikovaným sekvenciám z lokalít na území Jordánska a Turecka [18,9] pribudli lokality z Grécka, Cypru, Libanonu, Iraku a výrazne sa zvýšil ich počet v oblasti Anatólie. Práve rozsiahly počet dát z oblasti Anatólie nám umožnil určiť kontaktné zóny jednotlivých druhov. *D. caspius* a *D. jugularis* sa stretávajú v oblasti juhozápadného a južného Turecka a taktiež na ostrove Kos. Výskyt *D. schmidt*i je čiastočne sympatrický s vyššie spomínanými druhmi, pričom na západe zasahuje až po provinciu Ankara a vo východnom Turecku sa jeho areál prekrýva s areálom *D. jugularis*.

Molekulárno-fylogenetický strom (Obr. 1) tvorí dobre podporené monofylum a ukazuje dva hlavné klad. Prvý (podpora 100) zahŕňa druh *D. caspius*, ktorý je sesterský ku *D. schmidt*i, zatiaľ čo druhý (podpora 100) zahŕňa druhy *D. andreas* a *D. jugularis*. V rámci druhu *D. jugularis* vidíme tri dobre divergované línie. Prvú z týchto línií (podpora 100) tvoria vzorky zahŕňajúce areál tiahnuci sa od gréckych ostrovov Rhodos a Kos, cez juhovýchodnú, južnú a východnú čas pevniny Turecka až po Irak. Táto línia zodpovedá poddruhu *D. j. jugularis*. K nej je sesterská línia, ktorú tvoria jedince z Cypru a provincie Hatay (juh Turecka). K týmto líniám je sesterská línia zastúpená jedincami z Libanonu a Jordánska.

Samostatné línie na fylogenetickom strome sú dobre podporené, divergované a niektoré geograficky korešpondujú s poddruhmi uznávanými v súčasnosti. Z Cypru bol na základe morfológických rozdielov opísaný poddruh *D. j. cypriacus*. Tento poddruh má kratšie a širšie šupiny ako *D. j. jugularis* a konštantne väčšiu plochu čiernej v porovnaní s červenou na brušnej strane tela. Taktiež červené úzke pruhy na chrbtových šupinách zvyčajne chýbajú [7]. Cyprus je známy výskytom niekoľkých endemických druhov a poddruhov plazov a obojživelníkov [19, 20]. Výskyt tejto línie na pevnine otvára priestor viacerým hypotézam, ako napríklad introdukcia človekom. Línia nachádzajúca sa v Libanone a Jordánsku korešponduje s poddruhom *D. j. asianus*. Tento poddruh má najmohutnejšiu stavbu tela, pričom dorzálne šupiny sú najkratšie a najširšie so všetkých poddruhov, a má tiež najvyššie počty ventrálnych a subkaudálnych šupín. Dospelé jedince sú dorzálne sfarbené čierno, ventrálne čierno až tmavošedo, okrem žltej alebo bielej laterálnej a ventrálnej časti hlavy, pričom *D. j. jugularis*

[illegible]

Záver

Pod'akovanie

Zoznam použitej literatúry

- [1] Linnaeus C. (1758) *Systema Naturae per regna tria naturae: secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Stockholm, p. 225
- [2] Schätti B. (1988) *Systematik und Evolution der Schlangengattung Hierophis* Fitzinger, 1843. (Dizertačná práca) University Zürich
- [3] Lepechin I. (1769) *Raznym Provintsiiam Rossiiskago Gosudarstva*. Acad. Sci. Moscow. p. 517
- [4] Gmelin J. F. (1789) *Amphibia - Pisces*. In: Gmelin J. F. (ed.) *Caroli a Linnaei Systema Naturae per Regna Tria Naturae*, Ed. 13. Tome 1(3). G. E. Beer, Lipsiae, p. 1033
- [5] Nikolsky A. M. (1909) *New in Caucasus, Species of Reptiles*. Izvestiya Kavkazskogo Muzeya 4 Tiflis, p. 303
- [6] Terent'ev P. V., Chernov S. A. (1949) *Key to Amphibians and Reptiles*. Sovetskaya Nauka, Moskva, IPST Jerusalem, p. 320
- [7] Zinner H. (1972) *Systematics and Evolution of the Species Group Coluber jugularis* Linnaeus C. (1758) - *Coluber caspius* Gmelin, 1789 (Reptilia, Serpentes). (Dizertačná práca) University Jerusalem
- [8] Schätti B. (1993) *Coluber* Linnaeus, 1759. Zornnatern. In: Böhme (Hrsg.): *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas*. Band 3/1. Schlangen I. Aula. Wiesbaden, p. 115
- [9] Nagy Z. T., Lawson R., Joger U., et al. (2004) *J. Zoolog. Syst. Evol. Res.* 42, p. 223
- [10] Pyron R. A., Burbrink F. T., Wiens J. J. (2013) *BMC Evol. Biol.* 13, p. 93
- [11] Schätti B. (2001) *Rev. Suisse. Zool.* 108, p. 487
- [12] Rajabizadeh M., Pyron R. A., Nazarov R., et al. (2020) *PeerJ.* 8, p. c9016
- [13] Utiger U., Schätti B. (2004) *Rev. Suisse. Zool.* 11, p. 225
- [14] Cattaneo A. (2012) *Nat. Sicil.* 36, p. 77
- [15] Burbrink F. T., Lawson R., Slowinski J. B. (2000) *Evol.* 54, p. 2107
- [16] Kocher T. D., Thomas W. K., Meyer A., et al. (1989) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 86, p. 6196
- [17] Nagy Z. T., Bellaagh M., Wink M., et al. (2010) *Amphibia-Reptilia.* 31, p. 455
- [18] Nagy Z. T., Schmidtler J. F., Joger U., et al. (2003) *Salamandra.* 39, p. 149
- [19] Plötner J., Baier F., Akin et al. (2012). *Zoosyst. Evol.* 88, p. 261
- [20] Baier F., Sparrow D. J., Wiedl H. J. (2013). *The Amphibians and Reptiles of Cyprus*. Chimaira. Frankfurt am Main, p. 25
- [21] Jablonski D., Ribeiro-Júnior M. A., Meiri S., et al. (2021) *Vertebr. Zool.* 71, p. 175

Vzt'ah medzi krvným systémom AB0 a závažným priebehom ochorenia COVID-19

Eszter Juhász, Lenka Vorobeľová, Darina Falbová

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra antropológie,
Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; juhasz23@uniba.sk*

Abstract

Relationship between AB0 blood system and severe disease course of COVID-19

The aim of this study was to investigate the possible correlation between AB0 blood system and the risk of severe form of COVID-19. The immunohematological characteristics of the different AB0 blood groups can be related not only to the risk of COVID-19 but also to other viral infections. We used a questionnaire survey method as our research method, in which we approached a sample of 182 respondents and asked them about their blood group and the severity of their COVID-19 disease. Of the 182 patients with COVID-19, 50 had type A (27.5%), 35 had type B (19.2%), 68 had type O (37.4%), and 29 had type AB blood (15.9%). The risk of severe form of COVID-19 was higher for individuals with blood group AB (17.2%) than for those with blood group B (8.6%). The risk of severe form of COVID-19 was higher for patients with blood group O (5.9%) than for those with blood group A (4.0%). The relationships between COVID-19 disease severity and individual blood groups A, B, AB and O are currently being monitored, but further scientific investigations are needed, particularly in European populations.

Keywords: COVID-19; pandemic; coronavirus; SARS-CoV-2; AB0 blood group; blood type

Úvod a formulácia cieľa

V decembri 2019 sa objavila vo Wuhane v provincii Hubei v Číne nová forma ochorenia zápalu pľúc neznámeho pôvodu. Tieto nové prípady zápalu pľúc boli epidemiologicky spojené s veľkoobchodným trhom s morskými plodmi Huanan. Globálne šírenie SARS-CoV-2 a tisíce úmrtí spôsobených koronavírusovou infekciou (COVID-19) viedli Svetovú zdravotnícku organizáciu (WHO) k vyhláseniu pandémie 12. marca 2020. K dnešnému dňu svet zaplatil za túto pandémiu vysokú cenu z hľadiska stratených ľudských životov, následných ekonomických škôd spôsobených protiepidemickými opatreniami a zvýšenej chudoby [1].

Koronavírusová choroba 2019 (COVID-19) je vysoko patogénna vírusová infekcia, spôsobená vírusom SARS-CoV-2, ktorá bola aj príčinou vzniku globálnej pandémie. Genomická analýza odhalila, že vírus SARS-CoV-2 fylogeneticky súvisí s tzv. SARS-like vírusom netopierov, z tohto dôvodu mohli byť netopiere možnými primárnymi nositeľmi vírusu. Prechodný zdroj pôvodu a prenosu na človeka nie je známy, rýchly prenos z človeka na človeka bol však jednoznačne potvrdený [2].

Snahy o identifikáciu potencionalných medzihostiteľov boli vo Wuhane zanedbané a je naliehavo potrebné objasniť presnú cestu prenosu [3].

U COVID-19 pozitívnych jedincov sa prejavilo niekoľko symptómov, od asymptomatických a ľahkých až po závažné ochorenia a smrť. Medzi bežné príznaky patrí kašeľ, horúčka a dýchavičnosť. Ďalšími príznakmi sú slabosť, malátnosť, respiračná tieseň, bolesť svalov, bolesť hrdla, strata chuti a čuchu, zlyhanie viacerých orgánov, septický šok a krvné zrazeniny. Okrem toho sa pozorovalo aj dlhodobejšie poškodenie orgánov, najmä pľúc a srdca [4].

Krvnoskupinový systém AB0 bol spojený s viacerými infekčnými ochoreniami, vrátane hepatitídy B a hemoragickej horúčky dengue. COVID-19 je nové respiračné infekčné ochorenie a preto vzťah medzi COVID-19 a systémom krvných skupín AB0 je predmetom mnohých súčasných výskumov [5, 6].

Cieľom uvedenej štúdie je preukázať vzťah AB0 systému so závažnosťou ochorenia COVID-19 v slovenskej populácii.

Materiál a metódy

Praktickú časť našej práce sme realizovali formou dotazníkového prieskumu. Prostredníctvom elektronickej komunikácie a sociálnych sietí sme doručili dotazník vybranej skupine probandov. Výskum bol realizovaný prostredníctvom aplikácie Formuláre Google (Google Forms) v priebehu novembra a decembra 2022. Celkový počet probandov bol 182, z toho 27 mužov a 155 žien vekovej kategórie 10 – 80 rokov. Do výskumu boli zapojení jedinci hlavne z oblasti západného Slovenska.

Pri výskume bol použitý odborný dotazník vytvorený Katedrou antropológie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského, ktorý bol doplnený o otázky týkajúce sa krvnej skupiny probandov. Dotazník bol anonymný a obsahoval 18 otázok, ktoré slúžili na zistenie údajov týkajúcich sa priebehu ochorenia COVID-19 a krvnej skupiny. Otázky boli zamerané aj na pohlavie, vek a taktiež aj na príznaky pacientov s ochorením COVID-19.

V tomto príspevku sme analyzovali závažnosť ochorenia COVID-19 v súvislosti s krvným systémom AB0. Probandom bola položená otázka „Akú formu ochorenia COVID-19 ste prekonali?“. Mali na výber nasledovné možnosti odpovedí: ľahká forma, stredne ťažká forma, ťažká forma. Probandi odpovedali subjektívne. Odpovede probandov týkajúce sa závažnosti ochorenia COVID-19 boli následne skontrolované na základe odpovedí, ktoré zvolili pri otázke „Akými príznakmi sa u Vás prejavovalo ochorenie?“. Možnosti odpovedí boli nasledovné: kašeľ, bolesť v krku, dýchavičnosť, horúčka, pocit zvýšenej teploty, strata čuchu a/alebo chuti, bolesť hlavy, celková slabosť, nevoľnosť, žalúdočné a črevné prejavy, nádcha, bolesť svalov a kĺbov, vyrážka.

Odpovede probandov sme vyhodnocovali pomocou programu Microsoft Excel a pomocou štatistického programu SPSS Statistics verzie 20.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). Na zistenie vzťahu medzi AB0 skupinou a ochorením COVID-19 bol použitý Pearsonov chí-kvadrát test. Za štatisticky významnú bola považovaná hodnota významnosti $p < 0,05$.

Výsledky a diskusia

Na základe odpovedí probandov sme skúmali súvislosť medzi jednotlivými krvnými skupinami a závažnosťou ochorenia COVID-19.

Tab. 1. Početnosť jednotlivých foriem priebehu ochorenia COVID-19 v závislosti od systému krvných skupín AB0

Krvná skupina	0		A		B		AB		Chí-kvadrát test
Forma COVID-19	n	%	n	%	n	%	n	%	p-hodnota
Ľahká forma	34	50,0	25	50,0	17	48,6	13	44,8	0,535
Stredná forma	30	44,1	23	46,0	15	42,9	11	37,9	
Ťažká forma	4	5,9	2	4,0	3	8,6	5	17,2	

V Tab. 1. sú zhrnuté výsledky nášho súboru ohľadom jednotlivých foriem ochorenia v závislosti od krvnej skupiny probandov. Čo sa týka probandov s krvnou skupinou 0, 50,0 % z nich prekonalo ľahkú formu ochorenia, 44,1 % strednú formu a len 5,9 % ťažkú formu ochorenia COVID-19. Podľa odpovedí mala tak isto polovica (50,0 %) infikovaných osôb s krvnou skupinou A ľahký priebeh ochorenia, 46,0 % stredný priebeh a 4,0 % ťažký priebeh ochorenia COVID-19. Probandi s krvnou B podľa prieskumu prekonali ochorenie COVID-19 v 48,6 %-ách ľahko, v 42,9 %-ách stredne ťažko a v 8,6 %-ách ťažko. Čo sa týka infikovaných s krvnou skupinou AB, 44,8 % prekonalo ľahkú formu ochorenia, 37,9 % prekonalo strednú formu ochorenia a 17,2 % ťažkú formu.

Z výsledkov nášho súboru vyplýva, že u probandov s krvnou skupinou AB sa ochorenie COVID-19 prejavovalo závažnejšími príznakmi. Jedinci s krvnou skupinou A alebo 0 pocítovali ťažkú formu ochorenia COVID-19 v najmenej miere. Avšak, výsledky chí-kvadrát testu nepreukázali štatisticky signifikantný vzťah medzi ABO krvným systémom a závažnosťou ochorenia COVID-19 ($p = 0,535$).

Distribúcia krvných skupín v našom súbore bola nasledovná: jedinci s krvnou skupinou A tvoria 27,5 % vzorky, jedinci s krvnou skupinou B 19,2 %, jedinci s krvnou skupinou 0 37,4 % a jedinci s krvnou skupinou AB 15,9 %. Ak porovnáme získané percentá distribúcie krvných

skupín mojej vzorky s percentami distribúcie krvných skupín v Českej republike, pozorovateľné sú výrazné rozdiely v krvnej skupine A, ďalej v krvnej skupine AB. Jedinci s krvnou skupinou A tvoria 42% populácie Českej republiky, kým v mojej vzorke distribúcia krvnej skupiny A je 27,5 %. Pri krvnej skupine AB je tiež signifikantný rozdiel. Percento distribúcie krvnej skupiny AB českej populácie je 8 %, kým v mojej vzorke distribúcia krvnej skupiny AB predstavuje 15,9 %.

Tab. 2. Podiely krvných skupín v našej vzorke

A	B	0	AB
27,5 %	19,2 %	37,4 %	15,9 %

Tab. 3. Podiely krvných skupín v populácii Českej republiky (Český červený kríž, 2011)

A+	A-	B+	B-	0+	0-	AB+	AB-
36,0 %	6,0 %	15,0 %	3,0 %	27,0 %	5,0 %	7,0 %	1,0 %

Zahraničné štúdie v rôznych populáciách poukázali aj na iné výsledky. Podľa štúdie Wu a kol. (2020), ktorá bola zameraná na čínsku populáciu, najrizikovejšia krvná skupina v súvislosti so závažnosťou ochorenia COVID-19 je krvná skupina A a najmenšiemu riziku sú vystavení jedinci s krvnou skupinou 0 [7]. Zietz a kol. (2020) analyzovali pacientov s COVID-19 v nemocničnom systéme New York Presbyterian v USA. Hľadali súvislosť medzi krvným systémom AB0 a infekciou, intubáciou a smrťou infikovaného pacienta. Zistili mierne zvýšenú prevalenciu infekcie medzi non-0 typmi. Riziko intubácie bolo znížené u pacientov s krvnou skupinou A, naopak zvýšené u pacientov s krvnou skupinou AB a B v porovnaní s typom 0. Riziko úmrtia u infikovaných pacientov bolo zvýšené pre typ AB a znížené pre typy A a B [8]. Monaco a kol. (2021) použili údaje zo 75 krajín sveta, z toho 35 európskych, 21 ázijských, 7 afrických, 6 severoamerických, 4 juhoamerických krajín a 2 zaoceánske krajiny. Zistili, že krvná skupina B Rh+ je dôležitým rizikovým faktorom závažnosti ochorenia COVID-19, čo potvrdzuje predchádzajúce zistenia, že krvné skupiny sú spojené so závažnosťou ochorenia COVID-19 a taktiež s fatálnymi následkami tohto ochorenia [9].

Na základe doteraz publikovaných výstupov vedeckých výskumov a štúdií sa dá predpokladať, že existuje korelácia medzi rizikom a závažnosťou ochorenia COVID-19 a krvným systémom AB0. Hoci, naša štúdia uvedený vzťah nepotvrdila.

Napriek tomu, že v súčasnosti sa vo svete intenzívne monitorujú vlastnosti vírusu SARS-CoV-2 a vzťahy medzi závažnosťou ochorenia COVID-19 a jednotlivými krvnými

skupinami A, B, AB a 0, sú potrebné ďalšie vedecké výskumy, najmä v rámci európskej populácie.

Záver

Na základe našich výsledkov môžeme konštatovať, že najčastejšie pociťovali závažnejšie príznaky ochorenia COVID-19 probandi s krvnou skupinou AB alebo B. Probandi s krvnou skupinou A alebo 0 pociťovali v najmenšej miere závažnejšie príznaky ochorenia COVID-19.

PodĎakovanie

Táto publikácia je výsledkom realizácie projektov: KEGA 046UK-4/2023 a Vedeckého parku Univerzity Komenského v Bratislave podporeného z Operačného programu Výskum a vývoj financovaného z ERDF. [Grant number: ITMS 26240220086, ITMS2014p: 313021D075].

Zoznam použitej literatúry

- [1] Ciotti M., Ciccozi M., Terrinoni A., et al. (2020) Taylor Francis 57(6), p. 365
- [2] Sheeren M. A., Khan S., Kazmi A., et al. (2020) J. Adv. Res. 24, p. 91
- [3] Velavan T. P., Meyer C. G. (2020) Trop. Med. Int. Health. 25(3), p. 278
- [4] Kabrah S. M., Kabrah A. M., Flemban A. F., et al. (2021) Transfus. Apher. Sci. 60(4) e103169
- [5] Fan W., Su Zi, Bin Y., et al. (2020) Nature 579(7798), p. 265
- [6] Kabrah S. M., Kabrah A. M., Flemban A. F., et al. (2021) Transfus. Apher. Sci. 60(4) e103169
- [7] Wu Y., Feng Z., Lia P., et al. (2020) Clin. Chim. Acta 509(2020), p. 220
- [8] Zietz M., Zucker J., Tattonetti N. P. (2020) Nat. Commun. 11(1), p. e5761
- [9] Monaco A., Pantaleo E., Amoroso N., et al. (2021) Sci. Rep. 11(1), p. e24527

Zmeny vo väzbe kyseliny sialovej na plazmatickú membránu býčích spermíí počas dozrievania v nadsemenníku

Vladimíra Kabaňová¹, Jana Komárová¹, Ľubica Horovská², Jana Jankovičová², Katarína Michalková², Petra Sečová², Jana Antalíková²

¹*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;*

kabanova.vladimira@gmail.com

²*Ústav biochémie a genetiky živočíchov Slovenskej akadémie vied, v.v.i., Centrum biovied, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovenská republika*

Abstract

Changes in sialic acid binding in the bull sperm plasma membrane during the epididymal maturation

To acquire the fertilizing ability, sperm must undergo a key process, epididymal maturation. During transit through the epididymis, sperm underwent a series of crucial changes on their surface. One of them is a modification of glycocalyx, a structure consisting of glycoconjugates attached to the sperm plasma membrane. Sialic acid is a terminally bound monosaccharide, essential for the survival of sperm during their transit through the female reproductive tract. By immunofluorescence analysis of bull epididymal spermatozoa using the sialic acid-binding lectins Mal I, Mal II and SNA-I and WGA, we detected modification of the sperm glycocalyx mainly by α 2-3 sialic acid binding on galactose β 1-3 N-acetylgalactosamine or α 2-3 on N-acetylactosamine. However, other modifications predominantly in the sperm head cannot be excluded. The sperm plasma membrane glycocalyx is changed during the passage of the sperm through the epididymis towards the cauda in terms of the binding specificity of sialic acid to various sugar residues, as well as binding to the sperm head or tail.

Keywords: *spermatozoa; sperm maturation; glycocalyx; sialic acid; lectin analysis*

Úvod a formulácia cieľa

Spermie dozrievajú v dvoch funkčne odlišných orgánoch. Semenníky zodpovedajú za ich morfológické dozrievanie, vytvorenie hlavičky, krčku a bičíka, za funkčné dozrievanie nadsemenník [1]. K epididymálnej maturácii dochádza počas prechodu spermíí týmto orgánom, pričom každá z jeho morfológických častí (hlava, telo, chvost) sa na procese maturácie podieľa špecifickým a kľúčovým spôsobom. Vo všeobecnosti dochádza k zmenám na úrovni proteínov, lipidov či sacharidov, ktoré sa nachádzajú na plazmatickej membráne spermíí. Mení sa ich obsah, štruktúra ale aj lokalizácia [2-3]. Výrazne menený je počas epididymálnej maturácie najmä glykokalyx, cca 20 – 60 nm veľká, vysoko variabilná, do priestoru vytrčajúca štruktúra, ktorá je ukotvená do plazmatickej membrány spermie. Glykokalyx je esenciálny pre všetky bunky, no v prípade spermíí zabezpečuje ich prežitie v samičom pohlavnom trakte, inhibuje predčasnú akrozómovú reakciu, potláča imunitnú reakciu samičieho organizmu voči spermiami. Významnú rolu zohráva aj pri kontakte spermie s oocytom [4]. Glykokalyx je tvorený najmä glykoproteínmi a glykolipidmi a na spermii sa

nachádza už počas jej testikulárneho vývinu. Oligosacharidy sú tvorené monosacharidovými podjednotkami, ktoré sa môžu spájať do rôznych kombinácií. Najčastejšie sa vyskytuje galaktóza, N-acetylgalaktózamín (GalNAc), glukóza, N-acetylglukózamín (GluNAc), manóza, či fukóza. Terminálnym monosacharidom často býva „kyselina sialová, čo je všeobecné označenie pre deriváty kyseliny N-acetylneuraminovej. Viaže sa ako negatívne nabitý monosacharid, na reťazce glykánov tvoriace glykokalyx. Posledné roky výskumov poukazujú na fakt, že miera sializácie spermií by mohla byť jedným z kľúčových faktorov pri stanovovaní oplodneniaschopnosti spermií. Jej prítomnosť na spermiách je nevyhnutná pre ich prežitie v samičom pohlavnom trakte, nakoľko prekrýva antigény, ktoré ak sú odhalené, spôsobujú, že samičí imunitný systém vníma spermie ako cudzorodé bunky a cielene ich ničí. Naopak, jej odstránenie, desializácia, je nevyhnutná pre správny proces kapacitácie a väzby na zonu pellucidu oocyту, no tiež znižuje schopnosť aktívneho pohybu spermií alebo ich schopnosť penetrovať hlien krčku maternice [5-6].

Naším cieľom bolo detegovať zmeny vo väzbe kyseliny sialovej na membráne spermií počas ich prechodu nadsemenníkom pomocou vybraných lektínov. Lektíny sú proteíny neimunitného pôvodu, izolované z húb či rastlín, ktoré sú špecificky schopné rozoznávať sacharidové štruktúry [7]. My sme zvolili kombináciu Mal I – izolovaný z *Maackia amuurensis* – I, Mal II – izolovaný z *Maackia amuurensis* – II, SNA-I – izolovaný z *Sambucus nigra*, WGA – izolovaný z *Triticum Vulgare*.

Materiál a metódy

Skúmané spermie pochádzajú z býčích nadsemenníkov, ktoré boli porážané na bitúnku v Malej Mači. Analyzovali sme zmesnú vzorku spermií vždy z najmenej troch jedincov.

Izolácia spermií: Spermie sme izolovali z čerstvo odpreparovaných nadsemenníkov rozdelených na jednotlivé časti (hlavu, telo, chvost) 3-násobným premytím v PBS a centrifugáciou pri 250 x g po dobu 5 minút pri laboratórnej teplote. Následne sme upravili koncentráciu suspenzie v PBS na 10⁷/ml a fixovali 3,7 – 4% paraformaldehydrom za stáleho miešania 10 minút.

Kontrola intaktnosti spermií: Morfologickú intaktnosť spermií, prítomnosť hlavičky a bičíka, sme kontrolovali na náteroch spermií na sklíčkach pomocou mikroskopu vo viditeľnom svetle. Prítomnosť akrozómu sme kontrolovali na spermiách s permeabilizovanou plazmatickou membránou. Tú sme docielili inkubáciou spermií s vymrazeným acetón-metanolom (1:1) počas 5 minút, po ktorom sme naniesli na nátery PNA-TRITC lektín (Vector Laboratories Inc.) (1:300) a inkubovali 30 minút vo vlhkej komôrke, za tmy pri teplote 37°C.

Intaktnosť plazmatickej membrány sme kontrolovali inkubáciou spermií s PNA lektínom v suspenzii za rovnakých podmienok a následnou fixáciou zmesou acetón-metanol na náteroch. Po premytí v PBS a zasúšení sme naniesli krycie médium Fluoroshield s DAPI (Vector Laboratories Inc.) na vizualizáciu jadier spermií. Reakcie sme hodnotili pod epifluorescenčným mikroskopom LeicaDM5500 B s digitálnou kamerou Leica DFC340 FX pri 400-násobnom zväčšení s využitím Leica Advanced Fluorescence software.

Analýza sializácie na spermiách v suspenzii: K získanej suspenzii spermií sme pridali PNA-TRITC a lektíny viažuce kyselinu sialovú (Mal I, Mal II, SNA-I a WGA) konjugované s FITC (fluoresceínizotiokyanátom) (Vector Laboratories Inc.). Spermie z jednotlivých častí nadsemenníka sme spolu s lektínmi inkubovali v tme za stáleho miešania 30 minút pri laboratórnej teplote, premyli a naniesli na sklíčko. Následne sme vzorky zafixovali zmesou acetón-metanolu (1:1) po dobu 5 minút, premyli v PBS, zasušili, naniesli krycie médium Fluoroshield s DAPI a hodnotili pod fluorescenčným mikroskopom.

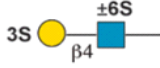
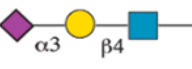
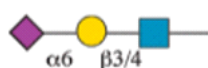
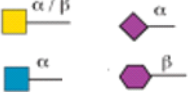
Výsledky a diskusia

Nakoľko našim cieľom bolo zistiť distribúciu kyseliny sialovej na povrchu epididymálnych spermií, viacnásobnou kontrolou sme potvrdili, že väčšina spermií izolovaných z jednotlivých častí nadsemenníka mala hlavičku a bičík (90-98%), neporušený akrozóm (96-97%) a intaktnú plazmatickú membránu (92-95%) (Tab.1). Všetky lektíny použité v imunofluorescenčnej analýze viažu kyselinu sialovú (Sia), líšia sa však preferenciou voči konkrétnemu typu jej väzby v glykokalyxe (Tab. 2), čo odráža ich rozdielny reakčný vzor na spermiách (Obr.1). „Najširšiu“ špecificitu má WGA lektín, ktorý okrem Sia toleruje aj ďalšie cukorné zvyšky [8]. S týmto lektínom reagovalo v hlave 98%, v tele 94% a v chvoste 89% spermií. Menil sa však reakčný vzor, keď smerom od hlavy ku chvostu nadsemenníka stúpal počet spermií, ktoré boli označené lektínom nielen na hlavičke, ale aj chvostíku (Obr. 1), čo môže znamenať dodatočnú sializáciu existujúcich, alebo získanie nových glykoproteínov.

Tab. 1. Kontrola intaktnosti spermií

Druh kontroly	% ± SEM		
	Hlava	Telo	Chvost
Integrita spermií (hlavička, bičík)	90,94 ± 1,11	98,20 ± 0,09	96,14 ± 0,80
Prítomnosť akrozómu	96,86 ± 1,05	97,93 ± 0,73	97,86 ± 0,57
Intaktnosť plazmatickej membrány	92,11 ± 0,25	95,13 ± 0,02	94,47 ± 0,83

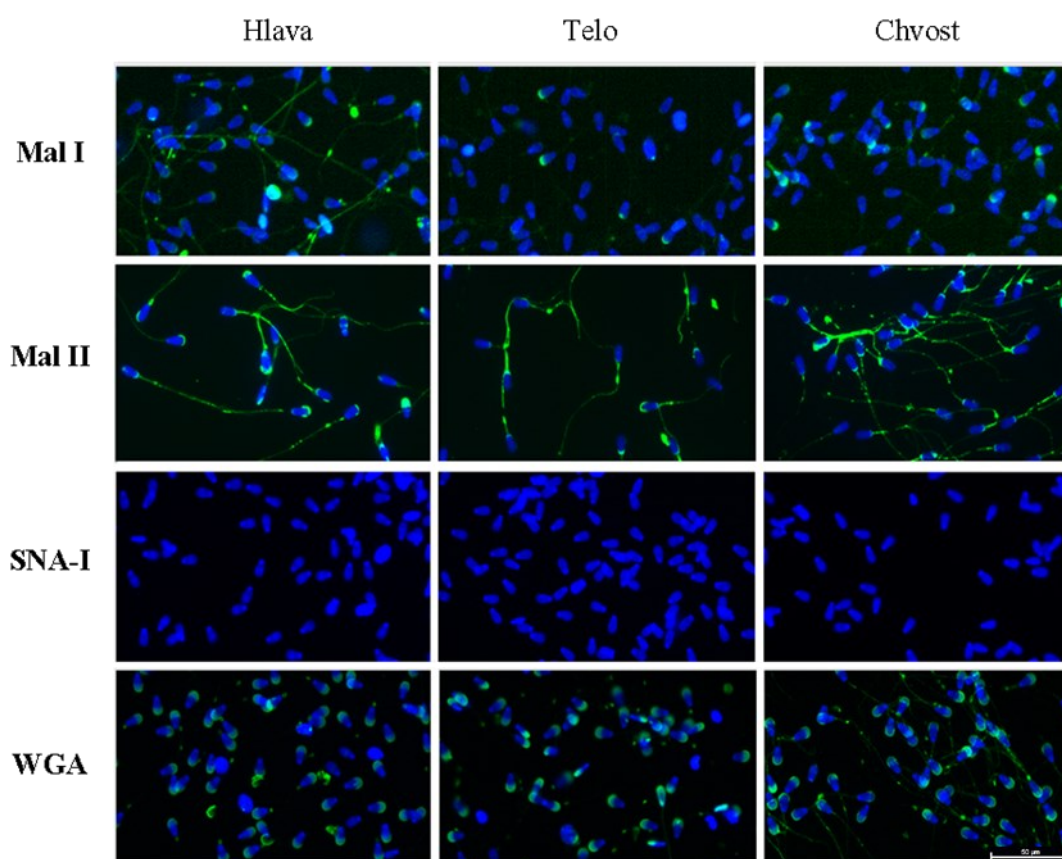
Tab. 2. Podiel spermií reagujúcich s lektínmi viažucimi kyselinu sialovú. Mal I – *Maackia amurensis* I lektín, Mal II – *Maackia amurensis* II lektín, SNA-I – *Sambucus nigra* aglutinín, WGA – „Wheat Germ“ aglutinín. 1: – primárna väzba, 2: – sekundárna väzba, T: – lektín toleruje danú väzbu, I: – daná väzba inhibuje naviazanie lektínu, Gal – galaktóza, Sia – kyselina sialová, Fuc – fukóza, NAc – N-acetyl, LacNAc – N-acetyllaktóзамín, LacdiNAc – N-acetyldilaktóзамín, GalNAc – N-acetylgalaktóзамín, GluNAc – N-acetylglukóзамín [8].

Lektín	Väzba - schéma	Väzba - popis	Reaktivita (%)		
			Hlava	Telo	Chvost
Mal I	1: 	1: terminálny 3-O-sulfatovaný Gal na LacNAc, 6-O-sulfatácia na GluNAc I: α 1-3 Fuc na GluNAc 2: α 2-3-sializovaný LacNAc I: α 1-3/4Fuc na GluNAc T: Neu5Gc	40	-	26
	2: 				
Mal II	1: 	1: α 2-3-sializovaný Gal β -1-3GalNAc na O-glykánach T: 6' substitúciu na GalNAc 2: 3' sulfatovaný Gal β I: Fuc reziduami	100	98	98
	2: 				
SNA-I	1: 	1: α 2-6-sializovaný LacNAc T: Sia variácie 2: α 2-6-sializovaný LacdiNAc	-	-	-
	2: 				
WGA	1: 	1: terminálny GluNAc β 2: terminálny GluNAc α , terminálny NAc s GalNAc α / β , Sia	98	94	89
	2: 				

 N-acetylglukóзамín  Galaktóza  N-acetylgalaktoзамín  Kyselina sialová

Vysokú reaktivitu sme zaznamenali v prípade lektínu Mal II, s preferenčnou väzbou Sia vo forme α 2-3 na Gal β 1-3GalNAc, s ktorým reagovalo v hlave 100% spermií, v tele a chvoste zhodne po približne 98%, reakcia však bola zaznamenaná prevažne na bičíkoch spermií. Rovnaký typ väzby je schopný detegovať aj Mal I, vyššiu preferenciu má však voči inému cukornému zvyšku (Tab.2), čo potvrdzuje jeho nižšia reaktivita v porovnaní s Mal II lektínom.

V hlave reagovalo len 40% spermií, v tele reakcia zmizla a znovu sa objavila v chvoste u 26% spermií. Podstatne nižšie percento reagujúcich spermií pri Mal I môže naznačovať, že na spermiách sa Sia nachádza prevažne viazaná ako $\alpha 2-3$ na Gal β 1-3GalNAc. Vymiznutie reakcie v tele a pokles v chvoste by mohlo byť spôsobené ďalšou modifikáciou - fukozyláciou, ktorá inhibuje väzbu oboch lektínov, v prípade Mal II sa ale reaktivita takmer nezmenila. Nemôžeme preto vylúčiť aj možnosť odštiepenia Sia naviazanej konkrétnou väzbou. Zaujímavá je reakcia bičikov spermií (Obr. 1), ktoré Mal I označil len na spermiách z hlavy nadsemenníka, kým v prípade Mal II je reakcia výrazná a prítomná na bičíku spermií zo všetkých troch častí nadsemenníka. Väzbu $\alpha 2-6$ Sia na LacNAc a LacdiNAc sme nepotvrdili, keďže lektín SNA-I, preferenčne viažuci túto modifikáciu so spermiami z nadsemenníka nereagoval. Na základe reakčného vzoru lektínov Mal I, Mal II a SNA-I možno predpokladať, že Sia modifikuje glykokalyx spermií na bičíku prevažne väzbou $\alpha 2-3$ na Gal β 1-3GalNAc alebo $\alpha 2-3$ na LacNAc. Nemožno však vylúčiť ani ďalšie modifikácie, hlavne v oblasti hlavičky spermie, detegované WGA lektínom tolerujúcim aj iné spôsoby väzby.



Obr. 1. Spermie označené lektínmi viažucimi kyselinu sialovú. Reprezentatívne obrázky spermií z jednotlivých častí nadsemenníka (hlava, telo, chvost) po inkubácii v suspenzii, s fluorescenčne značenými lektínmi Mal I – *Maackia amurensis* -I lektín, Mal II – *Maackia amurensis* – II lektín, SNA – *Sambucus nigra* aglutinín a WGA – „Wheat Germ“ aglutinín.

Záver

Modifikácia glykokalyxu plazmatickej membrány spermii kyselinou sialovou sa mení počas prechodu spermii nadsemenníkom smerom od hlavy ku chvostu, a to z hľadiska spôsobu väzby na rôzne cukorné zvyšky, ako aj miesta väzby na spermiu (hlavička, bičík). Kombinácia lektínov s rôznou preferenciou väzby je dobrým nástrojom pre hlbšiu analýzu týchto zmien na úrovni glykoproteínov a pochopenie ich úlohy v ďalších procesoch súvisiacich s oplodnením.

PodĎakovanie

Tieto experimenty boli finančne podporené grantmi VEGA-2/0027/20 a APVV-19-0111.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Ross M.H., Pawlina W. (2016) Male reproductive system. In: Ross M.H., Pawlina W. Histology: A text and atlas with correlated cell and molecular biology. Wolters Kulwer Health, Philadelphia, United States of America, 7th edition p. 790
- [2] Jankovičová J., Michalková K., Sečová P., et al. (2018) Cell Tissue Res. 371(2), p. 365
- [3] Gervasi M.G., Visconti P.E. (2015) Andrology 5(2), p. 204
- [4] Tecle E., Gagneux P. (2015) Mol. Reprod. Dev. 82(9), p. 635
- [5] Fernandez-Fuertes B., Blanco-Fernandez A., Reid C.J., et al. (2018) Reproduction 155(6), p. 481
- [6] Fliniaux I., Marchand G., Molinaro C., et al. (2022) Front. Cell. Dev. Biol. 10:982931
- [7] Dan X., Liu W., Ng T.B. (2016), Med. Res. Rew. 36(2), p. 221
- [8] Bojar D., Meche L., Meng G., et al. (2022), ACS Chem. Biol. 17(11), p. 2993

Genetické zmeny v mitochondriách: potenciálny marker chemorezistencie testikulárnych nádorov?

Pavína Kabelíková, Danica Ivovič, Eveline Órásová, Miroslav Chovanec, Dana Jurkovičová

*Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Ústav experimentálnej onkológie,
Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika; pavlina.kabelikova@savba.sk*

Abstract

Genetic changes in mitochondria: a potential marker of chemoresistance of testicular tumors?

As for now, Testicular Germ Cell Tumors (TGCT) are not characterized by a significant number of somatic mutation. Several risk loci have been identified in TGCT, but the alterations contributing to the development of the chemoresistance phenotype require further characterization. To identify genetic changes that may be related to different response to treatment, we compared TGCT cell lines resistant and sensitive to cisplatin (CDDP) by sequencing of mitochondrial DNA. The mutational profile of 2102EP (sensitive TGCT cell line) was significantly different from that of 1777NRpmet (resistant TGCT cell line). By functional analysis of mitochondrial respiration, we also observed differences between sensitive and resistant TGCT cell lines. We expect that our analyses will contribute to revealing genetic background associated with CDDP resistance and potentially contribute to identification of new biomarkers for its early detection in TGCT patients.

Keywords: *mutation; mitochondria; TGCT; resistance; mitochondrial respiration*

Úvod a formulácia cieľa

Genetické zmeny v nádorových bunkách hrajú dôležitú úlohu počas neoplastickej progresie, ako aj v odpovedi na liečbu ľudských malignít [1]. Genetické zmeny, zárodočné alebo somatické mutácie, menia funkciu génu, čo môže prispieť k rozvoju alebo progresii danej malignity [2]. Akumulácia genetických zmien nielen v jadrových, ale aj mitochondriálnych genómoch sa môže podieľať na patogenéze rakoviny [3]. V prípade TGCT je chemoterapia na báze cisplatiny (CDDP) hlavným typom liečby, s vysokou účinnosťou a mierou prežitia viac ako 90% [4]. Aj napriek vysokej účinnosti liečby sa však u 5-10% pacientov vyvinie rezistencia na CDDP. Jednou z jej hlavných príčin môže byť aberantná oprava DNA-platinových aduktov [5].

Je známe, že CDDP indukuje adukty v jadrovej ale aj v mitochondriálnej DNA (mtDNA) a proteínoch [6]. Chemosenzitivita TGCT môže byť aj výsledkom zvýšeného “mitochondriálneho primingu” (pripravenosti mitochondrií vstúpiť do apoptózy). Jeho molekulárna charakterizácia by mohla napomôcť k zlepšeniu účinnosti chemoterapie rezistentných nádorov [7]. Metabolická dysfunkcia patrí medzi hlavné znaky malígnych buniek a je zrejmé, že mutácie mitochondriálneho genómu vedú k metabolickému deficitu [8]. Pri rakovine boli zistené početné mutácie v mtDNA, ktoré neinaktivujú mitochondriálne funkcie, ale práve naopak, menia energetický metabolizmus na podporu rastu rakovinových buniek.

Zmenené profily mtDNA, vrátane počtu kópií a mutácií, vedú k modifikovanej mitochondriálnej bioenergetike a k patologickej signalizácii z mitochondrií k jadru, ktorá urýchľuje tumorigenézu [9]. Akumulácia mitochondriálnych mutácií súvisí nielen s progresiou ochorenia, ale aj s rezistenciou na liečbu [10].

Mitochondrie taktiež predstavujú energetickú zásobáreň bunky, zabezpečujú produkciu ATP prostredníctvom oxidačnej fosforylácie (OXPHOS). Enzýmy zahrnuté v OXPHOS sú multipodjednotkové komplexy kódované jadrovou aj mitochondriálnou DNA. Regulácia dýchania je teda vysoko koordinovaný proces, ktorý musí zabezpečiť produkciu, zostavovanie a funkciu mitochondrií, aby uspokojil energetické potreby bunky [11]. Pre odhalenie príčin chemorezistencie je preto dôležité identifikovať genetické zmeny v jadre i mitochondriách a pochopiť princípy ich vzájomnej komunikácie.

Materiál a metódy

Pomocou NGS metódy sme identifikovali prítomné mutácie v mitochondriálnom genóme TGCT senzitívnych a rezistentných bunkových línií (2102EP/2102EP cis a H12.1/H12.1 ODM). Prvým krokom nášho experimentálneho postupu bola izolácia DNA pomocou Qiagen DNA Extraction Kitu a následné stanovenie jej koncentrácie pomocou Quibit 2.0 fluorometra. Z izolovanej DNA bola pripravená knižnica pomocou Twist Library Preparation Kitu. DNA vzorky boli najprv fragmentované a ligované s Twist universal adaptérmi. Po purifikácii a PCR amplifikácii s Twist UDI primermi sme skontrolovali kvalitu pripravenej knižnice na bioanalyzátore. Pripravená knižnica bola následne hybridizovaná s próbami Twist Target Enrichment Kitu a amplifikovaná pomocou RT-qPCR. Pred samotným sekvenovaním bola opäť overená kvalita vzoriek na bioanalyzátore a následne boli vzorky osekvenované pomocou Illumina iSeq systému. Získané dáta boli bioinformaticky a štatisticky vyhodnotené.

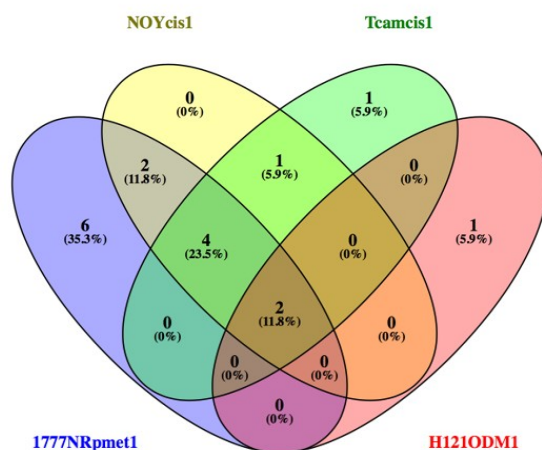
Samotné dýchanie mitochondrií sme stanovili pomocou OROBOROS oxygrafu, ktorý umožňuje analýzu koncentrácie a toku kyslíka s vysokou presnosťou aj pri nízkych respiračných aktivitách mitochondrií a nízkych hladinách kyslíka. Funguje na princípe polarografie - závislosť elektrického prúdu a napätia na dvojici elektród ponorených do roztoku, v ktorom prebieha elektrolýza. Za stáleho miešania je detegovaný pokles koncentrácie kyslíka v roztoku resp. uzavretej komôrke. V prvom kroku sa bunky scentrifugujú, pridá sa respiračné médium a následne prídavkom rôznych inhibítorov a substrátov budeme sledovať zmeny v respirácii.

Výsledky a diskusia

V poslednej dobe sa vyvinulo značné úsilie o lepšie definovanie dôsledkov genetických zmien mtDNA v tumorigenéze. V práci sme stanovili mutačný profil mitochondriálneho genómu rezistentných TGCT bunkových línií 1777NRpmet a H12.1 ODM v porovnaní so senzitívnymi TGCT bunkovými líniami 2102EP a H12.1.

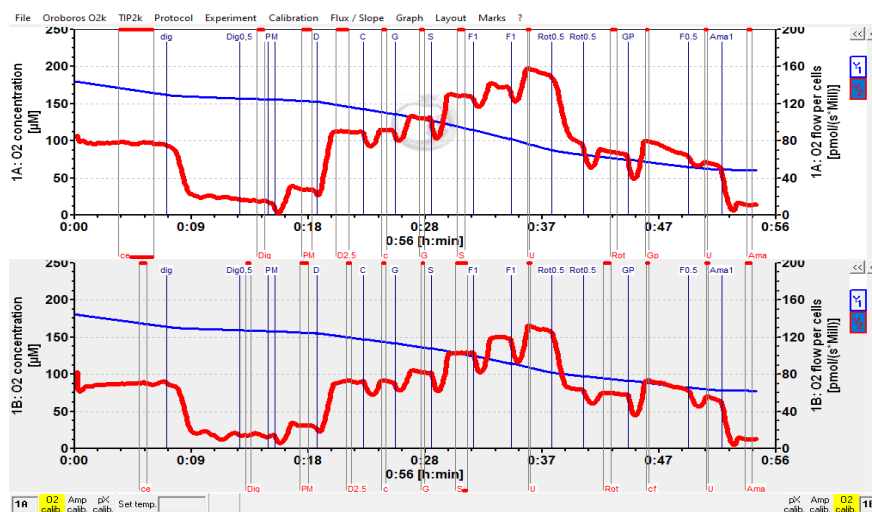
Tab. 1. Variabilita identifikovaná porovnaním rezistentnej bunkovej línie 1777NRpmet so senzitívnou 2102EP bunkovou líniov a rezistentnej bunkovej línie H12.1 ODM so senzitívnou H12.1 bunkovou líniov

Sample_tum	Sample_nor	CHROM	POS	REF	ALT	rs_id	anno_GENE
1777NRpmet	2102EP	chrM	73	A	G	rs869183622	RNR1
1777NRpmet	2102EP	chrM	195	T	C	rs2857291	RNR1
1777NRpmet	2102EP	chrM	709	G	A	rs2853517	RNR1
1777NRpmet	2102EP	chrM	1542	T	C	.	RNR1
1777NRpmet	2102EP	chrM	1888	G	A	rs2897260	RNR2
1777NRpmet	2102EP	chrM	2706	A	G	rs2854128	RNR2
1777NRpmet	2102EP	chrM	3086	T	C	.	RNR2
1777NRpmet	2102EP	chrM	4216	T	C	rs1599988	ND1
1777NRpmet	2102EP	chrM	4917	A	G	rs28357980	ND2
1777NRpmet	2102EP	chrM	6931	G	A	.	COX1
1777NRpmet	2102EP	chrM	7028	C	T	rs2015062	COX1
1777NRpmet	2102EP	chrM	8697	G	A	rs879233543	ATP6
1777NRpmet	2102EP	chrM	9812	C	T	.	COX3
1777NRpmet	2102EP	chrM	10463	T	C	rs28358279	TRNR
1777NRpmet	2102EP	chrM	11251	A	G	rs869096886	ND4
1777NRpmet	2102EP	chrM	11719	G	A	rs2853495	ND4
1777NRpmet	2102EP	chrM	12633	C	A	rs3926883	ND5
1777NRpmet	2102EP	chrM	13368	G	A	rs3899498	ND5
1777NRpmet	2102EP	chrM	14766	C	T	rs193302980	CYTB
1777NRpmet	2102EP	chrM	14905	G	A	rs193302983	CYTB
1777NRpmet	2102EP	chrM	15452	C	A	rs193302994	CYTB
1777NRpmet	2102EP	chrM	15607	A	G	rs193302996	CYTB
1777NRpmet	2102EP	chrM	15928	G	A	rs527236198	TRNT
H12.1 ODM	H12.1	chrM	5839	C	T	.	TRNY
H12.1 ODM	H12.1	chrM	8243	G	A	.	COX2
H12.1 ODM	H12.1	chrM	15215	G	A	.	CYTB
H12.1 ODM	H12.1	chrM	15797	G	A	.	CYTB
H12.1 ODM	H12.1	chrM	16304	T	C	rs386829305	TRNP

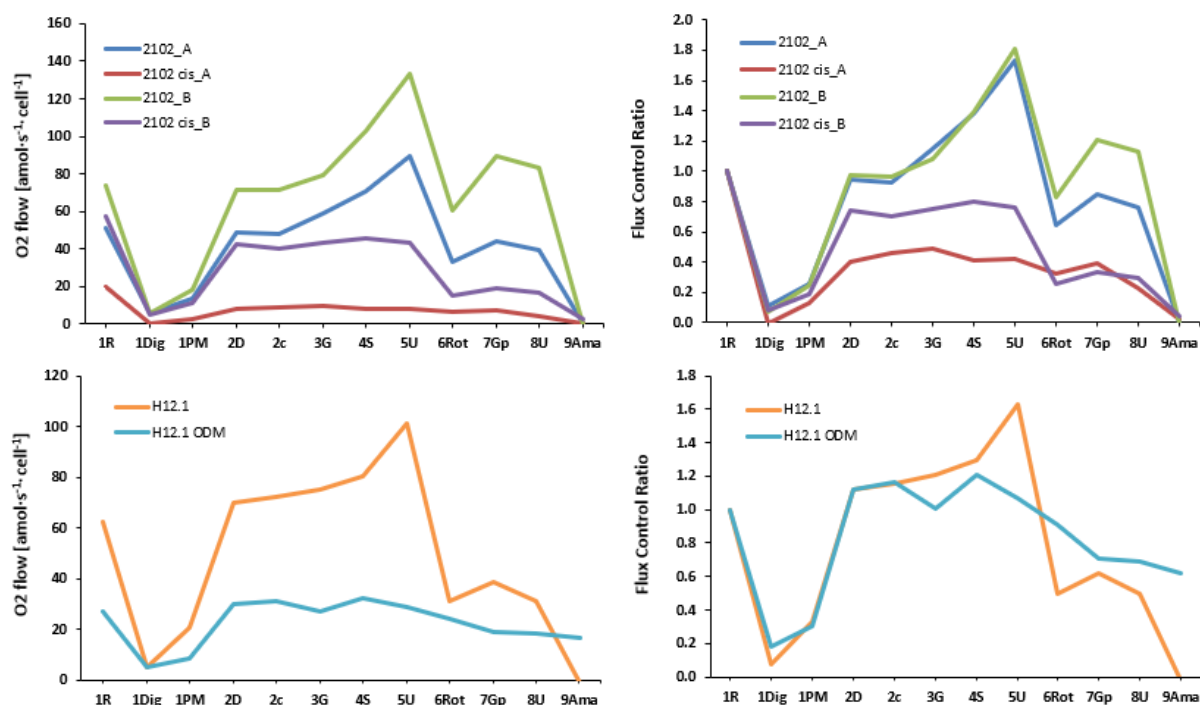


Obr. 1. Vénov diagram znázorňujúci prekryv mutácií v testovaných TGCT rezistentných líniiach

Mutácie v jadrových i mitochondriálnych génoch kódujúcich respiračné enzýmy môžu ovplyvňovať komunikáciu medzi mitochondriami a jadrom, bioenergetiku mitochondrií a tým celkovú progresiu ochorenia. Nakoľko sa niektoré z identifikovaných mutácií nachádzajú v génoch respiračného reťazca, pomocou metódy OROBOROS sme porovnali parametre respirácie vybraných bunkových TGCT línii: 2102EP (sens.) vs. 2102EP cis (rez.) a H12.1 (sens.) vs. H12.1 ODM (rez.). Naše predbežné výsledky poukazujú na rozdiely v respirácii rezistentných bunkových línii v porovnaní so senzitívnymi bunkovými líniami. (Obr. 2 a 3). Štatisticky vyhodnotené výsledky analýzy funkcie dýchacieho reťazca budeme korelovať s relatívnou expresiou respiračných génov (budúce analýzy).



Obr. 2. Grafické zobrazenie merania spotreby kyslíka pomocou OROBOROS v prípade 102EP a 2102EP cis. Modrá čiara predstavuje úbytok O_2 v komôrke a červená predstavuje spotrebu O_2 bunkami



Obr. 3. Grafické zobrazenie zmien v spotrebe O₂ rezistentnými a senzitívnymi bunkovými líniami
Flux control ratio (FCR) sú pomery toku O₂ v rôznych stavoch kontroly dýchania, normalizované pre maximálny tok v spoločnom referenčnom stave

Záver

V našej práci sme sa zamerali na genetické zmeny v mitochondriálnom genóme senzitívnych/rezistentných bunkových líní TGCT. Sekvenčné porovnanie mitochondriálneho genómu rezistentných a senzitívnych TGCT bunkových líní ukázalo, že sa líšia v identifikovaných mutáciách. V Tab. 1 sú znázornené jednotlivé zmeny v špecifických pozíciách, nájdených v špecifických génoch. Niektoré mutácie (polymorfizmy, SNP) už boli opísané, ale počiatočná analýza tiež poukazuje na novo identifikované mutácie v týchto bunkových línách. Počiatočné bioinformatické a štatistické analýzy ukázali úzky vzťah aj medzi inými rezistentnými bunkovými líniami (NOY cis a Tcam cis) (Obr. 1). Predbežné výsledky z analýzy funkcie dýchacieho reťazca taktiež poukázali na rozdiely v respirácii medzi rezistentnými a senzitívnymi TGCT bunkovými líniami (Obr. 3), avšak na presnejšie závery sú potrebné ďalšie analýzy a taktiež stanovenie relatívnej expresie respiračných génov, ktoré budú uskutočnené na jednotlivých bunkových línách. Našou snahou je zamerať sa na odhalenie genetickej variability a zmien v jadrových aj mitochondriálnych genómoch TGCT, ktoré môžu súvisieť s chemorezistenciou, a tým prispieť k identifikácii nových genetických biomarkerov na lepšiu stratifikáciu TGCT pacientov, včasné odhalenie chemorezistencie a následné personalizované nastavenie efektívneho liečebného režimu pre TGCT pacientov.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Romano F. J., Rossetti S., Conteduca V., et al. (2016) *Oncotarget*. 7(51), p. 85641
- [2] Zhang Ch. J., Li Z. T., Shen K. J., et al. (2021) *Asian. J. Androl.* 23(3), p. 259
- [3] Tabebi M., Lysiak M., Dutta R. K., et al. (2022) *Cancers*. 14(2), p. 269
- [4] Fung Ch., Dinh Jr. P., Ardeshir-Rouhani-Fard S., et al. (2018) *Adv. Urol.*
- [5] Liu W., Wang Y., Luo J., et al. (2020) *Front. Oncol.* 9, p. 1573
- [6] Marullo R., Werner E., Degtyareva N., et al. (2013) *Plos. One*. 8(11), p. e81162
- [7] Taylor-Weiner A., Zack T., O'Donnell E., et al. (2016) *Nature*. 540(7631), p. 114
- [8] Gammage P. A., Frezza Ch. (2019) *BMC. Biol.* 17(1), p. 53
- [9] Wagner A., Kosnacova H., Chovanec M., et al. (2022) *Int. J. Mol. Sci.* 23(14), p. 7897
- [10] Gogvadze V., Orrenius S., Zhivotovsky B. (2008) *Trends. Cell. Biol.* 18(4), p. 165
- [11] Das J. (2006) *Bioessays*. 28(9), p. 890

Deep protein profiling of trap leaves of carnivorous sundew (*Drosera binata*)

Rohan Kale, Shubhi Mishra, Olha Lakhneko, Jana Libantová, Maksym Danchenko

*Plant Science and Biodiversity Centre of Slovak Academy of Sciences, v. v. i., Akademická 2,
Nitra 950 07, Slovak republic; rohan.kale@savba.sk*

Abstract

Carnivory is not only a paramount feature of animals, but also some plants with specialized traps have such intrinsic trait, commonly known as carnivorous plants. This extraordinary capability allows to acquire vital nutrients while growing on deficient soils, such as marshes. Carnivorous plants evolved leaves with the specialized function of trapping, digesting, and absorbing the desired nutrients, complementing photosynthesis. Sundews modified their leaves into adhesive traps containing sticky secretions with hydrolytic enzymes. Therefore, their biochemical composition is substantially different from conventional photosynthesizing organs. Proteins from traps of *Drosera binata* were isolated by phenol-based protocol. Using shotgun proteomic analysis, we identified 871 proteins in trap leaves. Our results opened avenues for a follow-up study questioning the mystery of unique trap development.

Keywords: *carnivorous plants; adhesive traps; proteomics; hydrolases*

Introduction and Objectives

Carnivorous plants exhibit the capability to trap and digest several types of prey utilizing hydrolytic enzymes. To fulfill the nutritional requirement for growth and development in deficient habitats, carnivorous plants evolved special leaves or stolons to trap and digest the prey. There are five types of traps: adhesive, snap, pitfall, suction, and lobster pot traps [1]. The content of the digestive fluid depends on the developmental stage of the plant. Digestive juice is largely composed of hydrolytic enzymes – nucleases, esterases, lipases, phosphatases, chitinases, glucanases, and peptidases [1, 2]. Sundews modified leaves into adhesive traps with glandular tentacles containing sticky secretions.

Recently researchers elucidated the structural and functional characteristics of proteins and enzymes in the digestive fluid of carnivorous plants [3]. Besides the digestion of prey, enzymes ensure self-defense against pathogen attack and mechanical injury. Analysis of the digestive fluid of *Drosera adelae* using liquid chromatography coupled mass spectrometry (LC-MS) reported 19 novel proteins out of 26 proteins, including defense- and pathogenesis-related ones [1]. Moreover, β -1,3-glucanase from *Drosera binata* and purified recombinant chitinase class 1 from *Drosera rotundifolia* showed potent antifungal potential [4, 5]. Furthermore, the investigation of digestive fluid from *Nepenthes ampullaria* demonstrated variable protein composition and protease activity at different developmental stages [6].

This study focused on revealing the protein composition of sundew leaves. The

detection and quantification of proteins accumulated in adhesive traps is the first step in discovering new promising enzymes for biotechnology.

Materials and Methods

Plant material

Plants of *Drosera binata* were cultivated aseptically on 1/4 Murashige and Skoog (MS) medium with Gamborg B5 vitamins supplemented with 2% (w/v) sucrose and 0.8% (w/v) agar at 24 °C ± 2 °C with 16/8 h photoperiod and light intensity of 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Fresh leaf samples were collected at the mature trap leaf stage in six biological replicates.

Protein extraction and quality control

The proteins were isolated by phenol-based extraction method followed by ammonium acetate precipitation [7]. Briefly, 100 mg of samples in 2 mL test tubes were ground in a homogenizer with 3 mm tungsten beads and liquid nitrogen. The 500 μL of extraction buffer (0.7 M sucrose, 0.1 M KCl, 0.2 M Tris pH 8.0, and 20 mM EDTA) with fresh 1% β -mercaptoethanol and a cocktail of protease inhibitors was added to samples and mixed for 10 min. Next, 500 μL of phenol pH 8 was added, and mixed for another 20 min, followed by centrifugation for 15 min at 10,000 g and 4 °C. Extracted proteins in the phenol phase were precipitated using 5 volumes of pre-chilled 0.1 M ammonium acetate in methanol at –20 °C overnight. The precipitate was collected by centrifugation for 15 min at 10,000 g and 4 °C. Finally, extracted proteins were washed sequentially with 0.1 M ammonium acetate in methanol, 80% acetone, and 70% ethanol. Protein pellets were briefly dried in a fume hood and resuspended in 100 μL of Laemmli buffer.

Protein concentration was measured by reducing agent-compatible bicinchoninic acid (BCA) assay. Next, we performed sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for quality control.

Filter-aided sample preparation

Protein digestion was carried out by filter-aided sample preparation (FASP) method. Aliquots of 100 μg of cell lysate in 4% SDS 100 mM Tris pH 7.6, and 100 mM dithiothreitol were transferred on the centrifugal filters with the final volume adjusted to 200 μL with urea buffer (8 M urea in 100 mM Tris pH 8.5). The proteins were then reduced by adding 200 μL of 10 mM dithiothreitol in urea buffer, followed by incubation for 15 min at 50 °C and centrifugation. The proteins were alkylated with 200 μL of 50 mM iodoacetamide in urea buffer by incubation for 15 min in the dark at room temperature, followed by centrifugation. Upon quenching with dithiothreitol, filters were washed with 200 μL of urea buffer, and the solvent

was exchanged for 50 mM ammonium bicarbonate. The proteins were digested overnight at 37 °C by adding 75 µL of sequencing grade trypsin (Promega) working solution (1:50, w/w enzyme to protein ratio) in 50 mM ammonium bicarbonate. Next, peptides were collected by centrifugation and slightly acidified with 3 µL of 10% trifluoroacetic acid. Finally, the concentration of the peptides was estimated by optical absorbance at 215 nm.

Protein identification

Protein profiling was done using LC-MS according to the workflow described in the literature [8]. After purification, 500 ng of peptide mixtures were loaded onto a trap column (PepMap100 C18, 300 µm × 5 mm, 5-µm particle size; Dionex) and separated with an EASY-Spray C18 analytical column (Thermo Fisher Scientific) on Ultimate 3000 RSLC nano system (Dionex) by reverse phase chromatography (120-minute gradient, 2–34% acetonitrile with 0.1% formic acid). The eluted peptides were sprayed directly into Orbitrap Elite mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) and measured with resolution 120,000, in the mass range 300–1700 m/z and standard fragmentation criteria. Raw data were processed using MaxQuant v1.6.17.0 with a built-in Andromeda search engine [9]. Consequently, results were filtered in Perseus v1.6.15.0 [9].

Results and Discussion

After the protein extraction from trap leaves in six biological replicates, the proteins were resolved by denaturing gel electrophoresis, excluding sample number six, which was not tested because of low protein yield. The separated proteins were consistent among all biological replicates (Fig. 1). Furthermore, we observed a complex protein pattern of numerous sharp protein bands in the full range of separated molecular masses, from < 20 kDa to > 120 kDa. Similarly, other studies on carnivorous plants have reported proteins with molecular masses ranging from 25 to 95 kDa [2, 6]. Typical for leaf tissues, we saw dominant protein bands of large ~ 50 kDa and small ~ 25 kDa subunits of RUBISCO [10].

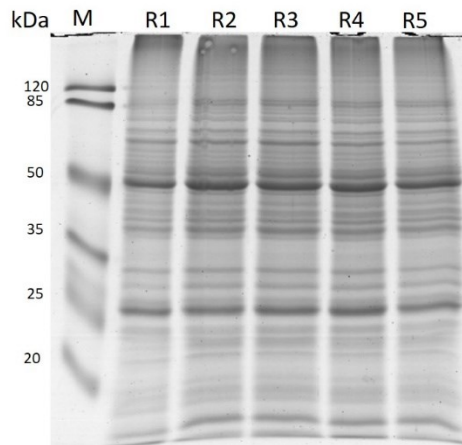


Fig. 1. Coomassie-stained denaturing gel (12%) of trap leaf proteins extracted by phenol method.

Mass spectrometry measures the mass-to-charge ratio of peptide ions by mass analyzer. Separation of peptides during the LC-MS run is recorded by instrument control software as a chromatogram (Fig. 2). Already on the stage of visualization of raw data, we showed good separation of numerous analytes (peptides) as expected for complex digests of unfractionated cellular proteins. The median width of chromatographic peaks was 30 s, giving a peak capacity of 200 for 100 min of the effective analytical gradient. We measured spectra using orbitrap-type analyzer capable of extremely high resolution. Our settings allowed to distinguish a mass difference as low as 0.01 Da.

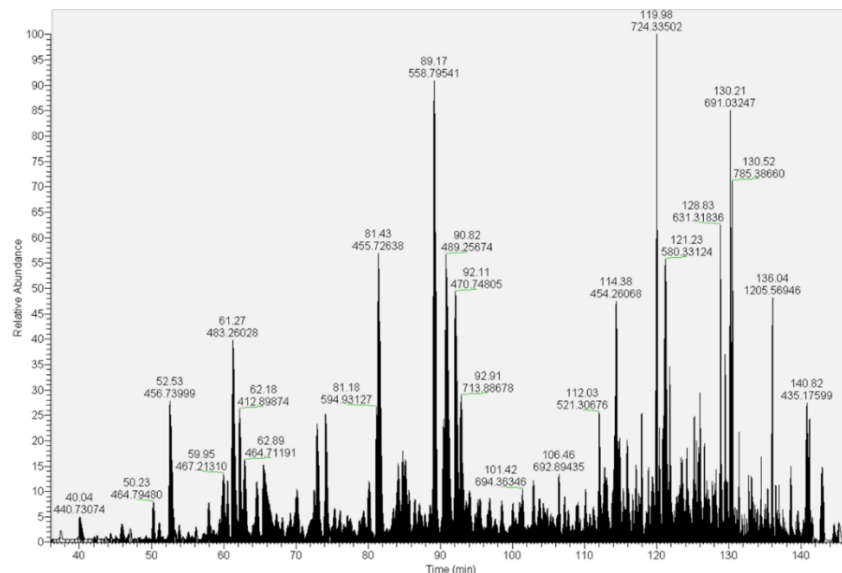


Fig. 2. Base peak chromatogram illustrates a complex profile of eluted peptides of increasing hydrophobicities.

Overall we detected 871 proteins in traps of *Drosera binata*. Out of them, 571 were reproducibly quantified. The histogram of abundance classes perfectly fitted into normal distribution (Fig. 3), confirming the feasibility of reliable protein quantification. Photosynthetic proteins, localized in chloroplasts, were dominant, such as RUBISCO large subunit, photosystem II CP43 reaction center protein, photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1, photosystem II D2 protein, RUBISCO activase, chlorophyll a-b binding protein, oxygen-evolving enhancer 1, and photosystem I reaction center subunit II. Also, mitochondrial proteins were present in big amounts, namely ATP synthase subunit α , phosphoglycerate kinase, and mitochondrial processing peptidase β subunit. This list aligns well with the protein composition of plant leaves reported in the literature [10, 11]. Our further bioinformatic analysis is focused on revealing digestive hydrolases, which are only vaguely annotated in databases.

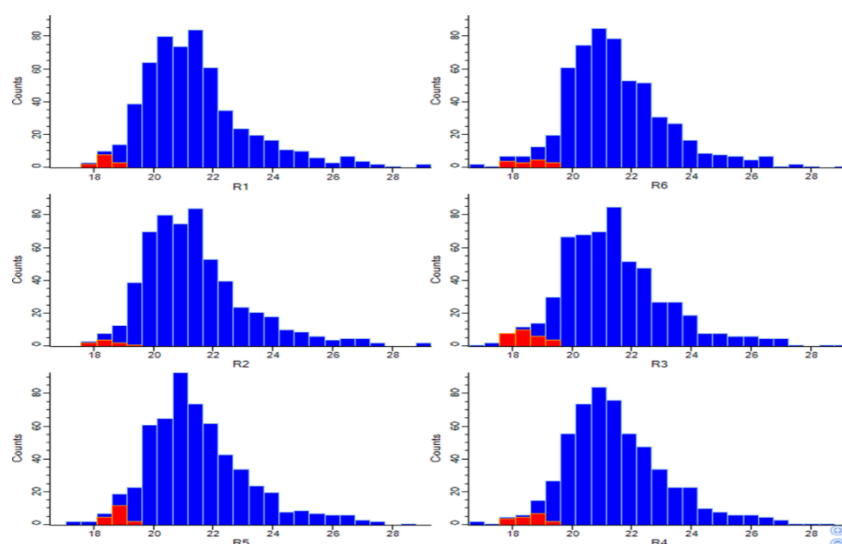


Fig. 3. Histograms of relative abundances of proteins from trap leaves in six replicates; imputed values are in red (from the normal distribution).

Conclusions

The present study analyzed the protein composition of sundew leaves at the mature trap leaf stage. The selected protein extraction and purification method allowed us to quantify several hundreds of unique proteins reproducibly. This investigation proved the feasibility of the analytical protocol for deep proteomic analysis of sundew traps.

Acknowledgement

This study was supported by the EU NextGenerationEU through the Recovery and Resilience Plan for Slovakia under project 09I03-03-V01-00005 and project VEGA 2/0041/20.

References

- [1] Arai N., Ohno Y., Jumyo S., et al. (2021) *J. Exp. Botany*. 72(5), p. 1946
- [2] Porfírio C. T., Souza P. F., Ramos M. V., et al. (2022) *Int. J. Bio. Macro*. 198, p. 77
- [3] Ravee R., Salleh F. I. M., Goh H. H. (2018) *Peer J*. 6, p. e4914
- [4] Rajnynec M., Jopcik M., Danchenko M., et al. (2020) *Int. J. Bio. Macro*. 161, p. 854
- [5] Rajnynec M., Fratrikova M., Boszoradova E., et al. (2021) *Plants*. 10(8), p. 1747
- [6] Ravee R., Baharin A., Cho W. T., et al. (2021) *Physiol. Plant*. 173(4), p. 1967
- [7] Isaacson T., Damasceno C. M., Saravanan R. S., et al. (2006) *Nat. Protoc*. 1(2), p. 769
- [8] Škodová-Sveráková I., Záhonová K., Juricová V., et al. (2021) *BMC Biol*. 19(1), p. 251
- [9] Tyanova S., Temu T., Sinitcyn P., et al. (2016) *Nat. Methods*. 13(9), p. q731
- [10] Wang X., Liu Y., Li H., et al (2022) *Enviro. Experi. Botany*. 201, p. 105003
- [11] Hui-Hui Z., Guang-Liang S., Jie-Yu S., et al. (2019) *Ecotox. Enviro. Safety*. 184, p. 109624

Produkcia mutovanej a nemutovanej reverznej transkriptázy v expresnom systéme *Escherichia coli*

Ihar Karatkevich¹, Ľubica Kormanová¹, Johana Dlapová¹, Zdenko Levarski^{1,2},
Stanislav Stuchlík^{1,2}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej
biológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
Ihar.Karatkevich@uniba.sk

²Univerzita Komenského v Bratislave, Vedecký park, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava,
Slovenská republika

Abstract

Mutated and wild-type reverse transcriptase production in *Escherichia coli*

Retroviral reverse transcriptases are used in reverse transcription PCR in the diagnosis of pathogens. The production of a sufficient amount of this soluble enzyme with high activity will enable effective detection of RNA viruses and prevent their spread in the population. Heterological production of reverse transcriptase in prokaryotic expression systems results in the formation of protein aggregates. The total amount of reverse transcriptase depends on regulating the enzyme gene expression, production strain, targeted mutagenesis, etc. In this work, we compare the result of targeted mutagenesis of reverse transcriptase versus wild-type protein. In addition, we compared the production of both types of reverse transcriptase regulated by T5 and T7 promoters. New expression constructs were prepared by subcloning using restriction endonucleases. Analysis of soluble protein fractions showed the efficiency of the production of mutated and wild-type reverse transcriptase using the T7 promoter compared to T5.

Keywords: reverse transcriptase; heterologous expression; protein solubility; subcloning

Úvod a formulácia cieľa

Vírusy a s nimi súvisiace ochorenia sprevádzajú ľudstvo naprieč jeho históriou. Včasná diagnostika vírusových infekcií významne prispeje k zamedzeniu šírenia vírusov v populácii a eliminuje vznik pandémie. V súčasnosti moderné metódy diagnostiky vírusových ochorení umožňujú efektívne a jednoznačne určiť príčinu ochorenia a nastaviť jeho správnu liečbu. Najviac využívanou metódou pre detekciu RNA vírusov je reverzná polymerázová reťazová reakcia, ktorá využíva enzým reverznú transkriptázu. Tento enzým prepisuje RNA do DNA, ktorá je následne namnožená amplifikáciou a detegovaná [1,2].

Retrovírusová reverzná transkriptáza z Moloneyho myšieho leukemického vírusu je monomérený proteín. Heterologická produkcia proteínu v prokaryotických organizmoch predstavuje problém pre jeho hydrofóbne vlastnosti a vznik inklúzných teliesok v cytoplazme buniek. Výzvou je zvýšenie rozpustnosti reverznej transkriptázy a zisk čo najväčšieho výťažku aktívneho enzýmu. Za týmto účelom boli v predošlých štúdiách zavedené mutácie v sekvencii DNA reverznej transkriptázy [3, 4].

V predloženej práci bolo cieľom overiť prínos mutácií na solubilitu reverznej

transkriptázy a porovnať produkciu enzýmu pomocou endogénnej bakteriálnej RNA polymerázy a RNA polymerázy pochádzajúcej z T7 bakteriofágu. Za týmto účelom bolo potrebné pripraviť 3 konštrukty na základe vektorov pJexpress404 a pET28a pre produkciu nemutovanej a mutovanej reverznej transkriptázy. Po restriktívnej analýze konštruktov bola nasledujúcim krokom transformácia *E. coli* B21 (DE3) a overenie expresie enzýmu. Na porovnanie rozpustnosti produkovaných enzýmov bolo cieľom analyzovať solubilné frakcie po 4-hodinovej expresii pomocou western blotu.

Materiál a metódy

Kmene *E. coli* využité v práci majú nasledovné genotypy: DH5 α – F⁻ *endA glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(*r_k*⁻ *m_k*⁺), λ ⁻. B121 (DE3) – *fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hsdS λ DE3 = λ sBamHIo Δ EcoRI-B int::(*lacI*::*PlacUV5*::*T7 gene1*) i21 Δ nin5.**

Plazmidy obsahujúce sekvencie mutovanej a nemutovanej reverznej transkriptázy boli pJexpress404–mut–RT a pUC57–wt–RT. Plazmidy slúžiace ako vektory boli pJexpress–DypB s rezistenciou na ampicilín a pET28a–TaqDNA s rezistenciou na kanamycín.

Restriktívne endonukleázy pre štiepenie vektora a inzertu a následnú restriktívnu analýzu boli BamHI, HindIII, XhoI a XbaI. Separácia prebiehala v 1% agarózovom géli v aparátúre Owl EasyCast B1 od spoločnosti Thermo Fisher Scientific.

Subklonovanie bolo uskutočnené pomocou izolácie štiepených fragmentov DNA z agarózového gélu pomocou kitu QIAquick Gel Extraction Kit. Ligačná zmes obsahovala T4 DNA ligázu, molárny pomer vektora a inzertu bol 1:5 a reakcia trvala 12 hodín pri 4 °C.

Pre transformáciu rekombinantných DNA boli využité chemicky kompetentné bunky a tepelný šok, agarové platne obsahovali lyzogénne médium (LB) a príslušné antibiotikum.

Produkcia reverznej transkriptázy trvala 4 hodiny po indukcii expresie pri 37 °C v 50 ml LB. Ako induktor slúžil IPTG vo výslednej koncentrácii 1 mM. Počas expresie sme každú hodinu odoberali vzorku média, ktorá bola riedená do výslednej optickej hustoty 0,5 pri vlnovej dĺžke 600 nm a objemom 1 ml. Výsledné vzorky boli zbavené média centrifugáciou a použité pri analýze proteínového profilu buniek pomocou SDS PAGE.

Pri SDS PAGE sme sa riadili postupom podľa Laemmliho [5]. Snímky gélov so separovanými proteínmi boli analyzované pomocou programu GelAnalyzer. Solubilnú a nesolubilnú frakciu proteínov pre ďalšie analýzy sme získali pomocou homogenizácie buniek ultrazvukom pomocou prístroja Sonoplus HD 3200 (Bandelin) s použitím sondy KE 76 a amplitúdou 30 %.

Na analýzu solubility sme po SDS PAGE preniesli proteíny z gélu na polyvinylidénfluoridovú membránu pomocou western blotu. Prenos prebiehal za pomoci polosuchého transferu v roztoku tris–glycínu v aparatúre Fastblot B43 (Biometra). Proteíny záujmu boli označené myšou protilátkou voči histidínovej kotve, ktorú mala reverzná transkriptáza. Na primárnu protilátku sa viazala sekundárna protilátka s chrenovou peroxidázou. Po pridaní peroxidu vodíka s luminolom nastávala chemiluminescencia, ktorá bola zaznamenaná pomocou ImageQuart LAS 500 (GE Healthcare).

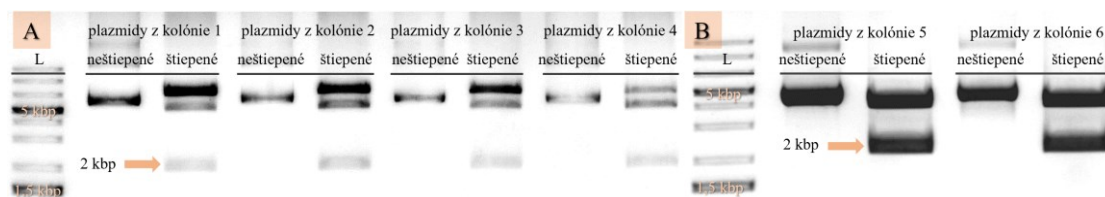
Výsledky a diskusia

Subklonovaním sa nám podarilo pripraviť 3 nové konštrukty s reverznou transkriptázou, ktoré sme analyzovali restričnou analýzou, overili sme expresiu reverznej transkriptázy pomocou týchto konštruktov a sekvenovaním určili poradie nukleotidov. Tabuľka 1 zahŕňa vlastnosti plazmidov využitých pre porovnanie produkcie reverznej transkriptázy.

Tab. 1. Rekombinantné plazmidy využité v práci a ich vlastnosti.

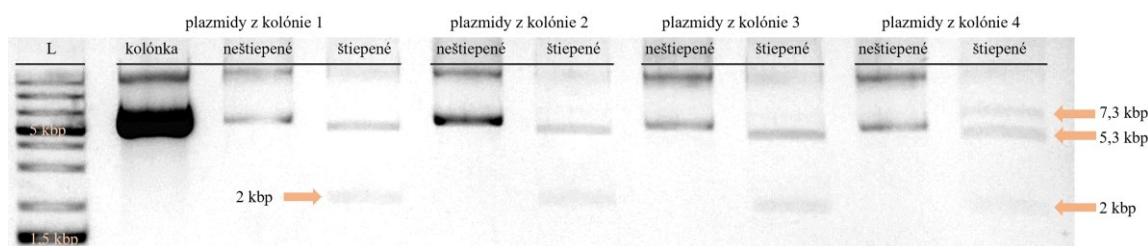
Názov plazmidu	Typ expresného systému	Selekčný marker	Typ reverznej transkriptázy
pJexpress404–mut–RT	T5 expresný systém	Rezistencia voči ampicilínu	Mutovaná MMLV reverzná transkriptáza
pJexpress404–wt–RT	T5 expresný systém	Rezistencia voči ampicilínu	Nemutovaná MMLV reverzná transkriptáza
pET28a–mut–RT	T7 expresný systém	Rezistencia voči kanamycínu	Mutovaná MMLV reverzná transkriptáza
pET28a–wt–RT	T7 expresný systém	Rezistencia voči kanamycínu	Nemutovaná MMLV reverzná transkriptáza

Po transformácii *E. coli* DH5 α rekombinantnými konštruktmi sme izolovali plazmidy alkalickou denaturáciou a overili ich štruktúru restričnou analýzou, výsledok ktorej je zobrazený na obrázkoch 1 a 2. V každom plazmide po štiepení bol detegovaný gén pre reverznú transkriptázu, ktorý má veľkosť 2 kbp.



Obr. 1. Izolácia plazmidov z transformovaných *E. coli* DH5 α a následná restričná analýza pDNA.

A – pET28a–wt–RT, štiepenie pomocou BamHI a HindIII; B – pJexpress404–wt–RT, štiepenie pomocou XhoI a XbaI; L – marker molekulových hmotností.

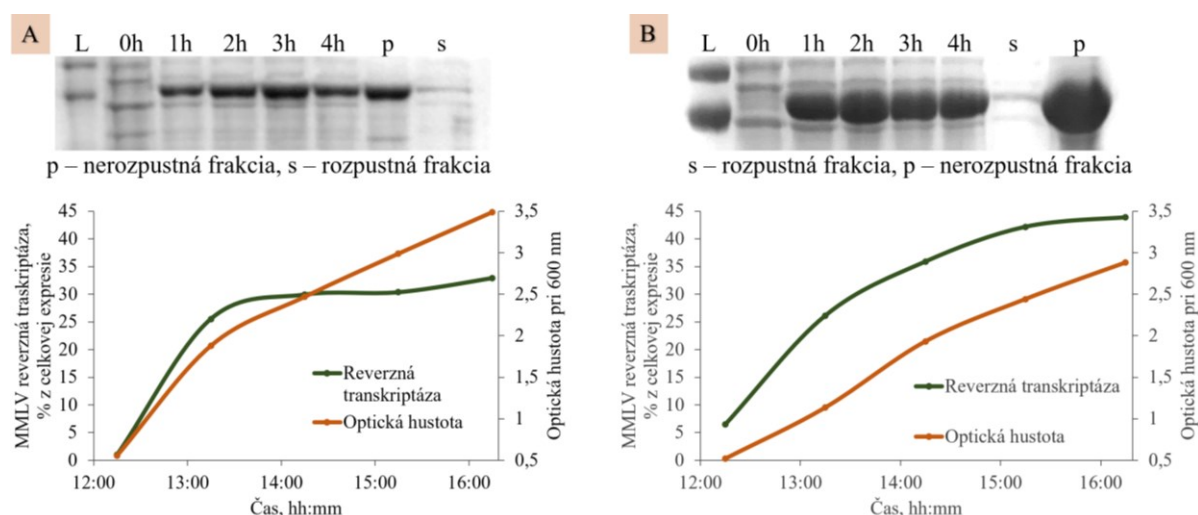


Obr. 2. Izolácia pET28a–mut–RT z transformovaných *E. coli* DH5a a následná restrikčná analýza plazmidov pomocou XhoI a XbaI.

L – marker molekulových hmotností.

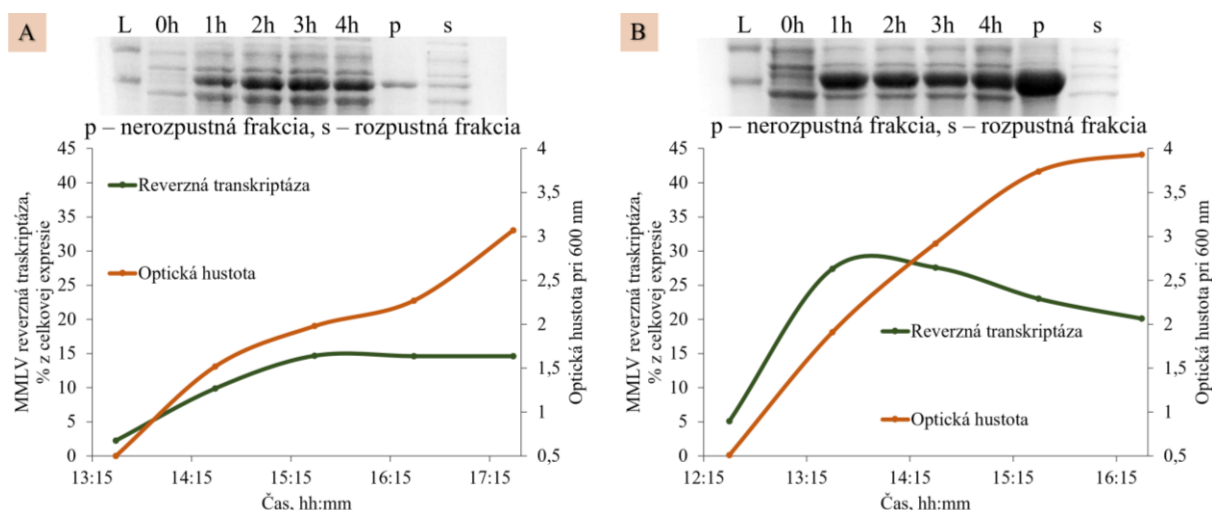
Izolované plazmidy pJexpress404–mut–RT, pET28a–wt–RT, pJexpress404–wt–RT a pET28a–mut–RT z *E. coli* DH5a boli využité na transformáciu expresného kmeňa *E. coli* B121 (DE3) za účelom produkcie reverznej transkriptázy pomocou týchto konštruktov. Obrázky 3 a 4 znázorňujú percentuálnu hodnotu reverznej transkriptázy oproti celkovému množstvu proteínov a rast biomasy. Zaznamenali sme väčšie množstvo enzýmu pri využití T7 promótora.

Po úspešnej produkcii mutovanej a nemutovanej reverznej transkriptázy pomocou expresných konštruktov sme solubilné frakcie proteínov po ultrazvukovej homogenizácii buniek analyzovali pomocou western blotu. Výsledok analýzy je zobrazený na obrázku 5 a naznačuje, že zmeny v mutovanej reverznej transkriptáze naozaj prispievajú k vyššej solubilitě proteínu. T7 systém má potenciál pre efektívnu produkciu mutovanej a nemutovanej reverznej transkriptázy.

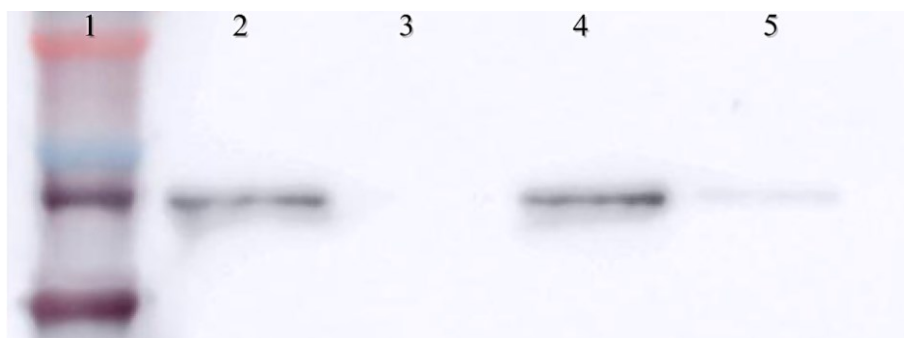


Obr. 3. Rast biomasy a produkcia MMLV reverznej transkriptázy v *E. coli* B121 (DE3) počas 4–hodinovej expzie (T7 expresný systém).

A – mutovaný enzým; B – nemutovaný enzým.



Obr. 4. Rast biomasy a produkcia MMLV reverznej transkriptázy v *E. coli* BI21 (DE3) počas 4-hodinovej exprese (T5 expresný systém). A – mutovaný enzým; B – nemutovaný enzým.



Obr. 5. Porovnanie solubilných frakcií mutovanej a nemutovanej reverznej transkriptázy pomocou western blotu.

1 – štandard molekulových hmotností, 2 – mutovaný enzým (T5 systém); 3 – nemutovaný enzým (T5 systém); 4 – mutovaný enzým (T7 systém); 5 – nemutovaný enzým (T7 systém).

Záver

Úspešne sa nám podarilo pripraviť konštrukty pre porovnanie produkcie mutovanej a nemutovanej reverznej transkriptázy pod kontrolou T5 a T7 promótora. Na základe analýzy solubilných frakcií proteínov je možné stanoviť, že produkcia reverznej transkriptázy pomocou T7 expresného systému je účinnejšia oproti T5 systému.

PodĎakovanie

Príspevok je výsledkom realizácie projektov APVV-17-0333, APVV-20-0284 a LISPER (ITMS2014:313011V446) na základe podpory operačného programu Integrovaná infraštruktúra financovaného z ERDF. Táto práca bola taktiež čiastočne podporená zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja v rámci projektu USCCCORD (ŽoNFP:

Zoznam použitej literatúry

- [1] Huber L. B., Betz K., Marx A. (2022) ChemBioChem. 24(5), p. 1439
- [2] Makino Y., Sato H., Noguchi A., et. al. (2021) Biosci. Biotechnol. Biochem. 85(6), p. 1464
- [3] Ocorbin I. P., Filipenko M. L. (2021) Comput. Struct. Biotechnol. J. 23(19), p. 6315
- [4] Baranauskas A., Paliksa S., Alzbutas G., et. al. (2012) Protein. Eng. Des. Sel. 25(10) p. 657
- [5] Laemmli U. K. (1970) Nature 227(5259), p. 680

Charakterizácia reportérového vírusu kliešťovej encefalitídy v dormantných a cicajúcich kliešťoch *Ixodes ricinus*

Ádám Kevély^{1,2}, Monika Sláviková¹, Eva Nováková^{1,2}, Boris Klempa^{1,2}, Juraj Koči^{1,3}

¹Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Virologický ústav, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika; adam.kevely12@gmail.com

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

³Ústav zoológie Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Characterization of a reporter tick-borne encephalitis virus in dormant and feeding *Ixodes ricinus* ticks
The tick-borne encephalitis virus (TBEV) causes a viral life-threatening illness transmitted by ticks. The interactions between the virus and ticks are largely unexplored, indicating a lack of experimental tools. One such tool is recombinant reporter TBEV, offering antibody-free visualization to facilitate studies of transmission and interactions between a tick vector and a virus. For this purpose, we utilized a recently developed recombinant TBEV expressing mCherry to study its fitness in dormant and feeding nymphal *I. ricinus* ticks. The reporter virus was successfully replicated in ticks, although, the mCherry protein was not observed in the dormant ticks, corroborated by immunoblotting. However, we detected a light mCherry protein signal in ticks, which fed for two days. Our data indicate that the physiological attributes of ticks, likely contributing to the activity of the reporter, warrant further development of reporter-tagged viruses to study TBEV in ticks *in vivo*.

Keywords: tick-borne encephalitis virus; *Ixodes ricinus*; reverse genetics; reporter virus

Úvod a formulácia cieľa

Vírus kliešťovej encefalitídy (TBEV) je obalený RNA vírus, ktorý je pôvodcom ochorení s trvalými neurologickými následkami. Medzinárodná komisia pre taxonómiu vírusov (ICTV) ho podľa najnovšej taxonómie zaraďuje do rodu *Flavivirus* a do čeľade *Flaviviridae*. Jeho genóm tvorí jednovláknová molekula RNA s pozitívnou polaritou (~11 kb), ktorá kóduje tri štruktúrne (C, M a E) a osem neštruktúrnych (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, 2K, NS4B a NS5) proteínov [1].

V krajinách strednej a východnej Európy sa TBEV považuje za medicínsky najvýznamnejší arbovírus. U ľudí môže spôsobovať vážne zdravotné problémy s trvalými neurologickými následkami a napriek dostupnej vakcinácii výskyt infekcií týmto vírusom v niektorých krajinách neustále narastá. V cirkulácii TBEV kmeňov hrajú okrem rezervoárových hostiteľov veľmi dôležitú úlohu aj kliešte rodu *Ixodes*, ktoré sú evolučne adaptované na prenos špecifických kmeňov TBEV a preto je pre vývoj antivirových rozhodujúce objasnenie životného cyklu daného vírusu aj v jeho prenášačovi [2].

Aby sme pochopili, ako sa vírus kliešťovej encefalitídy replikuje a perzistuje v

kliešťoch, je potrebné preskúmať kľúčové molekuly vírusu nevyhnutné pre interakciu s kliešťami. Jedným z niekoľkých možných prístupov je použitie rekombinantného TBEV, ktorý exprimuje reportérový gén, ktorý umožňuje priame monitorovanie, vizualizáciu a kvantifikáciu vírusu v kliešťoch [3]. Reportérové gény sú užitočné markery na lokalizáciu expresie proteínov. Fúzovanie fluorescenčného reportérového génu s vybraným proteínom umožňuje pozorovať dynamiku distribúcie proteínov v živých bunkách a tkanivách [4]. V dôsledku pokroku v dizajne reverzných genetických systémov vírusov, akým je napríklad metóda ISA (Infectious Subgenomic Amplicons) [5], boli do mnohých vírusových častíc začlenené rôzne reportérové gény, aby sa objasnila ich dynamika replikácie a patogenéza. Metódy reverznej genetiky by teda mohli urobiť významný pokrok aj vo výskume vektorovej biológie, najmä v štúdiách perzistencie a prenosu vírusov v živých vektorech článkonožcov. Avšak, najdôležitejšou otázkou pre konštrukciu rekombinantných vírusov je identifikácia vhodného génového lokusu na inzerciu reportéra [6]. Manipulácia s vírusovými genómami, vloženie reportérových génov však prináša aj riziko nestability rekombinantného vírusu. Napriek obmedzeniam súvisiacim s tvorbou takéhoto chimérického vírusu sa doteraz vytvorilo viacero fluorescenčne značených flavivírusov, ktoré poskytujú silný nástroj na skúmanie niekoľkých aspektov vírusov *in vitro*, a majú taktiež silný potenciál na štúdium interakcií vírus-vektor [6, 7].

V súčasnosti je stále nedostatok informácií o interakciách medzi vírusom a jeho vektorom, ktoré sú potrebné na pochopenie štruktúrno - funkčného vzťahu vírus - kliešť. Cieľom našich experimentov bola analýza reportérového vírusu v dormantných a cicajúcich kliešťoch.

Materiál a metódy

Rekombinantný TBEV nesúci reportérový gén vytvorený pomocou ISA metódy:

V experimentoch sme použili reportérový vírus kliešťovej encefalitídy (mCherry Hypr) podľa Haviernik *et al.*, 2021. Reportér sa nachádzal v smere od 5' UTR génu kódujúceho proteín C. Kódujúca sekvencia mCherry bola lemovaná sekvenciami samoštiepiacich sa peptidov 2A (spôsobujúce preskočenie ribozómu počas translácie proteínu v bunke) na svojich 5' a 3' koncoch (Obr. 1). Ako referenčný vírus sme použili divoký kmeň Hypr (WT Hypr).



Obr. 1. Schematické znázornenie štruktúry genómu TBEV kódujúcej mCherry. Reportér bol vložený po smere od 5' UTR do génu kódujúci proteín C [3].

Experimentálna infekcia kliešťov vírusmi kliešťovej encefalitídy: Oba vírusy sme použili na transkoxálnu a intrarektálnu nanoinjekciu nýmfm kliešť'a *I. ricinus* pomocou nanoinjektora Drummond. Vírusmi inokulované kliešte sme inkubovali pri teplote 22 °C a 100% vlhkosti a v stanovených časových intervaloch (1., 4., 7. a 14. deň) sme kliešte spracovali pre ďalšie účely.

Detekcia TBEV pomocou RT-qPCR a charakterizácia reportérového vírusu: Supernatant kliešťového homogenátu sa použil na izoláciu vírusovej RNA, po ktorej nasledovala cDNA syntéza a PCR amplifikácia génu mCherry (mCherry Hypr) alebo génu C divokého typu (revertant) [8].

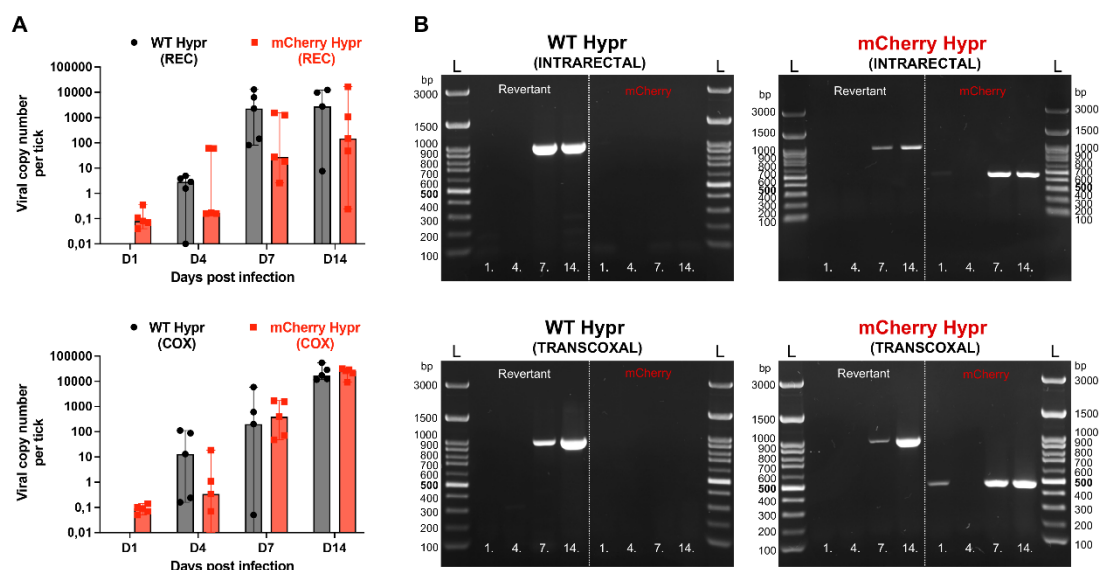
Western blot: Kliešte infikované WT alebo mCherry Hypr (15 kliešťov/skupina/interval) sa zmrazili v tekutom dusíku, rozbili pomocou sterilného piestu a zhomogenizovali v RIPA pufri. Lyzáty sa centrifugovali a alikvotná časť supernatantu sa použila na SDS-PAGE (4 kliešte/dráha). Separované proteíny boli prenesené na PVDF membránu, zafarbené Ponceau S a blotované s anti-mCherry protilátkou počas 1 hodiny pri RT. Po premytí s PBST (PBS+0,1% Tween20) sa pridala sekundárna protilátka konjugovaná s chrenovou peroxidázou. Následne s použitím chemiluminiscenčného detekčného činidla SuperSignal West Pico PLUS boli membrány exponované na röntgenový film.

Cicanie infikovaných kliešťov na laboratórnych myšiach: Kliešte *I. ricinus* infikované intrarektálne referenčným kmeňom Hypr alebo mCherry Hypr cicali na BALB/c myšiach podľa Ličková *et al.*, 2021. Čiastočne nacicané kliešte (1 deň a 2 dni po začiatku cicania) boli v počte 10 kliešťov/vírus/myš spracované pre PCR a Western blot ako už bolo popísané vyššie.

Výsledky a diskusia

Kvôli štúdiu reportérového TBEV v kliešťoch, sme vírusy mCherry Hypr a WT Hypr injektovali do nýmfm kliešť'a *Ixodes ricinus* transkoxálnou a intrarektálnou metódou. Z vírusov, ktoré boli do kliešťov injektované intrarektálne mal divý kmeň vo všetkých intervaloch vyšší počet vírusových častíc ako mCherry variant okrem dňa 1 (Obr. 2A). Pri porovnaní počtov

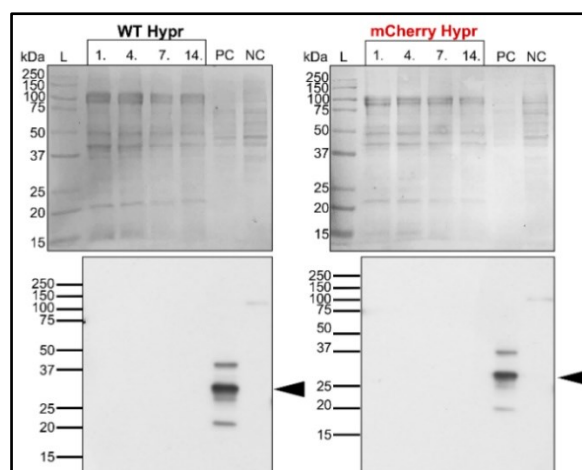
vírusových kópií v skupine napichanej transkoxálne sme pozorovali podobnú dynamiku replikácie oboch typov vírusov (Obr. 2A).



Obr. 2. Detekcia vírusov v experimentálne infikovaných dormantných kliešťoch pomocou RT-qPCR a RT-PCR. (A) Symboly v grafe reprezentujú kliešte ($n = 5$) inokulované intrarektálne (REC) alebo transkoxálne (COX), pričom stĺpce v grafe uvádzajú medián počtu vírusových kópií, smerodajné odchýlky predstavujú 95% CI (Confidence intervals). (B) Elektroforéza PCR produktov, mCherry alebo vírusového genómu divokého typu (revertant) na agarózovom géli z kliešťov injektovaných REC alebo COX inkubovaných 1, 4, 7 a 14 dní po infekcii [9].

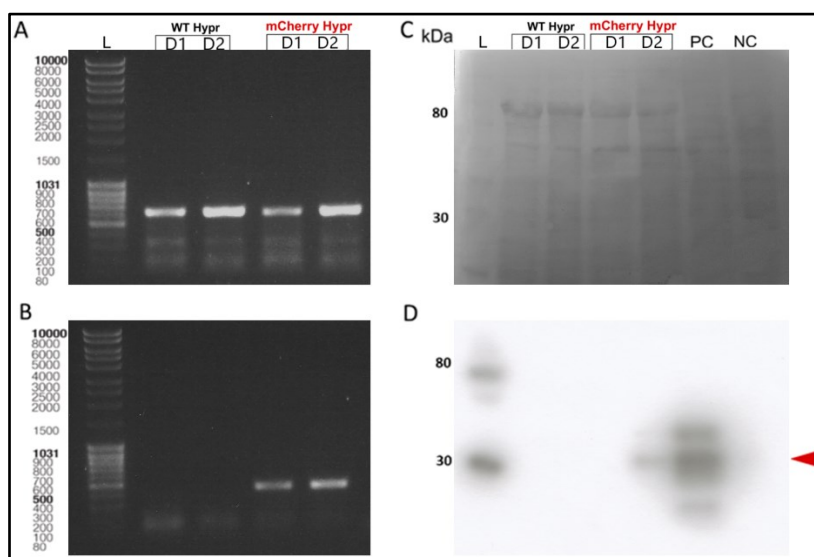
RT-qPCR sa zameriavala na 3' nekódujúcu oblasť genómu TBEV spoločnú pre oba vírusy, teda nerozlišuje medzi reportérom a divokým typom alebo revertantným vírusom. Preto sme na overenie stability mCherry Hypr, ako aj na detekciu revertantného vírusu vo vzorkách kliešťov využili PCR zacielenú na amplifikáciu čiastočného fragmentu génu C s génom mCherry alebo bez neho (Obr. 2B). Údaje preukázali, že hladina mCherry variantu v kliešťoch sa počas inkubačnej doby zvyšovala bez ohľadu na spôsob nanoinjekcie a okrem 14. dňa v skupine injektovanej transkoxálne väčšinou dominovala nad revertujúcim variantom. Okrem toho transkoxálne aj intrarektálne injektovaný mCherry Hypr vykazoval počas prvého dňa po infekcii prítomnosť tohto variantu v nízkej hladine, zatiaľ čo revertantný vírus v týchto vzorkách nebol detegovaný (Obr. 2B).

Aby sme potvrdili prítomnosť mCherry v kliešťoch, uskutočnili sme western blot s použitím polyklonálnej protilátky na vzorkách kliešťov infikovaných WT Hypr a mCherry Hypr. Pomocou tejto metódy sme však nepozorovali prítomnosť mCherry proteínu vo vzorkách kliešťov (Obr. 3). Naše vyššie uvedené údaje však potvrdili aktívnu replikáciu variantu mCherry u dormantných kliešťov.



Obr. 3. Western blot proteínov izolovaných z dormantných kliešťov infikovaných WT Hypr a mCherry Hypr. Hore PVDF membrána s proteínmi izolovanými z nýmfm *I. ricinus* infikovaných divokým typom Hypr (WT Hypr) a mCherry Hypr, zafarbeným Ponceau S a odobratých po 1, 4, 7 a 14 dni po infekcii. PC-pozitívna kontrola, lyzát buniek BHK-21 infikovaných mCherry Hypr, a NC-negatívna kontrola, lyzát neinfikovaných buniek BHK-21, sú zobrazané na pravej strane horných panelov. Dole imunoblotting po značení s anti-mCherry polyklonálnou protilátkou. Šípky označujú špecifickú protilátkovú odpoveď na proteín mCherry [9].

Nakoľko sme mCherry proteín z reportérového variantu v dormantných kliešťoch nezaznamenali, zisťovali sme, či je možné mCherry detegovať v kliešťoch počas cicania. PCR dáta potvrdili prítomnosť divého kmeňa/revertantu (Obr. 4A) vo všetkých vzorkách kliešťov ako aj prítomnosť mCherry variantu v kliešťoch infikovaných s mCherry Hypr (Obr. 4B).



Obr. 4: Detekcia vírusov v experimentálne infikovaných cicajúcich kliešťoch pomocou RT-PCR a western blot proteínov izolovaných z kliešťov. (A, B) Elektroforéza PCR produktov, mCherry variantu alebo vírusového genómu na agarózovom géli z kliešťov injektovaných intrarektálne, cicajúcich 2 dni po infekcii. (C, D) Western blot proteínov izolovaných z cicajúcich kliešťov. Hore PVDF membrána s proteínmi izolovanými z nýmfm *I. ricinus* infikovaných divokým typom Hypr (WT Hypr) a mCherry Hypr, zafarbeným Ponceau S a odobratých po prvom a druhom dni cicania. PC-pozitívna kontrola, lyzát buniek BHK-21 infikovaných mCherry Hypr, a NC-negatívna kontrola, lyzát neinfikovaných buniek BHK-21, sú zobrazané na pravej strane horných panelov. Dole imunoblotting po značení polyklonálnou protilátkou anti-mCherry.

Western blotom sme na rozdiel od dormantných kliešťov zachytili slabý signál mCherry proteínu v kliešťoch po dvoch dňoch cicania (Obr. 4D), čo naznačuje, že prítomnosť reportéra môžu ovplyvňovať fyziologické zmeny počas cicania kliešťov.

Záver

Sledovanie dynamiky prenosu a interakcie TBEV a kliešťov uľahčujú reportérové vírusy, ktoré poskytujú účinný nástroj na skúmanie vírusových virulénnych faktorov *in vitro*, ako aj *in vivo*. Okrem toho umožňujú aj priamy skrining kandidátskych antivírusových látok a detekciu vírusu v infikovaných bunkách [3]. Naše údaje ukazujú, že mCherry Hypr TBEV predstavuje vynikajúci nástroj na štúdium interakcií TBEV-kliešť na bunkovej a molekulárnej úrovni [9]. Nakoľko sa použiteľnosť mCherry Hypr TBEV môže medzi experimentálnymi modelmi kliešťov líšiť, je potrebné preskúmať faktory, ktoré stoja za pozorovanými rozdielmi (absencia fluorescencie reportérovej značky v dormantných kliešťoch a zjavnú prítomnosť mCherry proteínu u cicajúcich kliešťoch). Naše výsledky môžu pomôcť pri vývoji stabilných reportérových TBEV, čo je veľmi potrebný nástroj na štúdium flavivírusov *in vivo* v kliešťoch a laboratórnych zvieratách.

PodĎakovanie

Táto práca bola financovaná z projektu H2020 #101030179-TVISTOFF a TBFVnet: surveillance and research on tick-borne flaviviruses (TBFV) 2018-1-0659. Juraj Koči je držiteľom Marie Skłodowska-Curie reintegration fellowship, H2020-MSCA-IF-2020, projekt# 101030179-TVISTOFF.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Pulkkinen L.I., Butcher S.J., Anastasina M. (2018) *Viruses* 10(7), p. 350
- [2] Ruzek D., Avšič Županc T., Borde J., et al. (2019) *Antiviral Res.* 164, p. 23
- [3] Haviernik J., Eyer L., Yoshii K., et al., (2021) *Antiviral Res.* 185
- [4] Tamura T., Fukuhara T., Uchida T., et al., (2018) *J. Virol.* 92(2)
- [5] Aubry F., Nougairé A., De Fabritus L., et al. (2014) *J. Gen. Virol.* 95, p. 2462
- [6] Pierson T. C., Diamond M. S., Ahmed A.A., et al. (2005) *Virology* 334(1), p. 28
- [7] Tamura T., Igarashi M., Enkhbold B., et al. (2019) *J. Virol.* 93(22)
- [8] Ličková M., Havlíková S.F., Sláviková M., et al. (2021) *Viruses* 14(56)
- [9] Kevély Á., Pránčlová V., Sláviková M., et al. (2022) *Viruses* 14(12), p. 2673

A rare case of adverse effects caused by Hippoboscidae bite

Fariba Khanzadeh¹, Naseh Maleki-Ravasan², Matúš Kúdela¹, Milada Holecová¹

¹*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Zoology, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak republic;*

khanzadeh.fariba@gmail.com

²*Pasteur Institute of Iran, Biotechnology Research Center, Malaria and Vector Research Group, Pasteur, 1316943551 Tehran, Iran*

Abstract

Hippoboscidae, the louse flies or keds are ectoparasitic feeding on the blood of mammals or birds. They are accused of carrying both ectoparasites and endoparasites to their hosts. They bite humans when given no other choice of host, and their bites are definitely itchy. The insect was collected in public places on the dog. A healthy 60-year-old woman was bitten by an insect on her left forearm in Iran. Erythematous papular rashes appeared around the bite area when she talked about her problem with an entomologist. This study was aimed at acquiring further information on with this ectoparasite in order to evaluate its possible role as a vector of harmful microorganisms.

Keywords: *Hippoboscidae; insect bite; rash; Iran*

Introduction and Objectives

Many species of arthropods are known to be vectors of pathogens. The most renowned groups that cause vector-borne diseases are mosquitoes, as well as ticks, fleas, lice and flies. Viruses and bacteria (including rickettsiae), protozoa and filarial nematodes are transmitted by arthropods [1]. Among the species capable of transmitting disease, flies of the Hippoboscidae family are currently receiving more attention and several etiological agents have been detected in as many as species, making hippoboscids worthy of further study from a health point of view public health [2]. Recently, the importance and role of these ectoparasites as a nuisance to hosts and humans has been reviewed, highlighting that the health risks associated with these dipterans may be probably much greater than presently known [2]. The family Hippoboscidae includes obligate blood-sucking ectoparasites that thrive on various mammals and birds. It should be noted, however, that these hippoboscids can feed on some occasional hosts, including humans with possible consequent health risks [3, 4]. Genus *Hippobosca* in this family Hippoboscidae with seven species described. All species are found in Africa and the Middle East, with the distribution of three species extending into East and Southeast Asia [5]. A global distribution can be found in Maa [6], a distribution for the Palearctic in [7]. All species of this genus are blood-sucking ectoparasites that are also known to be possible vectors of various diseases [8].

Humans are sometimes attacked by deer keds and the symptoms of their bites include

the appearance of papules in varying numbers that last for several weeks or up to a year. Allergic reactions include severe itching, erythema, chronic dermatitis, and sometimes secondary infection [9- 10, 4, 11]. In addition, these parasites can be a nuisance to people, especially those who work in or visit natural habitats [12]. It should also be noted that hippoboscids may be vectors of pathogens responsible for the transmission of pathogens from animals to humans (zoonoses) [2]. This study aimed to gather more information about this ectoparasites to evaluate its possible role as a vector of harmful microorganisms.

Materials and methods

The insect was collected in public places on the dog (Fig. 1., Fig. 2. A). The collected louse flies were first killed in a poison glass containing potassium cyanide for 10 minutes and then placed in a plastic container containing 70% alcohol. The fly specimens were taxonomically identified following different keys and descriptions of *Hippobosca* sp. [3, 13, 14], and stored at -20 °C till further processing.

Results and discussion

In the 23, July 2019 a healthy 60-year-old woman was bitten on her left forearm by an insect in Khoda Afarin County, East Azerbaijan Province, Iran (Fig. 2. B). She had killed the insect and tried to remove the remnants of the insect from the tissue. After being bitten, she suffered from itch, general pain, nausea, dizziness, feeling faint and headache for two weeks. On August 6, erythematous papular rashes appeared around the bite area when she talked about her problem with an entomologist. She was asked to receive first-aid treatment (at least an antibiotic) at the nearest health center. But she arbitrarily used a traditional treatment that she had learned from an Indian physician - and all lesions and symptoms of the disease disappeared in two days. The biting insect was identified through valid identification keys as a Hippoboscid species belonged to the genus *Hippobosca*.



Fig. 1. Female of *Hippobosca* sp. from Khoda Afarin County, East Azerbaijan Province, Iran.



Fig. 2. A: The host which the sample was collected from, B: *Human biting cases*

Conclusion

Further investigations are essential to prove whether this fly is a vector of pathogens responsible for the transmission of pathogens from animals to humans (zoonoses). Furthermore, future research needs to be conducted to investigate whether Hippoboscidae is

capable of propagating and transmitting other vector-borne and zoonotic pathogens.

Acknowledgement

The authors thank the Comenius University for supporting this study. Thanks to N. Maleki Ravasan for his valuable discussions. We would like to thank our colleague Elham Khanzadeh for her support with the field work.

References

- [1] Durden L. A., Mullen G. R., Durden L. A. (2019) Lice (Phthiraptera). Medical and veterinary entomology, Academic Press, London, UK, p. 150
- [2] Bezerra-Santos M. A., Otranto D. (2020) *Acta Trop.* 209(1), 105521
- [3] Bequaert J. C. (1942) *Entomol. Am.* 22(1), p. 220.
- [4] Maślanko W., Bartosik K., Raszevska- Famielec M., et al. (2020) *Insects.* 11(12), p. 859
- [5] Hutson A. M. (1984) Diptera: Keds, flat-flies & bat-flies (Hippoboscidae & Nycteribiidae). Handbooks for the Identification of British Insects. Royal Entomological Society of London, p. 84
- [6] Maa T. C. (1969) *Pac. Insects Monogr.* 20(4), p. 261
- [7] Nartshuk E. P., Yatsuk A. A., Matyukhin A. V., et al. (2017) *Russ. Acad. Sci.* 31(2), p. 191
- [8] Nartshuk E. P., Matyukhin A. V., Zabashta M. V. (2019) *Russ. Entomol.* 28(1), p. 91
- [9] Buczek W., Buczek A. M., Bartosik K., et al. (2020) *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 17(9), p. 3316
- [10] Härkönen S., Laine M., Vornanen M., et al. (2009) *Alces.* 45, p. 73
- [11] Rantanen T., Reunala T., Vuojolahti P., et al. (1982) *Acta Derm. Venereol.* 62(4), p. 307
- [12] Härkönen S., Laine M., Vornanen M., et al. (2009) *Alces.* 45, p. 73
- [13] Andreani A., Sacchetti P., Belcari A. (2019) *Med. Vet. Entomol.* 33(1), p. 140
- [14] Maa T. C. (1965) *J. Med. Entomol.* 2(3), p. 233

The occurrence and distribution of synanthropic plant species on the ski slopes in Central Slovakia

Simona Klačanová¹, Ivan Jarolímek¹, Peter Sabo², Vasilii Shapkin¹, Mária Šibíková¹,
Michaela Michalková¹, Jozef Šibík¹

¹*Plant Science and Biodiversity Center of Slovak Academy of Sciences, v. v. i., Institute of Botany, Dúbravská cesta 9, 845 23 Bratislava, Slovak republic; simona.klacanova@savba.sk*

²*Matej Bel University in Banská Bystrica, 974 01 Banská Bystrica, Slovak republic*

Abstract

Ski slopes represents semi-natural, often artificially created habitats constantly disturbed by skiing activities. This creates an excellent opportunity for synanthropic plant species to occur, as they thrive in man-made habitats. However, synanthropization is also related to impoverishment and homogenization of flora. In our study we aim to assess the distribution of synanthropic flora and vegetation at different parts of ski slopes. We have performed 45 phytosociological relevés at the central part of a ski slope and under ski lifts (upper and bottom part) in 15 ski resorts in central Slovakia. Our results show that the most disturbed in terms of the occurrence of synanthropic flora and vegetation were the areas under ski lifts at the bottom of the ski slopes that could be explained by the high presence of skiers and nearby infrastructure.

Keywords: *disturbance, ski resorts; synanthropization*

Introduction and Objectives

Ski slopes are man-made landscapes that are created for recreational purposes, altering natural ecosystems, and providing habitats for various plant and animal species, some of which can even be threatened [1]. The disturbance caused by human activities on ski slopes creates suitable conditions for synanthropic plant species to establish and thrive [2]. Synanthropic plant species have adapted to live in close association with human activities (such as urban areas, agricultural fields, and transportation corridors) and are dependent on them [3]. Ski slopes provide a unique opportunity to study the occurrence and distribution of synanthropic plant species in an environment that is heavily modified by anthropogenic interventions [4]. These plants can have both positive and negative impacts on the environment, and their presence can provide valuable insights into the ways in which human activities can affect natural ecosystems [5]. Some synanthropic species, such as certain grasses and herbs, can help stabilize soil on ski slopes and prevent erosion. On the other hand, synanthropization is closely related to the unification of flora, replacement of native plant communities and invasion of non-native plant species [6].

We hypothesize, that the lowest ratio of synanthropization is on the slopes used for skiing, while edge areas and sites under ski lifts will show the highest number of synanthropic species [7]. Therefore, we aim to investigate the occurrence and distribution of synanthropic

plant species on ski slopes in Central Slovakia, with a focus on functional areas under ski lifts. We perceive the lift lines as areas where skiers tend to congregate, creating high levels of foot traffic. This frequent activity can lead to the creation of a great habitat for synanthropic species to occur.

Materials and methods

15 ski resorts in Central Slovakia (in Banská Bystrica Region and Žilina Region) were selected for the research. We studied the areas at the entrance to the ski lift and at the exit of the same ski lift. The aforementioned areas are referred to as "functional areas" and demonstrate higher levels of anthropogenic load than directly on the ski slopes. We have compared these areas with the central parts of the ski slopes.

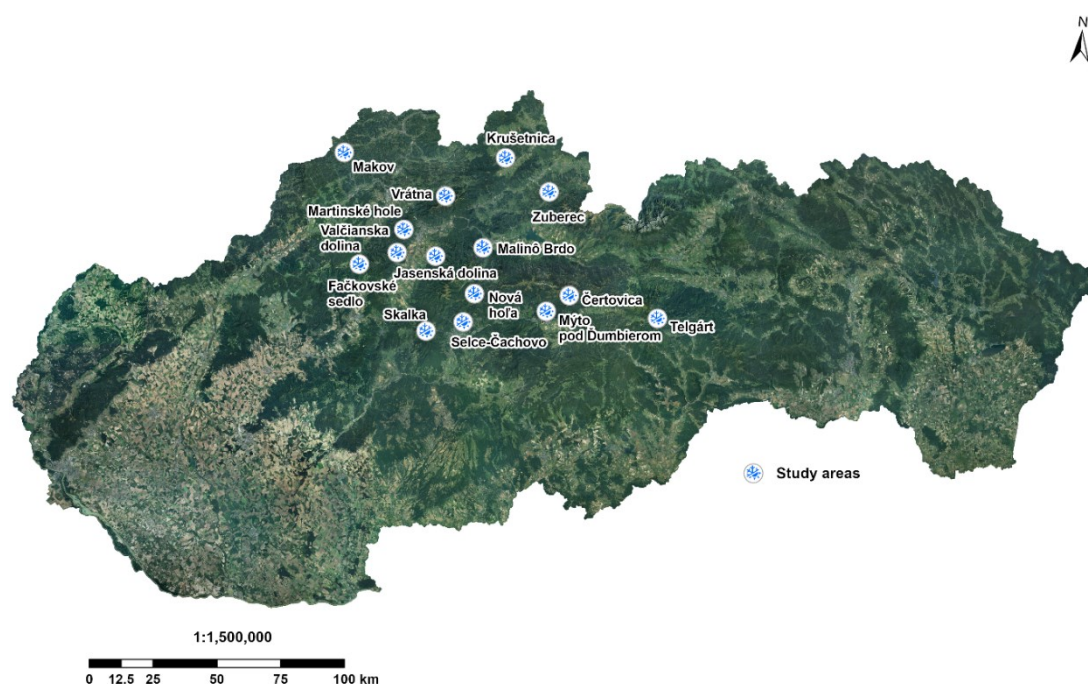


Fig. 1. Selected ski resorts

Background map: Orthophotomosaics of SR 2021 (GKÚ Bratislava, NLC).

Phytosociological relevés in the size of 4x4m were collected during the vegetation season of 2021 and 2022, using the Zürich-Montpellier school of phytosociology with percentage species coverage scale [8]. The relevés have been stored in the TURBOVEG for Windows program, ver. 2.154 [9] and processed in the JUICE programme, ver 7.1 [10]. The relationship of species diversity (measured as Shannon-Wiener species diversity index) with plant community structure features (Tab.1) in different parts of the ski slopes were studied

using a simple linear regression model in the R programming language. We have identified synanthropic species in each relevé and divided into obligatory and facultative synanthropic species according to [5]. To assess the level of synanthropization of vegetation on the functional parts of the ski slope, we have been inspired by the existing synanthropization indexes for flora and vegetation [11 – 13]. Our original formulas operate with facultative and obligatory synanthropic species:

$$SYN_{flora} = \frac{(N_{Ob} w_{Ob} + N_{Fa} w_{Fa})}{S} \quad [I.]$$

$$SYN_{vegetation} = \frac{\sum_{i=1}^{N_{Ob}} (obligatory_synanthropic_i w_{Ob}) + \sum_{k=1}^{N_{Fa}} (facultative_synanthropic_k w_{Fa})}{N} \quad [II.]$$

where SYN_{flora} is the degree of synanthropization of flora (proportion of synanthropic species), N_{Ob} is the number of obligatory synanthropic species, N_{Fa} is the number of facultative synanthropic species, S is the number of all species in a relevé; w_{Ob} and w_{Fa} are weights denoting (possibly different) contributions of each of these two groups of synanthropic species to the synanthropization of flora and also to the synanthropization of vegetation (to make the things in this phase of our research simple, we have set both $w_{Ob} = 1$ and $w_{Fa} = 1$). $SYN_{vegetation}$ is the degree of synanthropization of vegetation (proportion of the coverage of synanthropic species), $obligatory_synanthropic_i$ is the abundance (coverage) of the obligatory synanthropic species in a relevé, $facultative_synanthropic_k$ is the coverage of the obligatory synanthropic species in a relevé, N is the total coverage of all the species in a relevé.

Tab. 1. Variables used in linear regression model with average values and standard deviation in a relevé for each studied area

Variable	Down (n=15)	Mid (n=15)	Up (n=15)
Synanthropic plant species	16.3 ±6	9.3 ±4.1	11.2 ±4.8
Index of synanthropization of flora	0.49±0.12	0.33±0.1	0.37±0.12
Index of synanthropization of vegetation	0.30 ±0.21	0.15 ±0.19	0.16 ±0.11
Cover of obligatory synanthropic species (%)	24	6	9
Obligatory synanthropic species	5.9 ±3.3	2.6 ±1.7	3.3 ±1.4
Cover of facultative synanthropic species (%)	8	5	8
Facultative synanthropic species	9.7 ±2.7	7.5 ±2.7	8 ±3.8
Shannon-Wiener diversity index	2.6 ±0.4	2.7 ±0.4	2.8 ±0.5

Results and discussion

In the amount of 45 relevés collected, we have found in total 296 species, from which 67 were synanthropic, that were then differentiated between facultative and obligatory. The highest amount of synanthropic species was found in the ski lift entrance area with total 60 synanthropic species, from which were 37 facultative synanthropic and 23 obligatory synanthropic. The second highest amount of synanthropic species has occurred on the exit areas of ski lifts, with total of 49 synanthropic species and 30 facultative synanthropic and 19 obligatory synanthropic. The lowest amount of synanthropic species was in the central parts of ski slopes, where 36 synanthropic species occurred, from which were 28 facultative synanthropic and only 8 obligatory synanthropic. Fig. 2 shows the average amount of obligatory and facultative synanthropic species in relevés in each studied area, while the highest average amount was on the ski lift entrance areas. Also, it is visible, that the biggest difference in terms of the amount of synanthropic species was found between the ski lift entrance area and central part of a ski slope ($p \leq 0.01$).

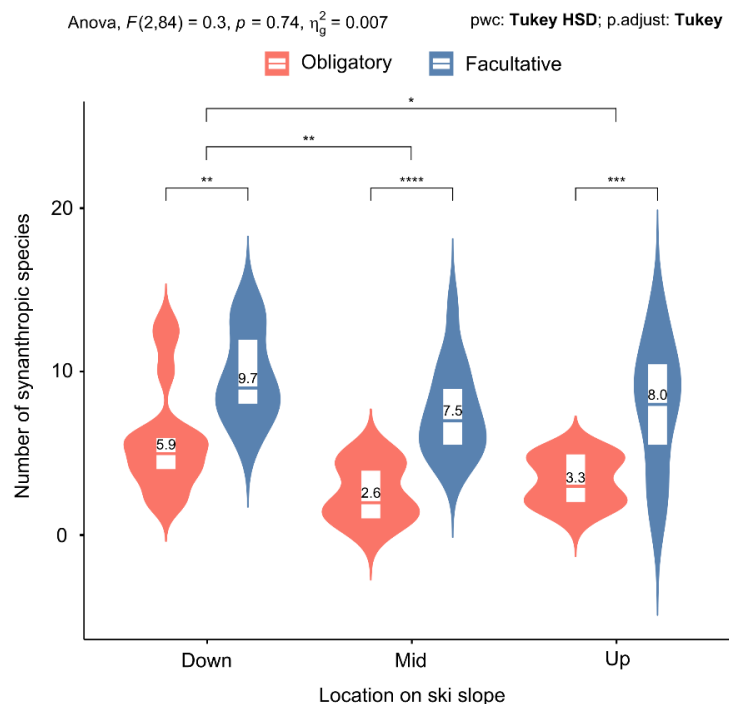


Fig. 2. Violin plots show the distribution of obligatory and facultative synanthropic species richness in relevés in each area (Down – ski lift entrance area, Mid – central part of a ski slope, Up – ski lift exit area). Significant differences were assessed by Fisher's 2-way ANOVA test with pairwise Tukey HSD test comparisons: (*) p-value ≤ 0.05 ; (**) p-value ≤ 0.01 ; (***) p-value ≤ 0.001 ; (****) p-value ≤ 0.0001 .

We sorted the synanthropic species in the JUICE programme [10] by absolute

frequency and found out which species had the highest occurrence in each area. In the ski lift entrance area, *Agrostis stolonifera*, *Cirsium arvense*, *Chaerophyllum aromaticum*, *Carex hirta*, *Poa annua*, *Artemisia vulgaris* and even invasive *Erigeron annuus* were the most frequent. In the ski lift exit area, *Vicia cracca*, *Plantago lanceolata*, *Tanacetum vulgare* and *Calamagrostis epigejos* occurred the most frequently. In the central part of the ski slopes, highly occurring were synanthropic species *Achillea millefolium*, *Dactylis glomerata* and *Medicago falcata*.

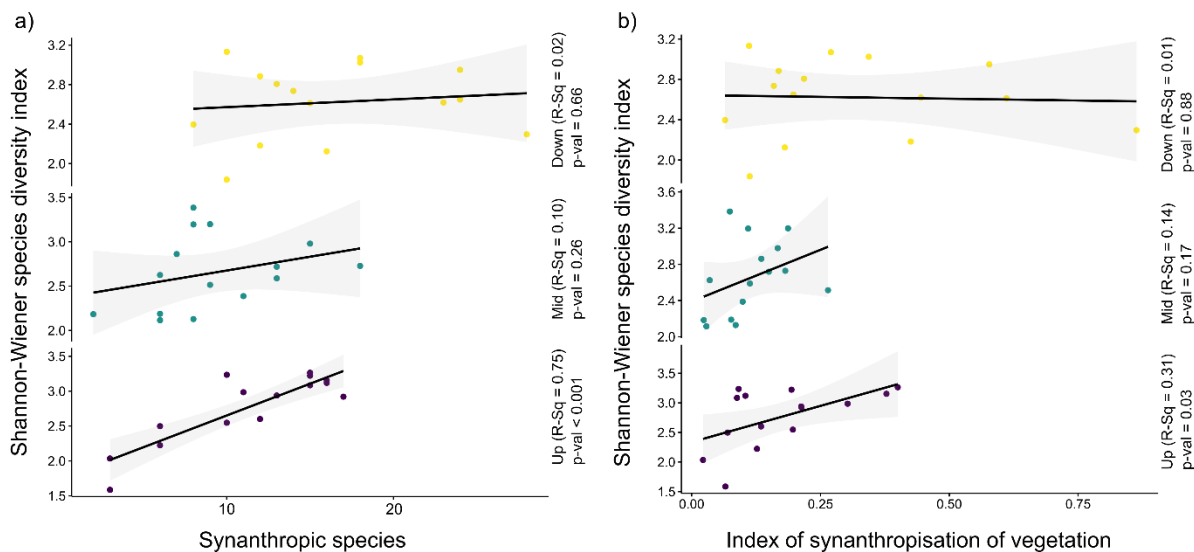


Fig. 3. Linear regression models show the impact of predictor variables as (a) the number of synanthropic species and (b) the index of synanthropizaion of vegetation on a response variable as the Shannon-Wiener species diversity index, counted for each area (Down – ski lift entrance area, Mid – central part of a ski slope, Up – ski lift exit area) .

Shaded area represents a 95% confidence interval.

The main predictors for species diversity were the number of synanthropic species and the index of synanthropization of vegetation; the other studied parameters did not show a significant influence on species diversity. From all studied areas only the plots on the ski lift exits (Up) showed significant results in linear model analysis. It was found that the number of synanthropic species (Fig. 3a) and the index of synanthropization of vegetation (Fig. 3b) had significant positive effect on Shannon-Wiener species diversity index on plots under the ski-lifts on top of the ski slope ($R^2=0.75$; $p<0.001$ and $R^2=0.31$; $p=0.03$ respectively).

The results show that with the increasing number of synanthropic species and the increasing amount of synanthropic vegetation, the Shannon-Wiener index rises, meaning that the vegetation under ski lifts is more diverse. Similar results were published [1, 7, 14], where the highest ratio of synanthropization was found on the edge areas of ski slopes. This could be explained by the intermediate disturbance hypothesis, that with neither too low, nor too high

disturbance the species diversity maximizes [15].

Conclusion

Although there has not been much focus given to studying synanthropic vegetation on ski slopes yet, the results are showing that these habitats are showing a quite high occurrence of synanthropic plant species, especially in the entrance areas of ski lifts. It is common that these areas are often neighbouring numerous other infrastructures such as access roads, parking lots, accommodation facilities, etc., which could be the factor that is behind the spreading of synanthropic plant species in the areas under ski lifts, other than the high concentration of skiers.

References

- [1] Kubota H., Shimano K. (2010) *Landsc. Ecol. Eng.* 6, p. 61
- [2] Lososová Z., Chytrý M., Kühn I., et al. (2006) *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 8(2), p. 69
- [3] Eliáš P. (2018) *Zprávy Čes. Bot. Společ.* 53, p. 22
- [4] Hudek C., Barni E., Stanchi S., et al. (2020) *Sci. Rep.* 10(1), p. 11654.
- [5] Jarolínek I., Zaliberová M., Mucina L., et al. (1997) *Rastlinné spoločenstvá Slovenska 2. Synantropná vegetácia*. Veda, Bratislava, p. 9
- [6] Gorchakovskii P. L., Kharitonova O. V. (2007) *Russ. J. Ecol.* 38, p. 375
- [7] Kňazovičová L., Chasníková S., Novák J., et al. (2018) *Ekol.* 37(2), p. 152
- [8] Braun-Blanquet J. (1964) *Pflanzensoziologie, Grundzüge der Vegetationskunde*. 3rd Edition, Springer-Verlag, Berlin, p. 631.
- [9] Hennekens S. M., Schaminée J. H. (2001) *J. Veg. Sci.* 12(4), p. 589
- [10] Tichý L. (2002) *J. Veg. Sci.* 13(3), p. 451
- [11] Sabo P., Turisová I., Škodová M., et al. (2017) *Quaestiones Rerum Naturalium*. 4(2), p. 30
- [12] Jackowiak B. (1990) *Antropogeniczne przemiany flory roślin naczyniowych* Poznań. Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, p. 12
- [13] Jackowiak B. (1998) *Phytocoenosis*. 10, p. 79
- [14] Kocková J. (2008) *Srovnání vegetace sjezdových tratií s umělým a přírodním sněhem v CHKO Bílé Karpaty a v CHKO Beskydy*. (Master thesis) University of South Bohemia in České Budějovice
- [15] Connell J. H. (1978) *Science*, 199(4335), p. 1302

Metagenomická analýza environmentálnych vzoriek vzduchu odobraných z výroby bryndze

Nikola Klišťincová, Francesca Maisto, Mária Bučková, Domenico Pangallo

Ústav molekulárnej biológie Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Dúbravská cesta 21, 845 51
Bratislava, Slovenská republika; nikola.klistincova@savba.sk

Abstract

Metagenomic Analysis of Environmental Samples Collected from the Air at the Bryndza Cheese Factory
Slovak bryndza is traditional slovak cheese with PGI (protected geographical indication) status and is usually produced in mountain areas. Current Slovak legislation states that it must contain at least 50% of the sheep's cheese. Typical organoleptic properties are determined by the composition of the microbiota as well as the quality of the materials used. For better comprehension of the quality of traditional Slovak bryndza, lactic acid bacteria present in it and their diversity should be studied. Cultivation of microorganisms on nutrient media was used as a culture-dependent method and Oxford Nanopore sequencing was used as a culture-independent method. Using the cultivation method we observed that the air collected from the cheese room had the highest amount of microbiota. We gained knowledge of the microbiota's composition due to metagenomic analysis.

Keywords: Bryndza; Nanopore sequencing; metagenomic analysis; microorganism composition

Úvod a formulácia cieľa

Slovenská bryndza je mäkký roztierateľný syr tradične vyrábaný na Slovensku. Tomuto produktu je v rámci Európskej únie uznaný štatút chráneného zemepisného označenia. Vstupnou surovinou je hrudkový syr z ovčieho mlieka vyzrážaný syridlom, ktorý je fermentovaný vo vhodnom roztoku pri izbovej teplote. Potom sa rozomelie a zmieša s fyziologickým roztokom, aby nadobudol roztierateľnú konzistenciu. Do konečného výrobku sa zvyčajne pridáva hrudkový syr z kravského mlieka [1]. Predpokladá sa, že východiskové materiály, ako aj aktivita mikrobioty reprezentovaná najmä baktériami *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Kluyveromyces marxianus* a *Galactomyces geotrichum* ovplyvňujú charakteristické organoleptické vlastnosti slovenskej bryndze [2].

Množstvo prchavých organických zlúčenín (VOC) syra, vrátane ovčieho syra na báze surového mlieka, vzniká proteolýzou a následnou premenou aminokyselín [3] na α -ketokyseliny [4]. Výsledné α -ketokyseliny sa potom degradujú na aldehydy, alkoholy, karboxylové kyseliny, estery, metántiol a iné zlúčeniny síry. Väčšina týchto zlúčenín sa vyrába enzymatickou degradáciou, ale niektoré z nich sú výsledkom chemickej degradácie pri oxidácii. Voľné mastné kyseliny (FFA) v mlieku ovplyvňujú vlastnosti syra (chuť, textúra a farba). FFA sú hlavnými produktmi enzymatickej hydrolýzy triacylglyceridov pomocou

esteráz a lipáz [5].

Cieľom práce bola analýza metagenómu vzoriek vzduchu odobraných z výrobné bryndze a následné porovnanie kultivačne a nekultivačne závislej metódy analýzy.

Materiál a metódy

Odber vzoriek, kultivačne závislá metóda mikroorganizmov

Vzorky boli odoberané z výrobné bryndze na Orave a boli získané z rôznych miestností - syrárň (21°C, vlhkosť 67%), bryndziareň (22°C, vlhkosť 66%). Vzduch pre kultivačne nezávislú metódu bol odoberaný pomocou prístroja (Millipore WP6122050) do 1x PBS roztoku (pH 7,4; v 1 L roztoku: je 0,137 M NaCl, 0,0027 M KCl; 0,01 M Na₂HPO₄; 0,0018 M KH₂PO₄ a 0,8 L vody) v každej miestnosti. Odber vzoriek vzduchu pre kultivačne závislú metódu bol vykonaný v každej miestnosti pomocou prístroja Air-sampler Mas 100 Eco (Merck, Darmstadt, Nemecko), kde boli špecifické agarové platne pre baktérie (Man-Rogosa-Sharpe agar – MRS (Merck), M17 agar (Merck), R2A (HiMedia); každé médium sa použilo v duplikáte. Do laboratória boli prinesené misky po odbere vzduchu. Agarové platne (MRS) sa inkubovali anaeróbne v anaerostate s použitím Anaerocult A (Merck) pri 37 °C počas 48 hodín, agarové platne M17 sa inkubovali pri 30 °C počas 48 hodín, agarové platne R2A sa inkubovali pri 25 °C, kým sa prejavil rast mikroorganizmov. Obsah predpokladaných laktobacilov bol odhadnutý na MRS agare, obsah predpokladaných laktokokov bol odhadnutý na agare M17 s prihliadnutím na morfológiu kolónií. Stresované baktérie boli stanovené na R2A agare. Koncentrácie bakteriálnych kolónií vo vzduchu boli vypočítané pomocou Fellerovho konverzného vzorca použitého na štatistickú korekciu, ktorý je nasledujúci:

$$Pr=N[1/N+1/N-1+1/N-2....1/ N-r+1] \quad [L.]$$

kde Pr = pravdepodobný štatistický celkový počet (CFU/objem vzduchu); N = 400 (počet otvorov v perforovanom veku vzorkovača) a r = počet CFU napočítaných na Petriho miske. Objem odobratého vzduchu bol 100 L a doba expozície bola 1 minúta.

Izolácia DNA, príprava DNA amplikónov na sekvenovanie

Vzorky vzduchu pre kultivačne nezávislú metódu boli následne z PBS roztoku v laboratóriu prefiltrované na 0,2 µm nitrocelulózovú membránu (Whatman, GE Healthcare). DNA bola izolovaná pomocou DNeasy PowerSoil extrakčného kitu (Qiagen, Hilden, Nemecko) podľa štandardného protokolu výrobcu. Dlhé bakteriálne 16S rRNA gény boli amplifikované pomocou sady primérov 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') a

1492R (5'- GGT ACC TTG TTA CGA CTT-3'; Lane 1991). Celkový objem 25 µl PCR zmesi bol zložený z 1 x PCR pufru, 50 pmol každého priméru, 200 µmol dNTP (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), 1,5 U HotStar Taq plus DNA polymeráza (Qiagen) a 3 µl extrahovanej bakteriálnej DNA. Program PCR pozostával z počiatočného denaturačného kroku (95 °C, 5 minút), po ktorom nasledovalo 35 cyklov (94 °C 1 min.; 54 °C 1 min.; 72 °C 2 min.) a finálny polymerizačný krok (72 °C počas 10 minút). Produkty PCR sa skontrolovali elektroforézou s použitím 1,0 % agarózového gélu a 100 bp DNA Ladder (Solis BioDyne, Tartu, EST) a purifikovali pomocou Monarch purifikačného kitu (Monarch PCR & DNA Cleanup kit, New England Biolabs).

Sekvenovanie DNA, dátová analýza

Knižnica pre nanopórové sekvenovanie platformou MinION bola vyrobená z purifikovaných amplikónov pomocou Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109) . Barkódovanie DNA sa uskutočnilo pomocou adaptérov a primérov z PCR Barcoding kit 96 (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK). Pre barkódovacu PCR boli použité nasledujúce kroky: počiatočný denaturačný krok (95 °C, 3 minúty), po ktorom nasledovalo 19 cyklov (95 °C počas 15 s; 62 °C počas 15 s; 65 °C počas 2 minút) a posledný krok predlžovania (65 °C počas 10 minút). Sekvenovanie sa uskutočňovalo 48 hodín na sekvenátore MinION (Oxford Nanopore Technologies) [6]. Po sekvenovaní boli generované fast5 súbory. Basecalling bol vykonaný programom Guppy, následne boli z čítaníí odstránené adaptéry pomocou programu Porechop [7]. Kvalita čítaní bola skontrolovaná pomocou FastQC nástroja [8]. Taxonomická klasifikácia bola vykonaná pomocou nástroja Kraken2 v balíčku programov Galaxy [9]. Ako referenčnú databázu bola vybraná SILVA databáza [10]. Vizualizácia taxonomickej klasifikácie bola vykonaná pomocou Krony [11].

Výsledky a diskusia

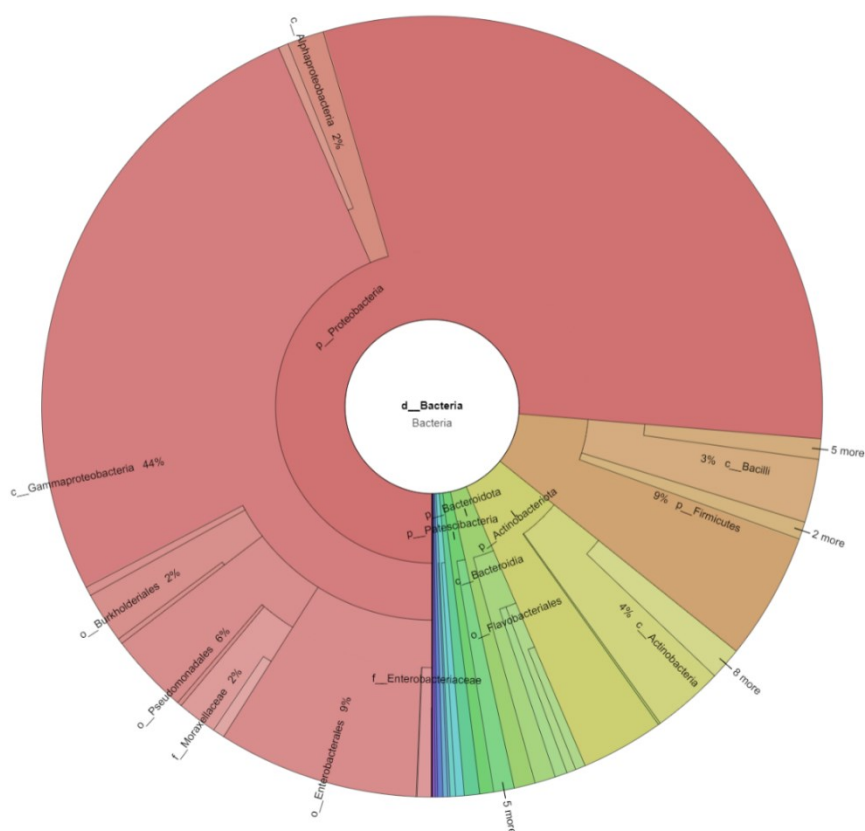
Skupiny mikroorganizmov analyzované kultivačne závislou metódou boli kvantifikované počas výroby bryndze. Zozbierané kultivačné údaje o laktobacilochoch, laktokokoch, stresovaných baktériách, sú zhrnuté v tabuľke 1.

Tab. 1. Počet jednotiek vytvárajúcich kolónie (CFU) na 1 cm³ vzduchu Vzorky vzduchu zo syrárne boli získané z dvoch miestností - syrárň (21°C, vlhkosť 67%), bryndziareň (22°C, vlhkosť 66%)

Miestnosť	Vzorka	MRS	M17	R2A
Syráreň	Vzduch	15	11	51
Bryndziareň	Vzduch	27	1	26

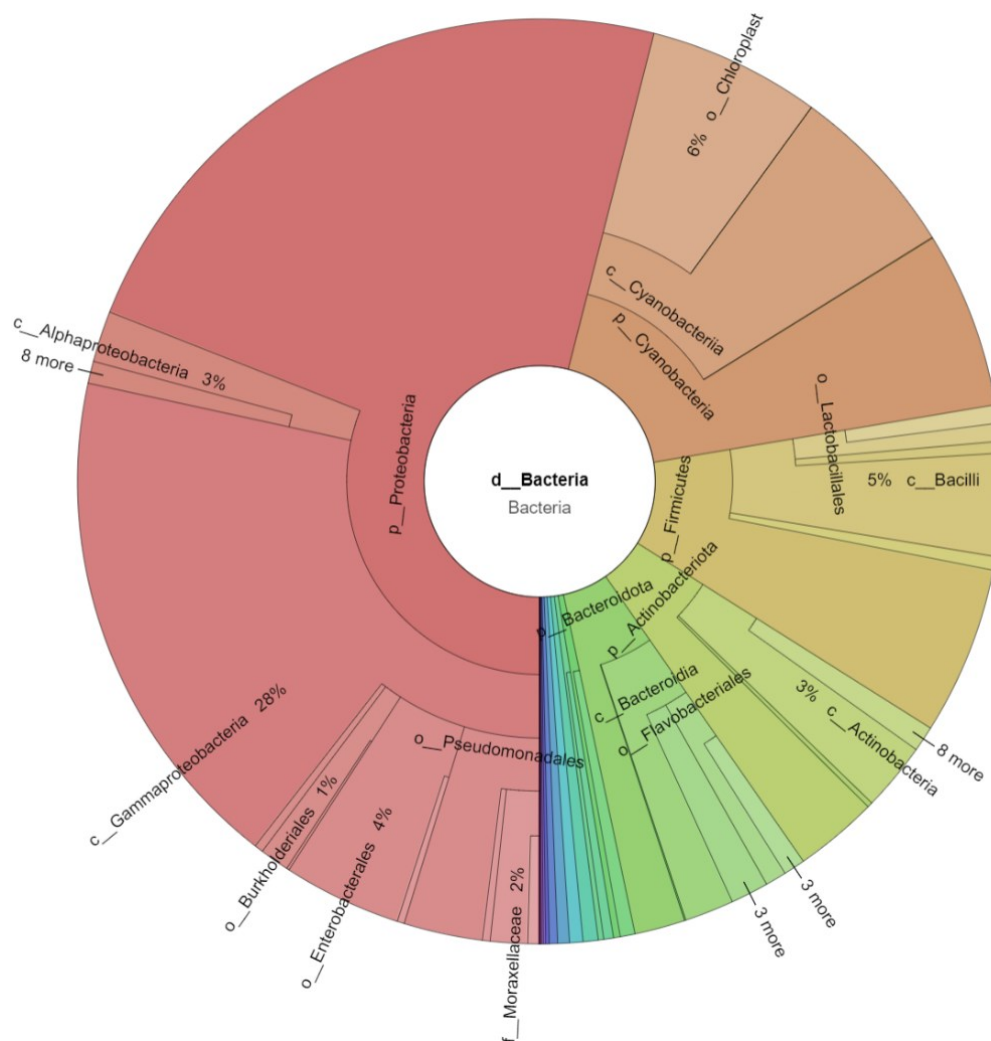
Najviac baktérií v miestnosti syrárň narástlo na R2A médiu a to 51 CFU/cm³ stresovaných baktérií. Nasledovali laktobacily na MRS pôde s počtom 15 CFU/cm³ a laktokoky s počtom 11 CFU/cm³ kultivované na M17 pôde. V miestnosti bryndziareň narástlo najviac laktobacilov na MRS pôde s počtom 27 CFU/cm³, nasledovali stresované baktérie s počtom 26 CFU/cm³ na R2A pôde a najmenej narástlo laktokokov na M17 pôde v množstve 1 CFU/cm³.

Metagenomická analýza bola vizualizovaná pomocou Krona grafu. Obrázok 1 a 2 zobrazujú zastúpenie jednotlivých taxonomických kategórií vo vzorkách vzduchu odobraných z dvoch miestností.



Obr. 1. Krona graf miestnosti Syrárň – znázorňuje identifikované baktérie od kmeňa po čeľaď na základe SILVA databázy. Najviac zastúpené sú kmene: *Proteobacteria*, *Firmicutes* a *Actinobacteriota*.

Celkový počet sekvencií v syrárni je 245 162 a najpočetnejším kmeňom v bol *Proteobacteria* (76%), ktorý tvorili triedy *Alphaproteobacteria* a *Gammaproteobacteria*. Pričom sa nám podarilo identifikovať triedu *Gammaproteobacteria* na rady: *Burkholderiales*, *Pseudomonadales* s čeľaďou *Moraxellaceae* a *Enterobacterales* s čeľaďou *Enterobacteriaceae*. Nasledovali kmene: *Firmicutes* (9%) s triedou *Bacilli*; *Actinobacteriota* (8%) s triedou *Actinobacteria*; *Bacteroidota* (3%) až na rad *Flavobacteriales* a *Patescibacteria* (1%).



Obr. 2. Krona graf miestnosti Bryndziareň – znázorňuje identifikované baktérie od kmeňa po čeľaď na základe SILVA databázy. Najviac zastúpené sú kmene: *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteriota* a *Bacteriota*.

Celkový počet sekvencií pre bryndziareň je 538 738 sekvencií. Najpočetnejším kmeňom v bryndziarni bol *Proteobacteria* (54%), ktorý tvorili triedy *Alphaproteobacteria* a *Gammaproteobacteria* s radmi *Burkholderiales*, *Enterobacterales*, *Pseudomonadales* s čeľaďou *Moraxellaceae*. Nasledovali kmene: *Cyanobacteria* (18%); *Firmicutes* (12%) až na rad *Lactobacillales*; *Actinobacteriota* (6%) až na triedu *Actinobacteria*; *Bacteroidota* (6%) až na rad *Flavobacteriales*.

Proteobacteria, *Actinobacteriota* a *Bacteroidota* sú kmene baktérií, ktoré sa bežne vyskytujú v syre [12]. Väčšinu rodov baktérií mliečneho kvasenia zahŕňa baktérie patriace do kmeňa *Firmicutes*, ktoré sú prospešné pri fermentácii potravín [13]. Baktérie kmeňa *Patescibacteria* sú nekultivovateľné a nachádzajú sa takmer v každom prostredí [14]. Baktérie kmeňa *Cyanobacteria* sa prirodzene vyskytujú vo vzdušnej biote [15].

Záver

Kultivačnou metódou sme zistili, že vzduch odobraný zo syrárne obsahoval viac baktérií ako vzduch z bryndziarne. Nanopore sekvenovanie a analýza metagenómu nám poskytla pohľad na zloženie mikrobioty v dvoch miestnostiach výroby bryndze a poskytla informácie o bakteriálnych kmeňoch dôležitých pre bezpečnosť výroby bryndze. V našich vzorkách neboli identifikované žiadne sekvencie *Salmonella* alebo *Listeria*, ale kmeň *Proteobacteria* bol najpočetnejší a niektoré druhy tohto kmeňa sú producentmi enterotoxínov a môžu byť nebezpečné a škodlivé pre kvalitu syra.

PodĎakovanie

Táto práca bola financovaná projektom APVV-20-0001. Taktiež bola podporená aj z projektu Európskeho fondu regionálneho rozvoja: 313011V578.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Chebeňová-Turcovská V., Ženišová K., Kuchta T., et al. (2011) Int. J. Food Microbiol. 150(1), p. 73
- [2] Šaková N., Sádecká J., Lejková J., et al., (2015) J. Food Nutr. Res. Slovak. 54, p. 239
- [3] Ozturkoglu-Budak S., Wiebenga A., Bron P.A., et al. (2016) Int. J. Food Microbiol. 237, p. 17
- [4] Čaplová Z., Pangallo D., Kraková L., et al. (2018) J. Food Nutr. Res. 57(2), p. 195
- [5] Yavuz M., Kasavi C. a Öner E.T. (2021) J. Dairy Res. 88(4), p. 461
- [6] Planý M., Pinzari F., Šoltys K., et al. (2021) Int. Biodeterior. Biodegrad. 159, p. 105204
- [7] Bonenfant Q., Noé L., a Touzet H. (2022) bioRxiv. p. 2022
- [8] FastQC [Citované: 27. marec 2023] [<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>](https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/)
- [9] Afgan E., Baker D., Van den Beek M., et al. (2016) Nucleic Acids Res. 44(W1), p. W3
- [10] Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., et al. (2012) Nucleic Acids Res. 41(D1), p. D590
- [11] Ondov B.D., Bergman N.H., a Phillippy A.M. (2011) BMC bioinform. 12(1), p. 1
- [12] Riquelme C., Câmara S., de Lurdes N., et al. (2015) Int. J. Food Microbiol. 192, p. 86
- [13] Parente E., Zotta T., Giavalisco M., et al. (2023) Int. J. Food Microbiol. p. 110124
- [14] Lemos L. N., Medeiros J. D., Andreote F., et al. (2019) Mol. ecol. 28(18), p. 4259
- [15] Chu W. L., Tneh S. Y a Ambu S. (2013) Grana, 52(3), p. 207

Identifikácia vhodných podmienok ovplyvnenia *Schizosaccharomyces pombe* oxidačnými agensami prostredníctvom prietokovej cytometrie

Alexandra Kmeťová, Mária Peťková, Ivana Ďurovcová, Terézia Zajičková, Andrea Ševčovičová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; kmetova96@uniba.sk

Abstract

Identification of *Schizosaccharomyces pombe* treatment conditions with oxidizing agents by flow cytometry

Cells naturally generate reactive species as by-products of cell metabolism. These reactive species can be degraded by many antioxidative mechanisms. Exposure to various chemicals can increase the level of intracellular oxidation and subsequently can lead to an accumulation of reactive species. When their number exceeds that of antioxidants, oxidative damage to cellular macromolecules may occur. Unrepaired and accumulated damage may consequently lead to cell death. In this work, different concentrations of bisphenol A and sodium selenite were used to induce both oxidative stress and cell death. These treatment conditions will serve as a positive control for future flow cytometric analyses. Using specific fluorescent dyes, cells can be divided into three categories – non-stressed live cells, stressed live cells, and dead cells.

Keywords: oxidative stress; cell death; flow cytometry; sodium selenite; bisphenol A

Úvod a formulácia cieľa

Bunky pomocou rôznych povrchových proteínov a receptorov dokážu prijímať signály z vonkajšieho prostredia a reagovať na ne. Ak podmienky nie sú ideálne, dochádza k vzniku stresu. Jedným z typov stresu, ktorý môže vzniknúť vplyvom rôznych environmentálnych faktorov, je oxidačný stres. Oxidačný stres je stav, pri ktorom v bunke dochádza k narušeniu rovnováhy medzi reaktívnymi časticami (ROS) a antioxidantami. ROS vznikajú prirodzene ako vedľajšie produkty metabolizmu a ich úlohou je zabezpečovať bunkovú signalizáciu [1 – 2]. Najväčším producentom ROS v bunke sú mitochondrie, ktoré ich produkujú počas procesu oxidačnej fosforylácie [3].

Antioxidanty (napr. enzymatický antioxidant superoxiddismutáza) vznikajú ako odpoveď na prítomnosť reaktívnych častíc a chránia organizmus pred toxicitou ROS tým, že neutralizujú voľné radikály [4]. Keď sa v tele nachádza viac ROS ako antioxidantov, antioxidačný mechanizmus organizmu ich nestíha degradovať, v dôsledku čoho sa hromadia a vzniká oxidačný stres. Zvýšené množstvo ROS spôsobuje rôzne oxidačné poškodenia makromolekúl akými sú proteíny, lipidy a nukleové kyseliny. Poškodenie týchto štruktúr vedie k zastaveniu bunkového delenia alebo bunkovej smrti [5].

Existuje množstvo agensov, ktoré dokážu v bunkách navodiť oxidačný stres. Medzi

tieto agensy patria napríklad bisfenol A alebo seleničitan sodný. Práve tieto agensy sme vybrali pre naše analýzy, ktorých cieľom bolo identifikovať vhodné podmienky ovplyvnenia použiteľné ako pozitívna kontrola na prietokovú cytometriu. Ideálnym výsledkom pre nás bolo mať po ovplyvnení v každej kategórii (živé s ROS, živé bez ROS, mŕtve bunky) viditeľnú populáciu buniek.

Materiál a metódy

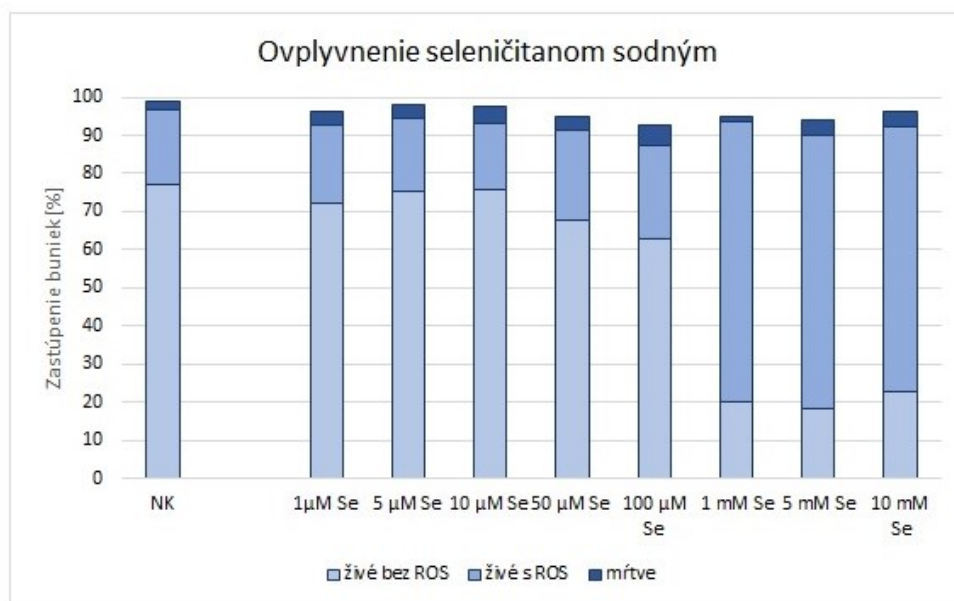
Ako modelový organizmus sme použili kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* štandardný kmeň 972h⁻. Pri optimalizácii ovplyvnenia a hľadani vhodných koncentrácií agensov navodzujúcich oxidačný stres sme vychádzali z dizertačnej práce Ivany Ďurovcovej [6], ktorá vo svojich experimentoch používala pentahydrát seleničitanu sodného (Se) (Sigma Aldrich) a bisfenol A (BPA) (Sigma Aldrich). Zvolili sme ovplyvnenie dlhé 60 minút a rôzne testované koncentrácie (Se – 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 1mM, 5 mM, 10 mM; BPA – 0,1 mM, 0,5 mM, 1mM).

Na ovplyvnenie sme použili 1 ml nočnej kultúry rozrastenej do exponenciálnej fázy ($2 \cdot 10^7$). Bunky sme pred ovplyvnením premyli 50 mM fosfátovým tlmivým roztokom (pH 7,8) a pridali testované agensy. Ovplyvnenie prebiehalo v 1 ml deionizovanej vody (ddH₂O) na termobloku s trepačkou (25°C, 350 otáčok/min). Po ovplyvnení sme bunky premývali fosfátovým tlmivým roztokom a farbili fluorescenčnými farbivami 2', 7'-dichlorodihydrofluoresceín diacetátom (H₂DCFDA, detekcia intracelulárnych ROS) 45 minút pri 30°C a 7-aminoaktinomycínom D (7-AAD, detekcia mŕtvych buniek) 5 minút v ľade.

Výsledky a diskusia

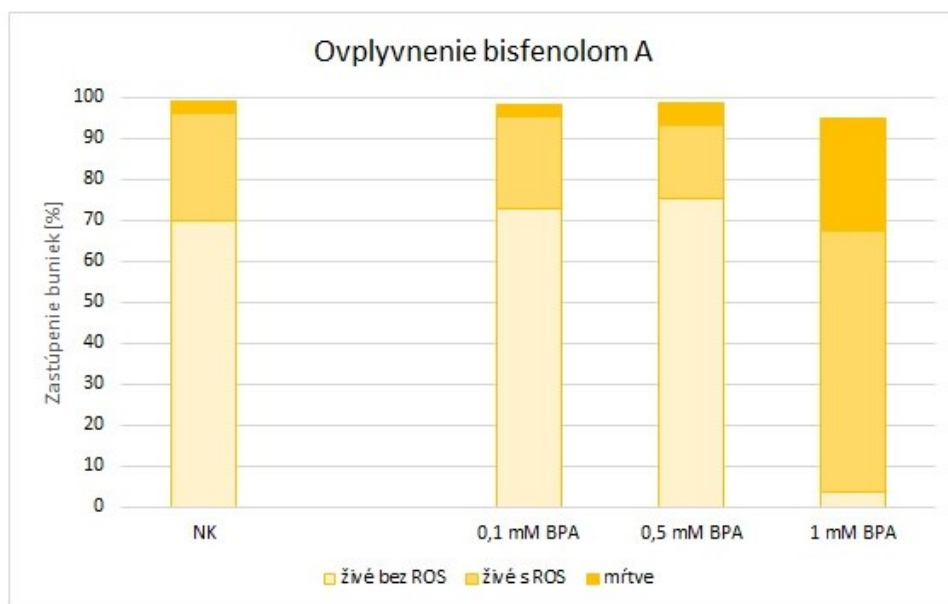
Prvé testované koncentrácie Se – 1 μ M, 5 μ M a 10 μ M, sme prevzali z dizertačnej práce Ivany Ďurovcovej [6], ktorá v experimentoch zameraných na detekciu oxidačného stresu v bunkách *Saccharomyces cerevisiae* používala ako pozitívnu kontrolu 1 μ M Se počas 3-hodinového ovplyvnenia. My sme však skrátili inkubačný čas na 1 hodinu a testovali aj vyššie koncentrácie. V našom prípade sme nepozorovali výrazný nárast intracelulárnych ROS v porovnaní s kontrolou (Obr. 1). Mierny nárast sme pozorovali v prípade mŕtvych buniek, kde v kontrolnej vzorke boli 2 % mŕtvych buniek a v Se ovplyvnených okolo 4 % (1 μ M Se – 4 %; 5 μ M Se – 3,5 %; 10 μ M Se – 4,2 %). Pri vyšších koncentráciách Se, konkrétne 50 μ M a 100 μ M sme zaznamenali mierny nárast percenta buniek s intracelulárnymi ROS na úroveň okolo 25 % a stúplo aj percento mŕtvych buniek na 6 % (Obr. 1). Najvýraznejšie zmeny sme však zaznamenali pri najvyšších testovaných koncentráciách, a to 1 mM, 5 mM a 10 mM Se, kde

až okolo 70 % buniek vykazovalo oxidačný stres (Obr. 1). Keďže sme hľadali jednu látku, ktorá by bola pozitívnou kontrolou nie len pre oxidačný stres, ale aj pre mŕtve bunky, toto ovplyvnenie pre nás nebolo vhodné. Nepozorovali sme totiž výraznejší nárast percenta mŕtvych buniek v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou ani pri jednej testovanej koncentrácii Se.

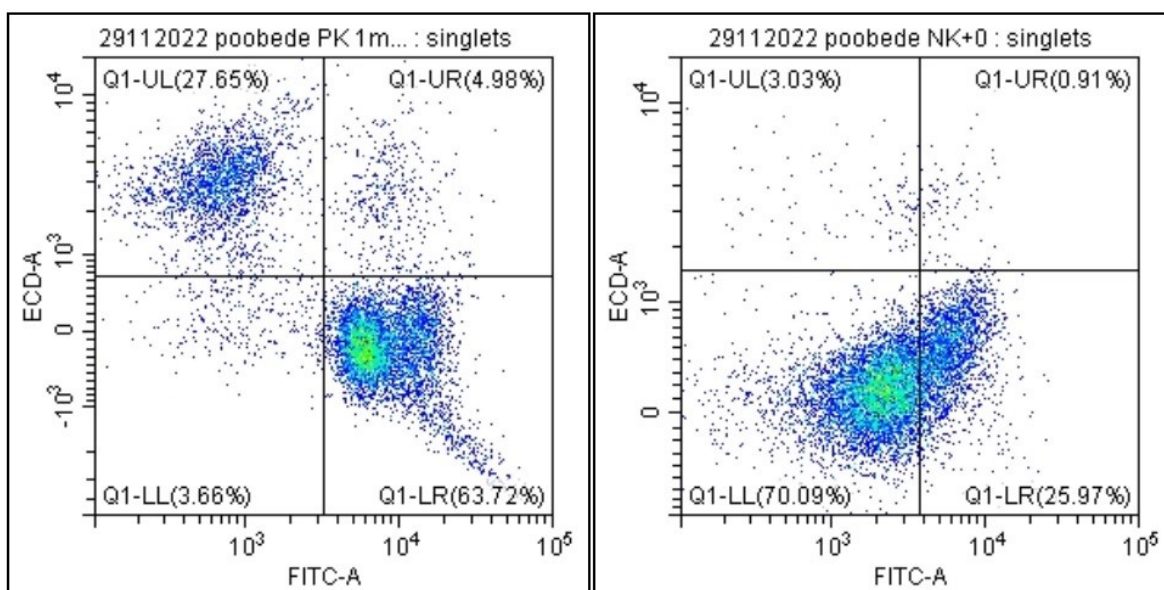


Obr. 1. Zastúpenie buniek v jednotlivých skupinách po ovplyvnení seleničitanom sodným NK – neovplyvnená kontrola; 1µM – 10 mM Se – koncentrácie seleničitanu sodného použité na ovplyvnenie buniek počas 60 minút; živé bez ROS – bunky negatívne na farbivo H₂DCFDA; živé s ROS – bunky pozitívne na farbivo H₂DCFDA; mŕtve – bunky pozitívne na farbivo 7-AAD. Hodnoty pochádzajú z jedného nezávislého experimentu

Ako druhý oxidačný agens sme zvolili BPA. Vychádzali sme z koncentrácií 0,1 mM a 0,5 mM. Ako môžeme vidieť na Obr. 2, pri takomto ovplyvnení sme nepozorovali výrazný nárast buniek v oxidačnom strese v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou, vo všetkých prípadoch bolo v tejto skupine približne 20 % buniek. Pri ovplyvnení 0,5 mM BPA sme však pozorovali mierny nárast percenta mŕtvych buniek v porovnaní s kontrolou (NK – 3,03 %; 0,5 mM BPA – 5,36 %), no tento nárast nebol pre naše experimenty dostatočný. Preto sme skúsili aj vyššiu koncentráciu – 1 mM BPA, pri ktorej sme pozorovali výrazný nárast percenta buniek v skupine živé s ROS na úroveň 64 %, aj v skupine mŕtvych buniek na úroveň 28 % (Obr. 3). Pre ďalšie experimenty bude preto vhodným oxidačným agensom na ovplyvnenie buniek práve 1 mM BPA počas 60 minút v ddH₂O.



Obr. 2. Zastúpenie buniek v jednotlivých skupinách po ovplyvnení bisfenolom A NK – neovplyvnená kontrola; 0,1 mM – 1 mM BPA – koncentrácie bisfenolu A použité na ovplyvnenie buniek počas 60 minút; živé bez ROS – bunky negatívne na farbivo H₂DCFDA; živé s ROS – bunky pozitívne na farbivo H₂DCFDA; mŕtve – bunky pozitívne na farbivo 7-AAD. Hodnoty pochádzajú z jedného nezávislého experimentu



Obr. 3. Zastúpenie živých buniek bez reaktívnych častíc (Q1-LL), s reaktívnymi časticami (Q1-LR) a mŕtvych buniek (Q1-UL) po ovplyvnení 1 mM bisfenolom A Naľavo – bunky ovplyvnené 1mM bisfenolom A (BPA); napravo – neovplyvnené bunky (NK). FITC-A – kanál s vlnovou dĺžkou používanou na meranie fluorescence H₂DCFDA, ECD – kanál s vlnovou dĺžkou používanou na meranie fluorescence 7-AAD

Záver

Z našich výsledkov vyplýva, že vhodnejšou pozitívnou kontrolou pre navodenie vnútrobunkovej oxidácie a umierania buniek *S. pombe* je BPA ako Se. Pri inkubácii kvasiniek

v 1 mM BPA počas 60 minút dochádza k vzniku oxidačného stresu, ktorý spôsobí v určitom percente buniek smrť. Pri takomto ovplyvnení vidíme, že obidve zvolené fluorescenčné farbivá rozdeľujú populáciu buniek do troch kategórií, a to na živé bez reaktívnych častíc, živé s reaktívnymi časticami a mŕtve bunky. Seleničitan sodný, ktorý bol v našich experimentoch tiež testovaný, pri zvolených podmienkach experimentu, nie je vhodným oxidačným agensom. Na navodenie bunkovej smrti u *S. pombe* je potrebný pravdepodobne dlhší expozičný čas ako 60 minút.

PodĎakovanie

Táto práca bola finančne podporená grantami VEGA 1/0460/21 a UK/209/2022.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Halliwell B. (1994) Lancet 344, p. 721
- [2] Thannickal V. J., Fanburg B. L. (2000) Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 279(6), p. L1005
- [3] Inoue M., Sato E. F., Nishikawa M., et al. (2003) Curr. Med. Chem. 10(23), p. 2495
- [4] Halliwell B. (1995) Biochem. Pharmacol. 49(10), p. 1341
- [5] Huang Y. Q., Wong C. K. C., Zheng J. S., et al. (2012) Environ. Int. 42, p. 91
- [6] Ďurovcová I. (2021) Mechanizmy účinku bisfenolu A v bunkách postrádajúcich endokrinný systém. (Dizertačná práca) Univerzita Komenského v Bratislave

Stanovenie zmien vo väzbe manózy na plazmatickej membráne po epididymálnej maturácii, ejakulácii a kapacitácii býčích spermíí

Jana Komárová¹, Vladimíra Kabaňová¹, Jana Antalíková², Katarína Michalková², Ľubica Horovská², Jana Jankovičová², Petra Sečová²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta. Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Ilkovičova 6, 842 15, Bratislava, Slovenská republika; komarova22@gmail.com

²Ústav biochémie a genetiky živočíchov Slovenskej akadémie vied, v.v.i, Centrum biovied, Dúbravská cesta 9, 841 04, Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Determination of mannose-binding changes on the plasma membrane after the epididymal maturation, ejaculation, and capacitation of bull spermatozoa

To be able to fertilize the oocyte, spermatozoa must undergo several maturation processes from their morphological development in the seminiferous tubules, such as maturation in the epididymis, ejaculation, and capacitation. The sperm contains a carbohydrate envelope - glycocalyx, which is modified during maturation processes and plays role in sperm motility, maturation, and interaction sperm with *zona pellucida*. We focused on changes in the profile of mannose residues on the surface of bull spermatozoa isolated from the cauda of the epididymis, ejaculated, and capacitated spermatozoa. In the indirect immunofluorescence assay, we used lectins with different mannose-binding affinity. We observed changes in the binding of *Musa acuminata* lectin, *Canavalia ensiformis* lectin, *Pisum sativum* agglutinin, and *Galanthus nivalis* lectin on the sperm surface of the epididymal spermatozoa after ejaculation and capacitation.

Keywords: sperm; ejaculation; capacitation; glycocalyx; lectins

Úvod a formulácia cieľa

Samčie pohlavné bunky cicavcov, spermie, musia po opustení semenníka, v ktorom dochádza k ich morfológickému vývinu, podstúpiť sériu maturačných procesov zahrňujúcich komplexné fyziologické a morfológické zmeny. Prvým dôležitým procesom po spermatogenéze je epididymálna maturácia, kde zohráva významnú úlohu epididymálna tekutina obsahujúca aj epididymozómy, vezikuly podieľajúce sa na modifikácii membrány spermie [1]. Neskôr počas ejakulácie prichádza spermia do kontaktu so semennou plazmou, ktorej zloženie prispieva k jej ďalšej modifikácii [2]. Aby bola spermia schopná oplodniť oocyt (väzby a fúzia), musí prejsť ešte procesmi kapacitácie a akrozómovej reakcie, kedy dochádza ku komplexným modifikáciám proteínov a lipidov membrány [3].

Počas týchto maturačných procesov dochádza aj k významným modifikáciám membránového glykokalyxu, povrchovej vrstvy glykoproteínov a glykolipidov. Tým že sa glykokalyx zúčastňuje množstva procesov a interakcií, je jeho zloženie veľmi dôležité vo všetkých štádiách vývoja a maturácie spermie. Významnú úlohu na modifikácii glykokalyxu zohrávajú svojou prítomnosťou aj enzýmy glykozyltransferázy a glykozidázy

v epididymálnej tekutine, ejakuláte, či v sekrétoch samičieho pohlavného traktu [4]. Prítomnosť manózových glykánov na spermiách je druhovo špecifická a bola popísaná na povrchu spermií u človeka [5], kanca [6], či byvola [7]. Bola publikovaná ich pravdepodobná funkcia v procese interakcie spermie so zónou pellucidou oocyту a do určitej miery v procesoch akrozómovej reakcie [8].

Jednou z možností analýzy glykokalyxu je využitie lektínov, proteínov neimunitného pôvodu s vysokou afinitou voči špecifickým sacharidovým štruktúram [9].

Cieľom našich experimentov bolo zamerať sa na sledovanie zmien vo väzbe manózy na povrchu býčích spermií po epididymálnej maturácii, ejakulácii a následne aj po kapacitácii za použitia lektínov: *Pisum sativum* aglutinín (PSA), *Canavalia ensiformis* lektín (Con A), *Musa acuminata* lektín (BanLec) a *Galanthus nivalis* lektín (GNL).

Materiál a metódy

V experimentoch boli použité spermie izolované z chvostovej časti nadsemenníka býkov získaných z bitútku v Malej Mači a ejakulované býčie spermie zo Slovenských biologických služieb v Lužiankach. Časť ejakulovaných spermií sme po oddelení od semennej plazmy *in vitro* kapacitovali inkubáciou v kapacitačnom SP-TL médiu (Minitüb Slovakia s.r.o.) doplnenom o 6 mg.ml⁻¹ BSA, 0,02 mol.l⁻¹ pyruvátu sodného a 0,5 mg.ml⁻¹ gentamicínu, po dobu 4 h v termostate (Binder) pri teplote 39 °C a 5% obsahom CO₂ vo vlhkej atmosfére.

Na stanovenie sacharidového profilu na povrchu býčích spermií sme využili nepriamy imunofluorescenčný test s využitím lektínov, preferenčne viažucich manózové sacharidové zvyšky: PSA, Con A, BanLec a GNL (Tab. 1.). Spermie z každej skupiny sme nariedili na koncentráciu 5.10⁷.ml⁻¹, fixovali 10 minút v 4% roztoku paraformaldehydu a premyli 2-krát v PBS centrifugáciou pri 250 x g 5 minút. Po rozdelení do mikroskúmaviiek sme vzorky inkubovali s lektínmi vo výslednej koncentrácii 1 µg.ml⁻¹ v tme 30 minút pri laboratórnej teplote. Vzorky sme premyli 3-krát 5 minút v PBS a v malom množstve naniesli na podložné sklíčko. Fixovali sme ich vymrazenou zmesou acetón-metanolu (1:1) 5 minút, následne premyli 3-krát 5 minút v PBS, prevrstvili montovacím médiom Fluoroshield s DAPI (Abcam), a hodnotili pod epifluorescenčným mikroskopom Leica DM5500 B pri 400 násobnom zväčšení kamerou Leica DFC340 FX. Snímky boli spracované programom Leica Advanced Fluorescence. Výsledky predstavujú priemer zo 4 vzoriek pochádzajúcich z dvoch opakovaní experimentu ± SEM.

Tab. 1. Prehľad sacharidových zvyškov, ku ktorým majú jednotlivé lektíny väzbovú afinitu

Lektín	Preferenčné väzba sacharidových zvyškov
<i>Musa acuminata</i> lektín (BanLec)	Vnútorne a terminálne α -1,3-manózoové /glukózoové zvyšky
<i>Canavalia ensiformis</i> lektín (Con A)	Terminálne α -manózoové zvyšky
<i>Galanthus nivalis</i> lektín (GNL)	α -1,3/6-manózoové zvyšky
<i>Pisum sativum</i> lektín (PSA)	α -manózoové zvyšky s prítomnou fukózou na N-acetylglukozamíne

Výsledky a diskusia

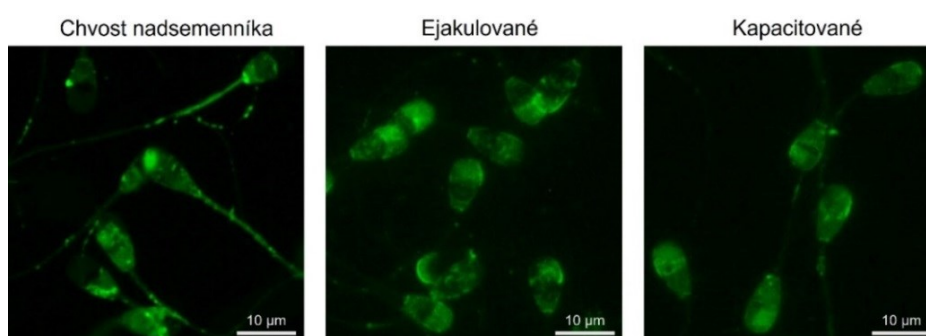
Nepriamou imunofluorescenčnou metódou sme identifikovali 5 typov reakčných vzorov väzby lektínu na plazmatickú membránu hlavičky spermie (Tab. 2.) a v niektorých prípadoch aj na bičik.

Tab. 2. Schémy reakčných vzorov väzby lektínov na hlavičke spermie. Hodnoty predstavujú percentuálne zastúpenie reakčných vzorov spermíí $\pm$ SEM. Zvýraznené hodnoty zelenou farbou a tučným písmom predstavujú dominantný reakčný vzor v rámci jednej skupiny spermíí. Typ 1: celý povrch hlavičky, typ 2: celý povrch akrozómu, typ 3: povrch akrozómu a zároveň časť postekvatoriálneho segmentu, typ 4: celý postekvatoriálny segment, typ 5: bez reakcie

	Reakčná schéma	Typ 1	Typ 2	Typ 3	Typ 4	Typ 5
Lektín	Skupina spermíí					
BanLec	Chvostové	37,47 % $\pm$ 1,88	-	17,77 % $\pm$ 3,32	39,03 % $\pm$ 1,27	5,73 % $\pm$ 0,49
	Ejakulované	76,20 % $\pm$ 2,06	-	19,78 % $\pm$ 0,93	-	4,03 % $\pm$ 2,36
	Kapacitované	91,13 % $\pm$ 1,14	-	5,65 % $\pm$ 0,81	1,98 % $\pm$ 0,76	1,25 % $\pm$ 1,25
ConA	Chvostové	30,98 % $\pm$ 2,2	-	5,68 % $\pm$ 0,51	60,95 % $\pm$ 2,15	2,4 % $\pm$ 0,62
	Ejakulované	47,58 % $\pm$ 2,56	-	19,95 % $\pm$ 1,67	25,8 % $\pm$ 1,49	6,68 % $\pm$ 1,52
	Kapacitované	54,18 % $\pm$ 1,1	-	14,88 % $\pm$ 1,33	27,18 % $\pm$ 0,84	3,78 % $\pm$ 1,78
GNL	Chvostové	-	90 % $\pm$ 1,1	-	-	2 % $\pm$ 2
	Ejakulované	-	93,7 % $\pm$ 2,16	-	-	6,63 % $\pm$ 2,49
	Kapacitované	-	98,23 % $\pm$ 1,77	-	-	1,77 % $\pm$ 1,77
PSA	Chvostové	27,78 % $\pm$ 2,83	41,75 % $\pm$ 2,86	-	12,18 % $\pm$ 1,98	22,3 % $\pm$ 6,17
	Ejakulované	-	84,67 % $\pm$ 1,43	-	-	15,3 % $\pm$ 1,43
	Kapacitované	4,13 % $\pm$ 0,22	94,2 % $\pm$ 1,76	-	-	1,67 % $\pm$ 1,67

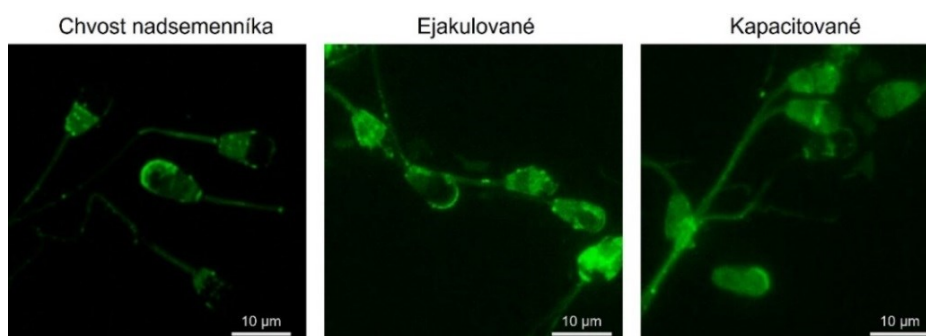
Lektínom BanLec sme na spermíách z chvosta nadsemenníka identifikovali reakciu

na bičíku a prevládajúcu väzbu na postekvatoriálnom segmente (typ 4, $39 \% \pm 1,27$), a na celej hlavičke (typ 1, $37,47 \% \pm 1,89$), do značnej miery bola pozorovaná aj reakcia na celej hlavičke bez ekvatoriálnej oblasti (typ 3, $17,77 \% \pm 3,32$). Na ejakulovaných spermiiach sme pozorovali zmenu, s prevahou väzby typu 1 na celej hlavičke ($76,2 \% \pm 2,06$) a v malom podiele typu 3 na celej hlavičke bez ekvatoriálnej oblasti ($19,78 \% \pm 0,93$). Po kapacitácii spermii sme pozorovali výrazne dominantné zastúpenie väzby na celej hlavičke (typ 1, $91,13 \% \pm 1,14$) (Obr. 1.).



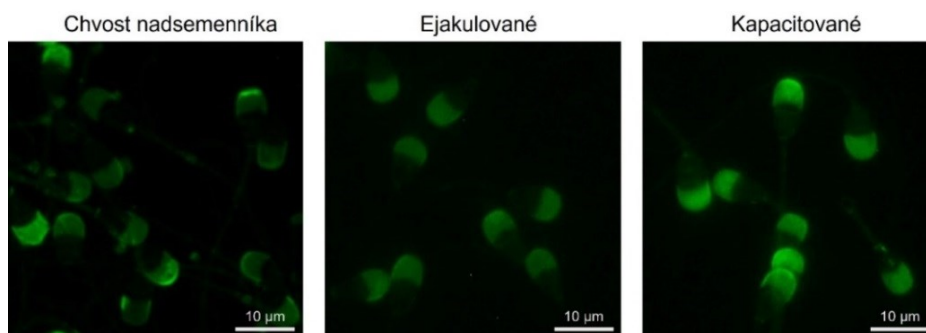
Obr. 1. Reprezentatívne obrázky väzby BanLec na jednotlivé skupiny spermii

Lektín Con A, podobne ako BanLec, sa okrem bičíka dominantne viazal na spermiiach z chvosta nadsemenníka v postekvatoriálnom segmente (typ 4, $60,95 \% \pm 2,15$) a menšej miere na celej hlavičke (typ 1, $30,98 \% \pm 2,2$). Po ejakulácii však pozorujeme zmenu zastúpenia dominantného typu väzby lektínu na typ 1 ($47,58 \% \pm 2,56$) a typ 4 ($25,8 \% \pm 1,49$). Po kapacitácii nedošlo k výrazným zmenám (typ 1, $54,18 \% \pm 1,1$ a typ 4, $27,18 \% \pm 0,83$) (Obr. 2.). Oba lektíny, BanLec a Con A, však okrem manózových zvyškov do určitej miery viažu aj glukózové zvyšky, čo čiastočne vysvetľuje ich podobný reakčný vzor, zároveň rozdielny od ďalších použitých lektínov.



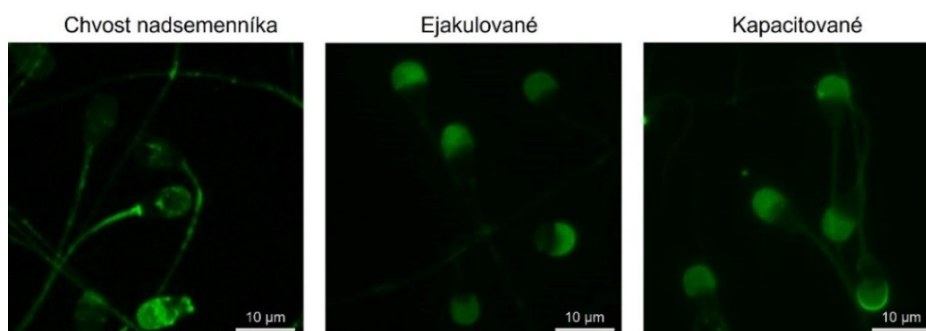
Obr. 2. Reprezentatívne obrázky väzby Con A na jednotlivé skupiny spermii

GNL lektín je špecifický väzbou iba na manóзовé zvyšky. Vo všetkých testovaných skupinách spermií sme zaznamenali prevažujúcu väzbu na celom povrchu akrozómu (typ 2) na spermiách z chvosta nadsemenníka ($90 \% \pm 1,1$), na ejakulovaných spermiách ($93,7 \% \pm 2,16$), a takisto aj na kapacitovaných spermiách ($98,23 \% \pm 1,77$). Môžeme teda predpokladať, že tento typ α -1,3/6-manóзовej väzby na hlavičke býčích spermií sa počas ich maturácie výrazne nemení (Obr. 3.).



Obr. 3. Reprezentatívne obrázky väzby GNL na jednotlivé skupiny spermií

Lektínom PSA okrem terminálnych manóзовých zvyškov zachytávame aj fukózové zvyšky na N-acetylglukozamíne. Na spermiách z chvosta nadsemenníka sme pozorovali reakciu na bičiku, väzbu na celej oblasti akrozómu (typ 2, $41,75 \% \pm 2,86$) a aj vysoký podiel reakcie na celom povrchu hlavičky (typ 1, $23,78 \% \pm 2,83$) a spermií bez reakcie (typ 5, $22,3 \% \pm 6,17$). Ejakuláciou opäť došlo k zmene a prevládajúcim reakčným vzorom bol typ 2 na celom povrchu akrozómu ($84,67 \% \pm 1,43$). Na kapacitovaných spermiách bol pozorovaný podobný trend (typ 2, $94,2 \% \pm 1,76$) (Obr. 4.).



Obr. 4. Reprezentatívne obrázky väzby PSA na jednotlivé skupiny spermií

Zmeny reakčného vzoru jednotlivých lektínov odrážajú modifikáciu glykokalyxu na povrchu hlavičky spermií z chvostovej časti nadsemenníka vplyvom epididymálnej tekutiny

a na ejakulovaných spermiách zase vplyvom zložiek semennej plazmy. Rozdiely v reakčných vzoroch sú spôsobené aj rozdielnou väzbovou špecificitou daných lektínov. V prípade lektínov, ktoré viažu aj manóзовé aj glukózové zvyšky, sme pozorovali väzbu v oblasti celej hlavičky a v prípade lektínov viažucich prevažne manóзовé zvyšky len v oblasti akrozómu. Viaceré štúdie potvrdili prítomnosť manóзовých zvyškov na spermiách a bola popísaná aj ich spojitosť s plodnosťou v závislosti od sezónnosti rozmnožovania u byvola [7] a kanca [6], ale takisto s mierou plodnosti u človeka [5]. V našich experimentoch sme pozorovali zastúpenie rôznych reakčných vzorov epididymálnych a ejakulovaných spermií v závislosti od špecificity väzby použitého lektínu. Zmeny v dôsledku kapacitácie sme nezaznamenali. Na zistenie ich prípadnej funkcie po ejakulácii a kapacitácii sú potrebné ďalšie analýzy.

Záver

Zmeny reakčného vzoru jednotlivých lektínov dokumentujú modifikáciu glykokalyxu ejakulovaných spermií z hľadiska väzby manózy pravdepodobne vplyvom semennej plazmy. Vzhľadom k širšej špecificite niektorých aplikovaných lektínov nemožno vylúčiť ani zmeny vo väzbe glukózových, či fukózových zvyškov.

PodĎakovanie

Realizácia bola finančne podporená grantmi VEGA-2/0027/20 a APVV-19-0111.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Dacheux J. L., Belghazi M., Lanson Y., et al. (2006) Hum. Reprod. Update. 22(5), p. 574
- [2] Samanta L., Parida R., Dias TR., et al. (2018) Reprod. Biol. Endocrinol. 16(1), p. 41
- [3] Setiawan H., Chuammitri P., Sringarm K., et al. (2022) Vet. Integr. Sci. 20(2), p. 331
- [4] Tecle E., Gagneux P. (2015) Mol. Reprod. Dev. 82(9), p. 635
- [5] Gómez-Torres M. J., Robles-Gómez L., Huerta-Retamal N., et al. (2020) Microsc. Microanal. 26(6), p. 1220
- [6] Jiménez I., Gonzalez-Marquez H., Ortiz R., et al. (2002) Arch. Androl. 48(2), p. 159
- [7] Accogli G., Lacalandra G. M., Aiudi G., et al. (2017) Animal. 11(10), p. 1807
- [8] Rosano G., Caille A. M., Gallardo-Ríos M., et al. (2007) Reprod. Biomed. Online. 15(2), p. 182
- [9] Bojar D., Meche L., Meng G., et al. (2022) ACS. Chem. Biol. 17(11), p. 2993

Efekt ochorenia COVID-19 na kvalitu a hustotu kostí

Viktória Kovalčíková, Darina Falbová, Lenka Vorobeľová, Barbara Matzenauerová,
Dominika Lechmanová, Frederika Hanuliaková

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra antropológie,
Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
kovalcikova23@uniba.sk*

Abstract

The effect of the COVID-19 pandemic on bone quality and density

This study focused on the effect of the COVID-19 pandemic on bone quality in a group of students at the Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava. The studied sample consisted of 773 young adults with a mean age of 21.57 ± 2.31 years. Data were collected between February 2019 and December 2022. The obtained data were processed in Microsoft Excel and IBM SPSS. The results of the study showed statistically significant differences between the pre-pandemic and pandemic groups of male and female probands, with statistically significant lower values of the parameters SOS, T-score and Z-score. The impact of the pandemic on individual parameters was also confirmed by regression analysis. Statistically significant differences were also found in the group of women whose measurements took place before and after overcoming the disease of COVID-19. The values of SOS, T-score and Z-score were statistically significantly lower after overcoming COVID-19.

Keywords: COVID-19; mineral bone density; T-score; Z-score, SOS

Úvod a formulácia cieľa

Kvalitou kostí označujeme súhrn všetkých faktorov, ktoré určujú, ako dobre môže kostra odolávať zlomeniu [1]. Existujú tri primárne faktory, ktoré ovplyvňujú kostnú prestavbu a tým aj samotnú minerálnu hustotu kostí, a to hormonálny stav organizmu, záťažová fyzická aktivita a príjem vitamínov či minerálov zo stravy, a to najmä vitamínu D a vápnika [2].

SARS-CoV-2 môže do určitej miery ovplyvniť vývin kostného metabolizmu, a to do štádia, kedy zhoršuje už existujúce základné kostné ochorenie a aj samotný metabolizmus kostí [3]. Existuje viacero potenciálnych mechanizmov, ktorými ochorenie COVID-19 môže ovplyvniť kostrový systém. Podstata prvého potenciálneho mechanizmu spočíva v tom, že keď COVID-19 pôsobí na ACE2, tak jeho expresia je znížená, čím sa zoslabí aj kaskáda ACE2/Ang-(1-7)/MasR, čo spôsobuje nevyváženú homeostázu kostí a urýchlenie procesu osteoklastogenézy a osteoblastogenézy. U pacientov trpiacich ochorením COVID-19 sa zistilo vysoké množstvo zápalových cytokínov, čo sú faktory, ktoré môžu hrať úlohu v rôznych aspektoch osteoklastogénnej dráhy (tvorba osteoklastov na zvýšenie resorpčnej kapacity kosti). Infekcia COVID-19 napadá imunitný systém s následným znížením počtu lymfocytov v periférnej krvi, najmä T a B buniek. T bunky sú následne aktivované, čo vedie k uľahčeniu diferenciácie osteoklastov, ktoré degradovali kostnú matricu a následnej deštrukcii kosti [4].

Cieľom našej štúdie je zistenie súvislostí v hodnotách minerálnej kostnej denzity medzi skupinami probandov pred prepuknutím pandémie ochorenia COVID-19 a po jej prepuknutí. Taktiež zistenie efektu ochorenia COVID-19 na minerálnu kostnú denzitu v skupine probandov, ktorí boli meraní pred a následne aj po prekonaní ochorenia.

Materiál a metódy

Sledovaný súbor pozostával zo 773 jedincov. Na základe výskumnej otázky bol súbor následne rozdelený na viacero skupín (tab. 1).

Tab.1. Charakteristika sledovaného súboru N – počet jedincov, SD – smerodajná odchýlka

	N	Priemerný vek ($\pm$ SD)		N	Priemerný vek ($\pm$ SD)
Celkový súbor	773	21,57 $\pm$ 2,31	MUŽI	221	22,23 $\pm$ 2,45
			ŽENY	552	21,30 $\pm$ 2,20
Predpandemický súbor	408	22,34 $\pm$ 2,29	MUŽI	153	22,75 $\pm$ 2,40
			ŽENY	255	22,10 $\pm$ 2,19
Pandemický súbor	365	20,70 $\pm$ 2,01	MUŽI	68	21,04 $\pm$ 2,13
			ŽENY	297	20,62 $\pm$ 1,97
Klinická skupina	233	20,73 $\pm$ 2,05	MUŽI	43	21,27 $\pm$ 2,19
			ŽENY	190	20,61 $\pm$ 2,00
Porovnávací skupina	132	20,64 $\pm$ 1,93	MUŽI	25	20,64 $\pm$ 1,99
			ŽENY	107	20,64 $\pm$ 1,92
Opakované meranie	25	19,96 $\pm$ 1,24	MUŽI	6	19,66 $\pm$ 1,00
			ŽENY	19	20,05 $\pm$ 1,19

Zber dát bol realizovaný v období od februára 2019 do decembra 2022 na Katedre antropológie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave. Samotný zber dát tvorilo viacero aspektov, a to vyplnenie dvoch dotazníkov, antropometrické merania, ktoré zahŕňali merania telesnej výšky merané pomocou metodiky Martina a Sallera [5], merania parametrov zloženia tela (obsah minerálov v kostiach) a telesnej hmotnosti pomocou prístroja InBody 770 a merania parametrov kostnej denzity (Z-skóre, T-skóre, SOS – Speed of sound) pomocou sondy prístroja Sunlight MiniOmni. Hodnoty T-skóre sú rozdelené do troch skupín, a to hodnoty $> -1,0$ SD sú považované za normálne, od $-1,0$ až $-2,5$ SD za osteopenické a $< -2,5$ SD za osteoporotické. Namerané hodnoty Z-skóre $< -1,0$ SD sú považované za normálne a hodnoty $< -2,0$ SD predstavujú zníženú minerálnu kostnú hustotu. Získané údaje a namerané dáta boli uvádzané do celkovej databázy v programe Microsoft Excel 2022 (verzia 16.68). Štatisticky vyhodnocované boli následne v programe IBM SPSS Statistics (verzia 20). Normalita dát bola otestovaná Kolmogorov-Smirnovým testom. Následne boli premenné s normálnou distribúciou dát analyzované dvoj výberovým nezávislým T-testom alebo párovým T-testom a pre premenné s nie normálnou distribúciou bol použitý Mann-Whitneyov

U-test alebo jednovýberový Wilcoxonov test. Okrem iného sme zisťovali vplyv nezávislých premenných na závislé premenné pomocou tzv. „stepwise“ metódy v rámci regresnej analýzy. Za štatisticky signifikantné sme považovali hodnoty na hladine významnosti $\alpha = 0,05$ s hodnotou významnosti $p < 0,05$. Biomedicínsky výskum je schválený etickou komisiou s číslom ECH19021.

Výsledky a diskusia

Pri porovnaní hodnôt SOS, T-skóre, Z-skóre a obsahu minerálov v kostiach medzi predpandemickou a pandemickou skupinou probandov (tab. 2) sme zistili štatisticky signifikantné rozdiely u žien v priemerných hodnotách SOS ($p < 0,001$), T-skóre ($p < 0,001$) a Z-skóre ($p < 0,001$) a u mužov v priemerných hodnotách SOS ($p < 0,001$), T-skóre ($p = 0,001$) a Z-skóre ($p = 0,001$). Ženy aj muži mali štatisticky významne nižšie priemerné hodnoty SOS, T-skóre a Z-skóre počas obdobia pandémie COVID-19. Pri sledovaní priemerných hodnôt obsahu minerálov v kostiach sa u žien ani u mužov nepreukázali štatisticky významné rozdiely.

Tab. 2. Porovnanie minerálnej hustoty kostí predpandemickej a pandemickej skupiny žien a mužov
N – počet jedincov, SD – smerodajná odchýlka, p – hodnota významnosti, SOS – Speed of sound, m/s – meter za sekundu, kg – kilogram

	Pred pandémiou			Počas pandémie			p
	N	Priemer	SD	N	Priemer	SD	
ŽENY							
SOS (m/s)	253	4099,360	104,660	295	4037,840	129,610	<0,001
T-skóre (SD)	253	-0,708	1,067	295	-1,223	1,092	<0,001
Z-skóre (SD)	253	-0,067	1,055	295	-0,658	1,030	<0,001
Obsah minerálov v kostiach (kg)	253	2,601	0,314	295	2,640	0,329	0,290
MUŽI							
SOS (m/s)	152	4045,620	144,179	68	3980,260	103,403	<0,001
T-skóre (SD)	152	-0,582	0,999	68	-1,034	0,842	0,001
Z-skóre (SD)	152	-0,229	0,982	68	-0,694	0,823	0,001
Obsah minerálov v kostiach (kg)	152	3,730	0,589	68	3,599	0,561	0,128

Regresnou analýzou (tab. 3) boli zistené nezávislé premenné, ktoré štatisticky významne ovplyvnili hodnoty SOS, T-skóre a Z-skóre ako u žien, tak aj u mužov. Vo všetkých sledovaných závislých premenných nezávislý efekt preukázala pandémia, čo potvrdilo predchádzajúce výsledky. U žien sa so štatistickou významnosťou u SOS, T-skóre a Z-skóre ako nezávislé premenné ukázali aj vek a užívanie vitamínu D, pre Z-skóre aj kofeín. U mužov bol pri všetkých závislých premenných preukázaný nezávislý efekt pandémie a veku. Pričom

pandémia preukázala znižujúci efekt a vek, užívanie vitamínu D či kofeín preukázali naopak zvyšujúci efekt. Regresnou analýzou sa v súbore žien a mužov nepotvrdil efekt fyzickej aktivity na parametre kostnej denzity. Opakom je štúdia Ruiz-Roso et al. [6], v ktorej pri porovnaní úrovni fyzickej aktivity z oboch období, teda pred a počas pandémie muži, ako aj ženy výrazne zvýšili dobu nečinnosti a inaktivity počas obdobia pandémie. Podobne aj štúdia Rossi et al. [7] ukázala silné dôkazy o negatívnom vplyve obmedzení COVID-19 pri fyzickej aktivite.

Tab. 3. Regresná analýza vybraných parametrov u mužov a žien B – parciálny regresný koeficient, SD – smerodajná odchýlka, p – hodnota významnosti, R² – koeficient determinácie, SOS – Speed of sound, CI – Interval spoľahlivosti, m/s – meter za sekundu

Závislé premenné	Nezávislé premenné	B	CI (95 %)	SD	p	R ²	Durbin- Watson	Tolerancia
ŽENY								
SOS (m/s)	pandémia	-30,982	-53,036 – -8,928	11,226	0,006	0,127	1,850	0,796
	vek	13,293	8,578 – 18,008	2,400	<0,001			0,887
	vitamín D	31,841	9,084 – 54,598	11,584	0,006			0,870
T-skóre (SD)	pandémia	-0,206	-0,404 – -0,009	0,101	0,041	0,139	1,851	0,796
	vek	0,147	0,105 – 0,189	0,022	<0,001			0,887
	vitamín D	0,250	0,046 – 0,455	0,104	0,016			0,870
Z-skóre (SD)	pandémia	-0,377	-0,572 – -0,181	0,100	<0,001	0,120	1,901	0,796
	vek	0,096	0,054 – 0,138	0,021	<0,001			0,882
	vitamín D	0,207	0,005 – 0,409	0,103	0,044			0,868
	kofeín	0,215	0,002 – 0,429	0,109	0,048			0,993
MUŽI								
SOS (m/s)	pandémia	-48,083	-87,759 – -8,406	20,127	0,018	0,114	1,838	0,904
	vek	14,100	6,492 – 21,709	3,860	<0,001			0,904
T-skóre (SD)	pandémia	-0,313	-0,590 – -0,036	0,140	0,027	0,135	1,918	0,904
	vek	0,117	0,064 – 0,170	0,027	<0,001			0,904
Z-skóre (SD)	pandémia	-0,369	-0,646 – -0,092	0,140	0,009	0,110	1,961	0,904
	vek	0,090	0,037 – 0,143	0,027	0,001			0,904

Pri porovnaní hodnôt SOS, T-skóre, Z-skóre a obsahu minerálov v kostiach medzi porovnávacou a klinickou skupinou probandov (tab. 4) sme zistili štatisticky signifikantné rozdiely iba u mužov, a to len v priemerných hodnotách obsahu minerálov v kostiach ($p = 0,011$), pričom jednotlivé priemerné hodnoty boli štatisticky významne nižšie v porovnávacej skupine.

Tab. 4. Porovnanie minerálnej hustoty kostí porovnávacej a klinickej skupiny žien a mužov N – počet jedincov, SD – smerodajná odchýlka, p – hodnota významnosti, SOS – Speed of sound, , m/s – meter za sekundu, kg – kilogram

	Prekonali COVID-19			Neprekonali COVID-19			p
	N	Priemer	SD	N	Priemer	SD	
ŽENY							
SOS (m/s)	188	4038,010	141,077	106	4037,560	106,918	0,927
T-skóre (SD)	188	-1,186	1,068	106	-1,288	1,135	0,535
Z-skóre (SD)	188	-0,624	1,011	106	-0,719	1,065	0,560
Obsah minerálov v kostiach (kg)	188	2,656	0,322	106	2,611	0,340	0,110
MUŽI							
SOS (m/s)	43	3980,860	105,485	25	3979,200	101,857	0,951
T-skóre (SD)	43	-1,014	0,857	25	-1,068	0,832	0,801
Z-skóre (SD)	43	-0,721	0,825	25	-0,648	0,833	0,727
Obsah minerálov v kostiach (kg)	43	3,729	0,551	25	3,375	0,514	0,011

Pri porovnaní hodnôt SOS, T-skóre a Z-skóre u probandov pred a po prekonaní ochorenia COVID-19 (tab. 5) sme zistili štatisticky signifikantné rozdiely iba u žien, a to v priemerných hodnotách SOS ($p = 0,004$), T-skóre ($p = 0,005$) a Z-skóre ($p = 0,006$).

Tab. 5. Porovnanie minerálnej hustoty kostí skupiny žien a mužov pred a po prekonaní ochorenia COVID-19 N – počet jedincov, SD – smerodajná odchýlka, p – hodnota významnosti, SOS – Speed of sound, , m/s – meter za sekundu

	Meranie pred ochorením			Meranie po prekonaní ochorenia			p
	N	Priemer	SD	N	Priemer	SD	
ŽENY							
SOS (m/s)	19	4044,680	90,516	19	3941,680	262,728	0,004
T-skóre (SD)	19	-1,226	0,931	19	-1,832	1,387	0,005
Z-skóre (SD)	19	-0,642	0,924	19	-1,126	1,371	0,006
MUŽI							
SOS (m/s)	6	3947,500	118,033	6	3974,330	154,097	0,752
T-skóre (SD)	6	-1,317	0,949	6	-1,117	1,242	0,684
Z-skóre (SD)	6	-0,917	0,949	6	-0,700	1,246	0,686

Ženy mali štatisticky významne nižšie priemerné hodnoty sledovaných parametrov po prekonaní ochorenia COVID-19. U mužov sa nepotvrdil štatisticky významný vzťah medzi sledovanými parametrami kostnej denzity a prekonania COVID-19. K podobným záverom prišla aj štúdia Berktaş et al. [8], v ktorej sa uvádza, že priemerná minerálna hustota kostí bola významne nižšia po prekonaní ochorenia COVID-19 ako pri jeho diagnóze. Veľkosť poklesu kostnej denzity sa medzi pohlaviami významne nelíšila a významne nekorelovala ani s vekom pacienta. Aj Awosanya et al. [9] poukázali na to, že v modeli *in vitro* aj po krátkom čase od nakazenia vírusu SARS-CoV-2 boli zaznamenané zmeny v kostnej štruktúre, a to aj u jedincov s ľahším, ale aj ťažším priebehom ochorenia.

Záver

V tejto štúdii sme zistili štatisticky signifikantne nižšie hodnoty parametrov SOS, T-skóre, ako aj Z-skóre medzi predpandemickou a pandemickou skupinou žien a mužov, ale aj v súbore žien, ktorých merania prebehli pred a po prekonaní ochorenia COVID-19. Z výsledkov našej pilotnej štúdie je zjavný negatívny vplyv pandémie ochorenia COVID-19 na minerálnu hustotu kostí. Pre bližšiu špecifikáciu jednotlivých faktorov spôsobujúcich danú skutočnosť je však potrebný rozsiahlejší výskum. Získané výsledky týkajúce sa zníženej hustoty kostí po prekonaní ochorenia COVID-19 je možné použiť aj v klinickej praxi, a to najmä pri rekonvalescencii pacienta so zameraním na zdravie kostí.

PodĎakovanie

Táto publikácia je výsledkom realizácie projektov: KEGA 046UK-4/2023 a Vedeckého parku Univerzity Komenského v Bratislave podporeného z Operačného programu Výskum a vývoj financovaného z ERDF. [Grant number: ITMS 26240220086, ITMS2014p: 313021D075].

Zoznam použitej literatúry

- [1] Licata A. (2009) Cleve. Clin. J. Med. 76(6), p. 1415
- [2] Nichols D. L., Sanborn CH. F., Essery E. V. (2007) Sports. Med. 37(11), p. 1001
- [3] Tao H., Ge G., Li W., et al. (2020) Med. Hypothesis. 145, e110332
- [4] Zheng K., Zhang W-C., Xu Y-Z., et al. (2020) Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 24(20), p. 10316
- [5] Martin R., Saller K. (1957) Lehrbuch der Anthropologie in systematischer Darstellung Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Nemecko, p. 104
- [6] Ruiz-Roso M. B., Knott-Torcal C., Matilla-Escalante D. C., et al. (2020) Nutrients. 12(8), p. 2327
- [7] Rossi L., Behme N., Breuer Ch. (2021) Int. J. Environ. Res. Public Health. 18(21), p. 11440
- [8] Berktaş B. M., Gokces, A., Hoca, N. T., et al. (2022) Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 26(8), p. 3046
- [9] Awosanya O. D., Dalloul CH. E., Blosser R. J., et al. (2021) Bone. 154, e116227

Meranie hrúbky mäkkých tkanív tváre pomocou ultrazvuku a sledovanie vplyvu BMI a telesnej hmotnosti na merané hodnoty

Zuzana Kozáková, Radoslav Beňuš

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra antropológie,
Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15, Bratislava, Slovenská republika;
kozakova77@uniba.sk*

Abstract

Measurement of facial soft tissue thickness by ultrasound and the influence of BMI and body weight on the measured values

The aim of this study was to measure and analyze the thickness of facial soft tissues in relation to BMI and body weight. 97 females (20-85 years) and 57 males (20-87 years) participated in the study and were measured with the LOGIQ e R7 ultrasound scanner, set to B-mode at a frequency of 20 MHz, in both supine and upright positions, which allowed comparison of the influence of gravity. Intersexual differences between the measured subjects were measured only in the middle of the philtrum, where the P value was less than 0.01. We investigated whether soft tissue thickness was influenced by body weight and BMI. We demonstrated that there was a relatively strong correlation between BMI and the measured anthropometric landmarks (glabella - 0.508). The only landmark where no correlation with BMI was found was the middle philtrum, where the correlation coefficient reached negative values (- 0.015 and - 0.051).

Keywords: *facial soft tissue thickness; BMI; body weight*

Úvod a formulácia cieľa

Hlavným objektom výskumov antropológov v minulosti bola lebka, ktorá predstavovala najzaujímavejší a najpodstatnejší zdroj informácií [1]. Ľudské telo bolo skúmané dlhé stáročia. Spočiatku iba pomocou jednoduchých opisov a meraní, neskôr pomocou antropometrie, pomerne jednoduchej, no spoľahlivej metodiky pre získavanie kvantitatívnych parametrov ľudského tela [2]. Vylepšenia a pokrok v zobrazovacích technikách viedli k zlepšeniu kvality meraní, ako aj k zlepšeniu uchovávanía nameraných dát [1]. Prvé pokusy o merania hrúbok mäkkých tkanív tváre uskutočnil koncom 19. storočia Welcker, ktorý ako prvý spozoroval vzťah medzi lebkou a celkovým výrazom tváre [3]. Mäkké tkanivá tváre sú usporiadané podľa kostného podkladu, ku ktorému priliehajú [4, 5]. Doposiaľ uskutočnené výskumy zaoberajúce sa hrúbkami mäkkých tkanív tváre dospeli k záverom, že existujú signifikantné rozdiely medzi jednotlivými etnickými skupinami, vekovými kategóriami, medzi pohlaviami a medzi hmotnostnými a BMI (Body Mass Index) kategóriami [6]. Na hrúbky mäkkých tkanív vplýva vek, s ktorým súvisí syntéza hormónov [7] a zmeny v štruktúre kostného podkladu [8], pohlavie jedincov [9], množstvo tuku, ktoré je komponentom zabezpečovania objemu a stability výzoru tváre [10], telesná hmotnosť a BMI [11].

Pre meranie hrúbok mäkkých tkanív tváre je využívaných množstvo metód.

Najbežnejšími sú CT (Computed Tomography), MRI (Magnetic Resonance Imaging) a ultrazvuk [12]. Rovnako ako všetky typy zvukových vĺn aj ultrazvukové vlny prenikajú médium v podobe priečného vlnenia, v rozmedzí 20 – 100 kHz. Ultrazvukové vyšetrenie je bezbolestné a neinvazívne, preto je možné aj opakované meranie probandov [13].

Cieľom práce bolo meranie hrúbok mäkkých tkanív tváre u probandov slovenskej populácie, za účelom sledovania korelácie hrúbok mäkkých tkanív a BMI a telesnej hmotnosti. Výsledkom práce je rozšírenie databázy meraných HMTT u slovenskej populácie a možná pomoc pri rekonštrukcii podoby tváre u neznámych jedincov.

Materiál a metódy

V práci boli meraní probandi rôznych vekových kategórií, oboch pohlaví patriaci ku kaukazoidnej variete. Výskumu sa zúčastnilo 57 mužov vo veku od 20 – 87 rokov a 97 žien vo veku 20 – 85 rokov. Zvolené boli antropometrické body v stredovej línii tváre (*metopion*, *glabella*, *nasion*, *rhinion*, *midphiltrum*, *supramentale*, *pogonion*, *gnation*) a po stranách tváre (*alare*, *supraorbital*, *infraorbital*, *fossa canina*, *midmandible*, *malare*, *zygomatic*, *gnation*), pre následné vyhodnotenie miery asymetrie tváří probandov. Zisťovali sme telesnú výšku a telesnú hmotnosť meraných probandov, pre následný výpočet BMI [1].

$$\text{BMI} = \text{Telesná hmotnosť (kg)} / \text{telesná výška}^2 \text{ (m)}$$

Pre meranie bol použitý Ultrazvuk General electric LOGIQe R7, nastavený na B-mode, s frekvenciou sondy nastavenej na hodnotu 20 MHz. Naše výsledky sme spracovali v Microsoft Excell 265 a štatisticky vyhodnotili v programe IBM SPSS 24 s využitím neparametrických verzií testov (Mann-Whitney U test, Spearmanov korelačný test).

Výsledky a diskusia

V nameraných hrúbkach mäkkých tkanív tváre sme najprv sledovali intersexuálne rozdiely. Tie sa prejavili v bode *midphiltrum*, v ktorom sa rozdiely prejavili najvýraznejšie. Namerané hodnoty sa líšili takmer o dva milimetre (ženy – 8,05 mm, muži – 9,85 mm; Tab. 1). Özkan et al. (2020) taktiež tvrdili, že väčšie hrúbky mäkkých tkanív tváre môžeme pozorovať u mužských probandov [14]. Predovšetkým sme sledovali súvislosť medzi jednotlivými antropometrickými landmarkmi a telesnou hmotnosťou a BMI.

Rovnako sme sledovali aj koreláciu medzi jednotlivými antropometrickými landmarkmi a telesnou hmotnosťou, nakoľko je známe, že telesná hmotnosť ovplyvňuje

hrúbky mäkkých tkanív tváre (Tab. 2) [15]. Telesná hmotnosť najviac ovplyvňovala bod *metopion* ($4,64 \pm 0,98$ mm). Najnižší stupeň korelácie bol s bodom *gnation* ($5,60 \pm 1,89$). Z laterálne ležiacich bodov na tvári bol telesnou hmotnosťou najviac ovplyvnený bod *zygomatic*, pričom aj tu boli badateľné bilaterálne rozdiely. *Zygomatic* na ľavej strane tváre probandov bol telesnou hmotnosťou ovplyvnený silnejšie. Korelačný koeficient na ľavej strane bol 0,366 a na pravej strane 0,344. Obe polovice tváre sa zhodovali v tom, v ktorom bode je korelácia medzi telesnou hmotnosťou a antropometrickými landmarkmi najnižšia. Bol to bod *supraorbital*, pričom ale ľavá strana opäť dominovala (ľavá strana - 0,114, pravá strana - 0,076; Tab. 2).

Tab. 1. Intersexuálne rozdiely v stredovej línii tváre merané v sede
SD – smerodajná odchýlka ; p hodnota – štatistická významnosť

	Priemerné hodnoty HMTT u mužov (mm)	SD u mužov	Priemerné hodnoty HMTT u žien (mm)	SD u žien	p-hodnota
Metopion 1 (sed)	4,75	1,00	4,57	0,96	0,222
Glabella 1 (sed)	5,06	0,97	5,02	1,02	0,629
Nasion 1 (sed)	4,20	1,10	3,91	0,76	0,120
Rhinion 1 (sed)	3,35	1,15	3,14	1,03	0,308
Midphiltrum 1 (sed)	9,85	2,63	8,05	2,45	<0,001
Supramentale 1 (sed)	10,32	2,07	9,77	1,72	0,200
Pogonion 1 (sed)	7,42	2,60	7,50	2,39	0,988
Gnation 1 (sed)	5,30	1,60	5,77	2,02	0,109

Tab. 2. Korelácia landmarkov a telesnej hmotnosti v sede

M1 – metopion; G1 – glabella; N1 – nasion; R1 – rhinion; Mp1 – midphiltrum; S1 – supramentale; P1 – pogonion; Gn1 – gnathion; A1E – Alare ľavá strana; Su1E – Supraorbital ľavá strana; In1E – Infraorbital ľavá strana; Fc1E – Fossa canina ľavá strana; Mn1E – Midmandible ľavá strana; Ma1E – Malare ľavá strana; Z1E – Zygomatic ľavá strana; Go1E – Gonion ľavá strana; A1P – Alare pravá strana; Su1P – Supraorbital pravá strana; In1P – Infraorbital pravá strana; Fc1P – Fossa canina pravá strana; Mn1P – Midmandible pravá strana; Ma1P – Malare pravá strana; Z1P – Zygoatic pravá strana; Go1P – Gonion pravá strana;

r – korelačný koeficient; p-hodnota – štatistická významnosť

		M1	G1	N1	R1	Mp1	S1	P1	Gn1
Hmotnosť (kg)	r	0,409	0,388	0,174	0,130	0,135	0,235	0,216	0,092
	p-hodnota	<0,001	<0,001	0,031	0,109	0,097	0,003	0,007	0,259
		A1E	Su1E	In1E	Fc1E	Mn1E	Ma1E	Z1E	Go1E
Hmotnosť (kg)	r	0,334	0,114	0,160	0,217	0,334	0,185	0,366	0,316
	p-hodnota	<0,001	0,160	0,047	0,007	<0,001	0,022	<0,001	<0,001
		A1P	Su1P	In1P	Fc1P	Mn1P	Ma1P	Z1P	Go1P
Hmotnosť (kg)	r	0,274	0,076	0,148	0,287	0,289	0,170	0,344	0,340
	p-hodnota	0,001	0,348	0,068	<0,001	<0,001	0,035	<0,001	<0,001

Rovnako ako v sede, tak aj v polohe ležmo bol telesnou hmotnosťou najviac ovplyvnený bod *metopion* (0,409). V spodnej časti tváre s telesnou hmotnosťou najviac koreloval bod *supramentale*, (0,235). Bilaterálne rozdiely boli v polohe ležmo výraznejšie ako v sede (Tab. 3). Na ľavej strane tváre s telesnou hmotnosťou najviac koreloval bod *midmandible* s korelačným koeficientom 0,361 a na pravej bod *alare*, v ktorom korelačný koeficient dosahoval hodnotu 0,571.

Tab. 3. Korelácia antropometrických landmarkov a telesnej hmotnosti v polohe ležmo

M1 – metopion; G1 – glabella; N1 – nasion; R1 – rhinion; Mp1 – midphiltrum; S1 – supramentale; P1 – pogonion; Gn1 – gnathion; A1E – Alare ľavá strana; Su1E – Supraorbital ľavá strana; In1E – Infraorbital ľavá strana; Fc1E – Fossa canina ľavá strana; Mn1E – Midmandible ľavá strana; Ma1E – Malare ľavá strana; Z1E – Zygomatic ľavá strana; Go1E – Gonion ľavá strana; A1P – Alare pravá strana; Su1P – Supraorbital pravá strana; In1P – Infraorbital pravá strana; Fc1P – Fossa canina pravá strana; Mm1P – Midmandible pravá strana; Ma1P – Malare pravá strana; Z1P – Zygoatic pravá strana; Go1P – Gonion pravá strana; r – korelačný koeficient; p-hodnota – štatistická významnosť

		M1	G1	N1	R1	Mp1	S1	P1	Gn1
Hmotnosť (kg)	r	0,395	0,326	0,229	0,143	0,106	0,346	0,302	0,288
	p hodnota	<0,001	<0,001	0,004	0,077	0,192	<0,001	<0,001	<0,001
		A1E	Su1E	In1E	Fc1E	Mm1E	Ma1E	Z1E	Go1E
Hmotnosť (kg)	r	0,236	0,192	0,164	0,282	0,361	0,241	0,355	0,272
	p hodnota	0,003	0,017	0,042	<0,001	<0,001	0,003	<0,001	0,001
		A1P	Su1P	In1P	Fc1P	Mm1P	Ma1P	Z1P	Go1P
Hmotnosť (kg)	r	0,571	0,336	0,202	0,132	0,392	0,057	0,139	0,256
	p hodnota	0,001	0,056	0,261	0,465	0,024	0,752	0,139	0,256

BMI stopercentne koreluje s telesnou hmotnosťou a nakoľko telesná hmotnosť koreluje s landmarkmi tváre v rôznej miere je samozrejmé, že landmarky tváre budú ovplyvnené aj meniacim sa BMI (Tab. 4).

Tab. 4. Korelácia antropometrických landmarkov tváre a BMI v sede

M1 – metopion; G1 – glabella; N1 – nasion; R1 – rhinion; Mp1 – midphiltrum; S1 – supramentale; P1 – pogonion; Gn1 – gnathion; A1E – Alare ľavá strana; Su1E – Supraorbital ľavá strana; In1E – Infraorbital ľavá strana; Fc1E – Fossa canina ľavá strana; Mn1E – Midmandible ľavá strana; Ma1E – Malare ľavá strana; Z1E – Zygomatic ľavá strana; Go1E – Gonion ľavá strana; A1P – Alare pravá strana; Su1P – Supraorbital pravá strana; In1P – Infraorbital pravá strana; Fc1P – Fossa canina pravá strana; Mn1P – Midmandible pravá strana; Ma1P – Malare pravá strana; Z1P – Zygoatic pravá strana; Go1P – Gonion pravá strana; r – korelačný koeficient; p-hodnota – štatistická významnosť

		M1	G1	N1	R1	Mp1	S1	P1	Gn1
BMI	r	0,474	0,508	0,130	0,194	-0,015	0,266	0,289	0,233
	p hodnota	<0,001	<0,001	0,107	0,016	0,850	0,001	<0,001	0,004
		A1E	Su1E	In1E	Fc1E	Mn1E	Ma1E	Z1E	Go1E
BMI	r	0,384	0,275	0,294	0,338	0,482	0,229	0,511	0,469
	p hodnota	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,004	<0,001	<0,001
		A1P	Su1P	In1P	Fc1P	Mn1P	Ma1P	Z1P	Go1P
BMI	r	0,317	0,240	0,287	0,379	0,435	0,251	0,547	0,463
	p hodnota	<0,001	0,003	<0,001	<0,001	<0,001	0,002	<0,001	<0,001

Rovnako intenzívne ako telesná hmotnosť s hrúbkami mäkkých tkanív súvisí aj BMI. V sede koreluje s BMI v stredovej línii tváre najviac HMTT v bode *glabella* (0,508). Hodnota BMI u našich meraných probandov nijak neovplyvňovala bod *midphiltrum* v ktorom korelačný koeficient dosahoval záporné hodnoty (-0,015). Pri BMI ale nebola prítomná bilaterálna asymetria. Na pravej aj ľavej polovici tváre v korelácii s BMI dominoval bod *zygomatic*, ktorý v korelácii s BMI značne prevyšoval ostatné body (Tab. 4).

Záver

Je možné konštatovať, že hrúbky mäkkých tkanív tváre sú značne ovplyvňované telesnou hmotnosťou a to aj v závislosti od polohy merania probanda, nakoľko v sede a v polohe ležmo je pôsobenie gravitácie a mäkké tkanivá tváre odlišné. Nakoľko boli merané obe pohlavia, prejavili sa aj intersexuálne rozdiely, pričom tak ako v mnohých iných výskumoch, aj v tom našom boli vyššie hrúbky mäkkých tkanív namerané u mužských probandov.

Telesná hmotnosť probandov ovplyvňovala aj veľkosť ich BMI, avšak pre zohľadnenie BMI ako smerodajného faktora by bolo potrebné zistiť presné množstvo telesného tuku a svalovej hmoty v tele meraných probandov, nakoľko radenie do BMI kategórií iba na základe telesnej hmotnosti a telesnej výšky nemusí byť exaktné.

Hrúbky mäkkých tkanív tváre ovplyvňuje vek probandov, preto by bolo vhodné pokračovať v meraniach hrúbok mäkkých tkanív a súbor rozšíriť o viaceré vekové skupiny od detských probandov až po seniorov a všímať si štrukturálne zmeny ako v kostnom podklade tváre, tak aj v rozložení mäkkých tkanív na tvári. Po takomto rozšírení meraného súboru by

bolo možné poznatky a výsledky z meraní využiť ďalej pri rekonštrukcii podoby tváre neznámych jedincov.

PodĎakovanie

Touto cestou by som sa rada poďakovala probandom, ktorí sa výskumu zúčastnili a pracovníkom Katedry antropológie, Univerzity Komenského v Bratislave.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Utkualp N., Ercan I. (2015) BioMed Res. Int. p. 1
- [2] Wang J., Thornton J. C., Kolesnk S., et al. (2006) Ann. N. Y. Acad. Sci. 904(1), p. 317
- [3] Kollmann J. (1989) Anat. Anz. (15), p. 165
- [4] Subtelny J. D. (1959) Am. J. Orthod. 45(7), p. 481
- [5] Burstone C. (1967) Am. J. Orthod. 53(4), p. 262
- [6] Ramesh G., Nagarajappa R., Sreedhar G., et al. (2015) J. Forensic. Res. 6(5), p. 1000299
- [7] Al-Mashhadany S. M., Al-Chalabi H. M. H., Nahidh M. (2015) Int. J. Sci. Res, 6(2), p. 938
- [8] Richard M. J., Morris C., Deen F. et al. (2009) Ophtalamic Plast. Reconstr. Surg. 25(5), p. 382
- [9] Panenková P., Beňuš R., Masnicová S. et al. (2012) Forensic. Sci. Int. 220(1-3), p. 293.e1-6
- [10] Wan D., Amirlak B., Giessler P. et al. (2014) Plast. Reconstr. Surg. 133(5), p. 615
- [11] Ode J. J., Pivarnik J. M., Reeves M. J. et al. (2007) Med. Sci. Sports Exerc. 39(3), p. 403
- [12] Utkualp N., Ercan I. (2015) BioMed Res. Int. 2015, p. 1
- [13] Stephan C. N., Simpson E. K. (2008) J. Forensic. Sci. 53, p. 1257
- [14] Özkan M. Ç., Yeşil F., Bayramyçlı I. et al. (2020) Aesthet. Surg. J. 40(7), p. 711
- [15] James W. D., Berger T. G., Elston D. M. et al. (2006) Andrews' diseases of the skin: clinical dermatology. Saunders Elsevier, Philadelphia, p. 1

Využitie exozomálnej mtDNA ako nového potenciálneho biomarkera pre detekciu nádorov v centrálnej nervovej sústave

Werner Krampfl^{2,3,4*}, Beáta Soltész¹, Ondrej Pös^{2,3,4}, Zuzana Wlachovská^{3,5}, Monika Buchalová^{3,9}, Jaroslav Budiš^{3,4,6}, Rastislav Hekel^{2,3,4}, Lucia Striešková⁴, Jana Boženka Liptak⁵, Jakub Styk^{3,4,7}, Nikolett Németh¹, Judit Sz Keserű¹, Adrienn Jenei⁸, Gergely Buglyó¹, Álmos Klekner⁸, Bálint Nagy^{1,3}, Tomáš Szemes^{2,3,4}

¹Univerzita v Debrecíne, Lekárska fakulta, Katedra ľudskej genetiky, Egyetem tér 1., H-4032, Debrecen, Maďarská republika; werner.krampfl@uniba.sk

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

³Univerzita Komenského v Bratislave, Vedecký park, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava, Slovenská republika

⁴Geneton s.r.o., Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava, Slovenská republika

⁵Slovenská technická univerzita, Fakulta informatiky a informačných technológií, Ústav informatiky, informačných systémov a softvérového inžinierstva, Ilkovičova 2, 842 16 Bratislava, Slovenská republika

⁶Centrum vedecko-technických informácií Slovenskej republiky, Lamačská cesta 8A, 840 05 Bratislava, Slovenská republika

⁷Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovenská republika

⁸Univerzita v Debrecíne, Lekárska fakulta, Katedra neurológie, Egyetem tér 1., H-4032, Debrecen, Maďarská republika

⁹Univerzita Komenského v Bratislave, Fakulta matematiky, fyziky a informatiky, Katedra aplikovanej informatiky, Mlynská dolina F1, 842 48 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Utilization of exosomal mtDNA as a novel potential biomarker for detection of tumors in the central nervous system

Glioblastoma is a common malignant tumor of the central nervous system (CNS). These cells have increased glucose consumption, which negatively affects the prognosis of the disease. Mutations and changes in the number of copies of mitochondrial DNA can serve as biomarkers, but obtaining them directly from brain tissue is difficult. Analysis of exosomes appears as an alternative method for studying changes in CNS tumors. In this study, we examined DNA from brain tissue and exoDNA from plasma of 44 patients with glioblastoma and 40 control individuals. We then prepared sequencing libraries and sequenced them on the MiSeq platform to identify point mutations in mitochondrial DNA. We determined the number of copies of mitochondrial DNA and identified point mutations. The number of copies and mutations were different between groups. Despite the proposed potential value, such biomarkers for screening and diagnosing glioblastomas are still limited, and further studies are needed.

Keywords: mitochondrial DNA; glioblastoma; exosome; copy number; mutations; heteroplasmy

Úvod a formulácia cieľa

Dysregulácia bunkovej energetickej produkcie sa spája s vznikom rakoviny. Tumory majú tendenciu aj za normoxických podmienok využívať aeróbnú glykolýzu (nie nasledovanú oxidatívnou fosforyláciou), aby poskytli dostatok energie pre svoje bunky. Otto Warburg bol

prvý, kto pozoroval zvýšenú glykolitickú aktivitu a zníženú mitochondriálnu respiráciu v bunkách nádoru, čo sa nazýva Warburgov efekt [1]. Ľudský mitochondriálny génóm pozostáva z kruhovej dvojvláknovej DNA s dĺžkou 16,5 kbp, ktorá kóduje 13 génov produkujúcich zložky elektrónového prenosového reťazca mitochondrií a ATP syntázy, ako aj 22 génov tRNA a 2 génov rRNA, ktoré sa zúčastňujú na oxidatívnej fosforylácii. Genetické mutácie a zmeny v počte kópií mitochondriálnej DNA sú spojené s bunkovým prežitím, starnutím a vývojom vážnych ochorení, ako je rakovina [2,3,4]. Výskum ukázal, že pacienti s glioblastómom majú v niektorých prípadoch vyšší počet kópií mitochondriálnej DNA, čo môže súvisieť s predĺženým prežitím, nižšou agresivitou nádoru a nižšou bunkovou diferenciáciou. Taktiež sa preukázali zmeny v metylačných vzorcoch DNA a výraze jadrového génového materiálu. Mutácie spojené s glioblastómami sa vyskytujú takmer v celej mitochondriálnej DNA a môžu viesť k výskytu zmiešaných molekúl DNA v rámci jednotlivých buniek, čo sa nazýva heteroplazmia. Viaceré štúdie korelujú tento fenomén s rakovinou, avšak stále nie je jasné, či tieto zmeny sú príčinou alebo následkom ochorenia.

Glioblastóm je agresívny rakovinový nádor centrálnej nervovej sústavy s mediánovým prežitím okolo 14-18 mesiacov [5]. Jeho diagnostika a hodnotenie je náročné pre neuropatológiu, pretože mozog nie je jednoducho prístupný. Bolo zistené, že bunky glioblastómu môžu uvoľňovať exozómy, ktoré nesú mitochondriálne genómy s modifikáciami, ktoré môžu zmeniť metabolizmus buniek príjemcov a podporovať šírenie rôznych chorôb. Táto skutočnosť môže mať veľký význam pre klinické využitie. Napriek tomu, spojenie medzi glioblastómom a zmenami v exo-mtDNA v plazme je ešte nedostatočne skúmané a potenciálne následky exo-mtDNA sú slabšie pochopené.

Materiál a metódy

V období 2016 - 2018 boli skúmaní pacienti z Oddelenia neurochirurgie, Lekárskej fakulty Univerzity v Debrecíne. Kontrolnú skupinu tvorili vzorky od 40 jedincov, ktorí nemali do konca roku 2021 žiadne príznaky zhubnej nádory. Vzorky glioblastómu boli získané od 44 pacientov a boli klasifikované ako glioblastóm IV. stupňa podľa odporúčaní Svetovej zdravotníckej organizácie na základe histopatologických znakov a endotelovej proliferácie.

Periférna celá krv bola odobraná od 22 pacientov s glioblastómom a 20 kontrol (osoby s herniou medzistavcovej platničky).

Taktiež sme získali vzorky tkaniva od 22 pacientov s glioblastómom a 20 kontrol (pacienti diagnostikovaní s epilepsiou, ktorí podstúpili operáciu).

Ľudské mtDNA boli zachytené z extrahovanej DNA pomocou súpravy MYbaits-1

(MYcroarray, Ann Arbor, MI, USA), ktorá obsahuje 20 000 biotinom označených RNA sond. Finálna vzorka bola analyzovaná na platforme Illumina MiSeq s použitím sady reagentov MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina). Sekvenované dáta boli následne spracované pomocou integrovaných bioinformatických pipeline a štatisticky analyzované.

Výsledky a diskusia

Identifikovali sme 341 pozícií na mtDNA obsahujúcich varianty vo vzorkách z tkanív a 911 vo vzorkách plazmy. Po použití chi-square testu a Bonferroniho korekcie sa nenašiel žiadny variant, ktorý by spĺňal kritériá $p \leq 0,015^{-2}$ pre tkanivo a $p \leq 0,05^{-3}$ pre vzorky plazmy. Varianty s najväčším rozdielom vo frekvencii výskytu medzi skupinami glioblastómu a kontrolných jedincov ($p < 0,05$) sú uvedené v Tab. 1. Na určenie patogenicity variantov mtDNA sme získali údaje z HmtVar, ktorý kombinuje externé zdroje a niekoľko predikčných nástrojov (Tab. 2).

Tab. 1. Zoznam variantov mtDNA s rôznymi frekvenciami medzi skupinami tumoru a kontrol, pozorovaných v plazme aj tkanivových vzorkách ($p < 0,05$). No_rep: nehlásené.

Variant	rs_ID	Vzorka	% prípadov Ctrl vs Tumor	Lokus	Typ	ClinVar	HmtVar
m.309insCCC	no_rep	Tkanivo	0% vs 36%	HVS-II	Regulácia	no_rep	NA
m.315dupC	rs369786048	Tkanivo	89% vs 55%	HVS-II	Regulácia	no_rep	NA
m.1476G>A	no_rep	Plazma	36% vs 0%	MT-RNR1	rRNA	no_rep	NA
m.1518C>T	no_rep	Plazma	44% vs 5%	MT-RNR1	rRNA	no_rep	NA
m.1619C>T	rs1569483811	Plazma	46% vs 5%	MT-TV	tRNA	Nezhodný	Pravdepodobne patogénny

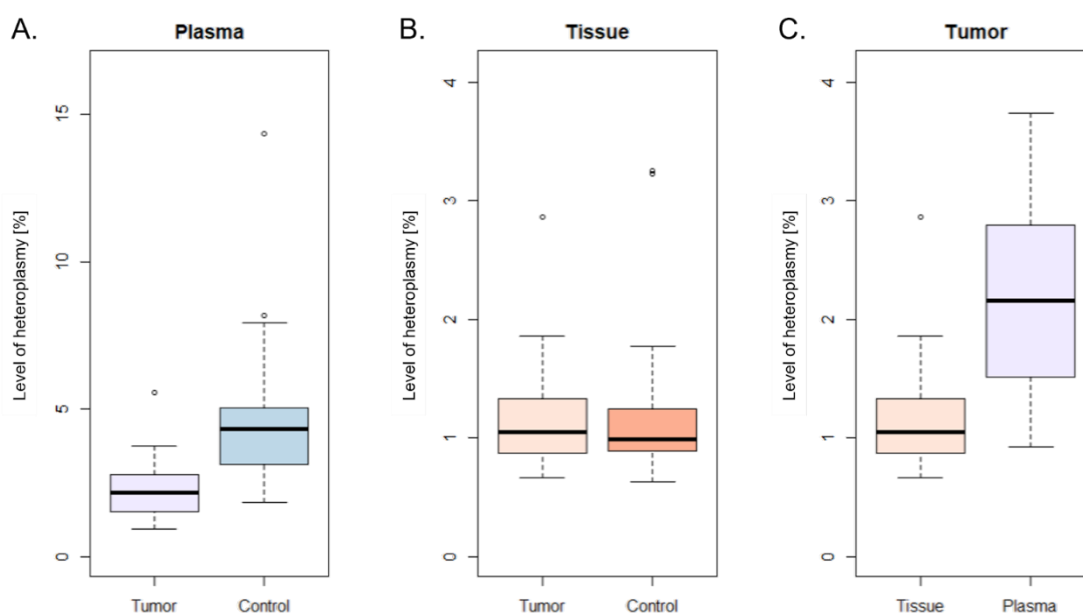
Vzhľadom na heteroplazmiu buniek u človeka môže byť na konkrétnej nukleotidovej pozícii mtDNA prítomných niekoľko alel. Preto sme vypočítali proporcionálne zastúpenie dvoch najfrekventovanejších alel pre každú pokrytú pozíciu v mtDNA. Alela s najvyšším zastúpením je označená ako "veľká", zatiaľ čo druhá najčastejšie sa vyskytujúca alela sa považuje za "malú". Tento prístup viedol k trom možnostiam, ktoré bolo potrebné zvážiť (Tab. 2).

Tab. 2. 3 možné scenáre pri sekvenovaní mitochondriálneho genómu: (a) ak nebol daný nukleotid pokrytý sekvenovaním, obidve najčastejšie alely = 0; (b) ak bol pre určitú pozíciu detegovaný len jeden typ nukleotidu (najčastejšia alela > 0 a druhá najčastejšia alela = 0), jedná sa o homoplazmiu; (c) ak boli detegované aspoň dve alely (najčastejšia alela > 0 a druhá najčastejšia alela > 0), jedná sa o heteroplazmiu.

Scenár	Situácia	Definícia
a	veľká alela = 0 malá alela = 0	Pozícia nie je pokrytá
b	veľká alela > 0 malá alela = 0	Na pozícii je len jeden typ nukleotidu (homoplazmia)
c	veľká alela > 0 malá alela > 0	Na pozícii sú aspoň dva typy nukleotidu (heteroplazmia)

Využitím hodnôt cut-off stanovených predchádzajúcimi štúdiami sme stanovili minimálne a maximálne úrovne heteroplazmie na 0,05 a 0,95 [6]. Nukleotidové pozície s úrovňou pod touto hodnotou a nad ňou boli považované za homoplazmický divoký typ a homoplazmickú variantu. Vypočítali sme úroveň heteroplazmie v každom vzorke spočítaním počtu "b" a "c" situácií a vzorca (I., Obr. 1).

$$\text{Úroveň heteroplazmie} = \text{sum } c / (\text{sum } b + \text{sum } c) \quad [I.]$$



Obr. 1 Porovnanie úrovni heteroplazmie medzi kontrolnou skupinou a skupinou s nádorom v (A) plazme ($p = 0,0525$ -3) a (B) tkanive ($p = 0,8144$) vzoriek. (C) Úroveň heteroplazmie v nádorovej plazme a tkanivových vzorkách ($p = 0,0377$ -3).

Ukázali sme, že u pacientov s nádorom je úroveň heteroplazmie v plazme vyššia ako v tkanive, čo naznačuje, že exoDNA odvodzovaná z plazmy je lepším zdrojom na zachytenie spektra heteroplazmických variácií na intercelulárnej úrovni. V porovnaní s kontrolami mali vzorky plazmy pacientov s nádorom menej heteroplazmických pozícií. Na druhej strane však nebol zistený signifikantný rozdiel v počte heteroplazmických pozícií v tkanivových vzorkách medzi kontrolami a pacientmi s nádorom. To môže byť vysvetlené tým, že kontrolnými jedincami neboli zdraví ľudia, ale pacienti s epilepsiou, pretože epilepsia môže byť prejavom mitochondriálnej choroby. V tkanivových vzorkách bola zistená korelácia medzi počtom kópií mtDNA a pokrytím mtDNA. Naše výsledky sú v súlade s výskumom, ktorý ukazuje nízky počet kópií mtDNA v glioblastóme v porovnaní s nezhubným mozgovým tkanivom.

Glioblastóm je charakterizovaný Warburgovým fenotypom (bunky prechádzajú metabolickou prestavbou z oxidatívnej fosforylácie na aeróbnú glykolýzu), čo naznačuje možnú úlohu mutácií a zmien počtu kópií mtDNA v procese adaptácie na nové metabolické požiadavky [7].

Dôležitosť počtu kópií mtDNA pri vzniku a udržiavaní tumorigenezy v glioblastóme nie je dostatočne preskúmaná, najmä nie mtDNA pochádzajúca z exozómov odvodených z plazmy [40]. Bunky s vysokou potrebou energie, ako sú tie v mozgu, udržiavajú vysoký počet kópií mtDNA [41]. Avšak bunky s menším počtom mitochondrií, ktoré uvoľňujú svoj genetický materiál do obehu, môžu regulovať celkový počet kópií mtDNA v plazme, čo vedie k nižšiemu počtu kópií mtDNA v plazmatických exozómoch v porovnaní s tkanivovými vzorkami. V našej štúdii sme zistili koreláciu medzi počtom kópií mtDNA a pokrytím mtDNA v tkanivových vzorkách. Naše výsledky sú v súlade s predchádzajúcimi štúdiami, ktoré ukazujú nízky počet kópií mtDNA v glioblastóme v porovnaní s neoplazickým mozgovým tkanivom [42,43], ale iné štúdie ukázali rozporné výsledky [44]. Pozorovali sme zvýšené pokrytie plazmatického exo-mtDNA u pacientov s glioblastómom, čo naznačuje vyšší počet mtDNA, ktorý sa načítava do exozómov uvoľnených z nádorových buniek. Naše výsledky podporujú potenciálnu použiteľnosť počtu kópií mtDNA ako biomarkeru pre glioblastóm, ale na plné pochopenie jeho role je potrebné viac výskumu.

Záver

Hoci použitie analýzy mtDNA pre diagnózu glioblastómu je nedostatočne skúmaná oblasť, naše výsledky naznačujú, že rozdiely v počte kópií mtDNA by mohli slúžiť ako užitočné biomarkery, keď sú detegované z tkanivových vzoriek, zatiaľ čo výsledky s exo-mtDNA sú viac kontroverzné. Tiež podporujeme ďalšie štúdie na posúdenie frekvencie a potenciálnej úlohy, ktorú môžu mať určité varianty mtDNA v glioblastóme.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla vďaka podpore Operačného programu Integrovaná infraštruktúra v rámci projektov ITMS: 313011W428 (BIOMEDIRES II.), ITMS: 313011V578 (PreveLynch) a ITMS: 313011ATL7 (PanClinCov) spolufinancovaných zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Warburg O. (1924) Sci. Nat. p. 121131

- [2] Hsu C. - C., Tseng L. - M., Lee H. - C., (2016) *Exp. Biol. Med.* 241, p. 1281
- [3] Liang B. C., Hays L., (1996) *Cancer Lett.* 105, p. 167
- [4] Reznik E., Miller M. L., Şenbabaoğlu Y., et al. (2016) *Elife.* 5, p. e10769
- [5] . Chai R. - C, Chang Y. - Z., Wang Q. - W., et al. (2019) *Front. Genet.* 10, p.910
- [6] Laaksonen J., Mishra P. P., Seppälä I., et al. (2021) *Sci. Rep.* 11, p. 611
- [7] Vidone M., Clima R., Santorsola M., et al. (2015) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 63, p. 46
- [8] Shen M., Zhang L., Bonner M. R., et al. (2008) *Environ. Mol. Mutagen.* 49 (2008), p. 453
- [9] Sravya P., Nimbalkar V. P., Kanuri N. N., et al. (2020) *Mitochondrion.* 55, p.154
- [10] Vidone M., Clima R., Santorsola M., et al. (2015) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 63, p. 46
- [11] Correia R. L., Oba-Shinjo S. M., Uno M., et al. (2011) *Mitochondrion.* 11, p. 48

Analýza mikrobiómu bezstavovcov s využitím sekvenovania novej generácie

¹Katarína Krempaská, ²Martin Hromada, ¹Sára Šardzíková, ²Jozef Oboňa, ¹Katarína Šoltys

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 841 04 Bratislava, Slovenská republika; krempaska23@uniba.sk

²Prešovská Univerzita v Prešove, Fakulta humanitných a prírodných vied, Katedra ekológie, Ul. 17 novembra 1, 080 01 Prešov, Slovenská republika

Abstract

Analysis of invertebrate's microbiome using Next Generation Sequencing

Microbiome is an essential part of every living organism. Recently, the main subject of interest is focused on human microbiome. Nowadays, the study of invertebrate's microbiome started to gain more attention. The aim of this research was by using massive parallel sequencing to identify and analyse various important endosymbiotic or pathogenic bacteria, viruses, fungi, protozoa in microbiome of louse flies Hippoboscidae. We have investigated the microbiome of 3 genera: Lipoptena, Hippobosca, Ornithomya. Due to the increasing number of hematophagous insects in central Europe it is important to study their microbial composition as of potential vectors in order to monitor and prevent the transmission of pathogenic microorganisms on mammals or birds.

Keywords: invertebrates; microbiome; massive parallel sequencing; louse flies (Hippoboscidae)

Úvod a formulácia cieľa

Mikrobióm je komplexný súbor baktérií, jednobunkovcov, húb, vírusov a archeónov. Podieľa sa na dôležitých životných procesoch nielen u ľudí, ale aj u živočíchov vrátane bezstavovcov [1].

Krv cicajúci hmyz čeľade *Hippoboscidae* sa radí medzi dvojkrídlovce a je známy pod názvom kuklorodky. Vyskytujú sa celosvetovo, vrátane Slovenska [2]. S veľkou pravdepodobnosťou sa evolučne vyvíjali spolu s *Glossinidae*, (do ktorej patria muchy Tse-tse) a mali s nimi spoločného predka živiaceho sa cicaním krvi cicavcov a vtákov [1, 3]. Kuklorodky *Lipoptena* a *Hippobosca* sú ektoparazity jelenej zveri, dobytky a koní. Zriedkavo sa vyskytujú aj u ľudí. Rod *Ornithomya* je ektoparazit vtákov [2]. Najnovšie štúdie dokazujú prítomnosť rôznych patogénov a parazitov, vrátane *Borrelia* spp., *Bartonella schoenbuchensis*, *Theileria* spp., *Rickettsia* spp., *Plasmodium* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Trypanosoma* spp., *Coxiella* spp., v mikrobiote kuklorodiek najmä rodov *Lipoptena* a *Ornithomya*, ktoré pravdepodobne prenášajú aj na svojich hostiteľov. Následne môžu u nich spôsobovať dermatitídy, alergické rinokonjunktivitídy alebo iné zdravotné komplikácie [4, 5]. Významná je aj identifikácia a charakterizácia funkcie endosymbiotických mikroorganizmov v mikrobióme

hematofágneho hmyzu. Niektoré z nich môžu totiž znižovať práve schopnosť mechanického prenosu potenciálnych patogénov [5, 6, 7].

Zloženie mikrobiómu kuklorodiek zatiaľ nie je úplne prebádané a v posledných rokoch sa záujem o túto skupinu živočíchov zvyšuje.

Cieľom tejto práce bola analýza mikrobiómu u potenciálneho vektora, hematofágneho hmyzu čeľade *Hippoboscidae*, s využitím sekvenovania novej generácie a komplexná charakterizácia a identifikácia patogénov i symbiontov.

Materiál a metódy

DNA z 24 jedincov sme izolovali z mechanicky rozdrveného hmyzu prostredníctvom 25% amoniaku. Získanú DNA sme po izolácii purifikovali na magnetických guľôčkach a koncentráciu DNA sme stanovili fluorometricky. Vzorky sme uskladnili pri -20°C do ďalšieho použitia. Sekvenačné knižnice sme pripravili štiepením pomocou transpozónu a sekvenovali na Illumina NextSeq platforme. Výstupy zo sekvenovania sa spracovali pomocou databázy Standard plus protozoa & fungi (2021). Pre štatistické vyhodnotenie sme použili Kruskal-Wallis test a Wilcoxonov test ($p < 0,05$) a lineárnu diskriminačnú analýzu.

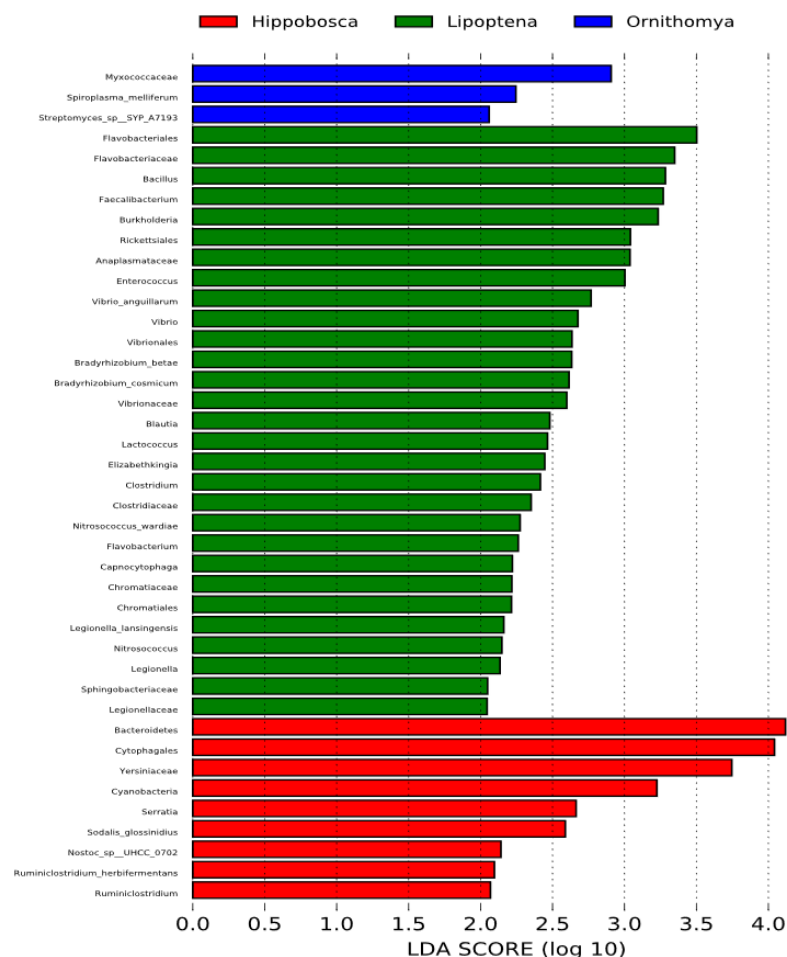
Výsledky a diskusia

V tejto práci sme analyzovali mikrobióm 24 jedincov krv cicajúceho hmyzu čeľade *Hippoboscidae*. Kuklorodky boli rozdelené podľa príslušnosti k rodu *Lipoptena* (18x); *Hippobosca* (3x) *Ornithomya* (3x).

Celkovo sme vrámci skupín baktérií, vírusov, húb a protozoa v mikrobióme kuklorodiek identifikovali 6167 taxónov. Z toho väčšinu 94,76% tvorili baktérie, 2,48% vírusy, 1,86% mikroskopické huby a 0,94% protozoa.

V rámci baktérií sme detekovali 14 kmeňov, pričom v najvyššej relatívnej početnosti boli *Proteobacteria* (42,5%), *Firmicutes* (20,78%) nasledované *Actinobacteria* (19,34%). U *Proteobacteria* bol stanovený, s najvyššou priemernou početnosťou, rod *Arsenophonus* (12,51%), bežný komenzál dvojkrídlavcov, ubikvitný rod *Acinetobacter* (9,12%), potenciálne patogénne rody *Burkholderia* (6,49%), *Yersinia* (5,07%), *Vibrio* (2,86%), *Coxiella* (1,57%) a *Bartonella* (1,21%). Endosymbiont *Wolbachia* spp. (3,58%) sa vyskytuje aj v muchách tse-tse, či pri komároch, podieľa sa na syntéze esenciálnych látok. Zároveň môže ovplyvňovať prenos patogénov (napr. koinfekcia vírusu *Dengue* a *Plasmodium*) na živočíchy prostredníctvom svojho hostiteľa [5, 6].

Z *Firmicutes* boli najviac zastúpené rody *Staphylococcus* (29,01%), *Bacillus* (8,40%), *Streptococcus* (8,24%) a *Clostridium* (1,34%). V kmeni *Actinobacteria* bol najviac zastúpený rod *Corynebacterium* (5,22%).



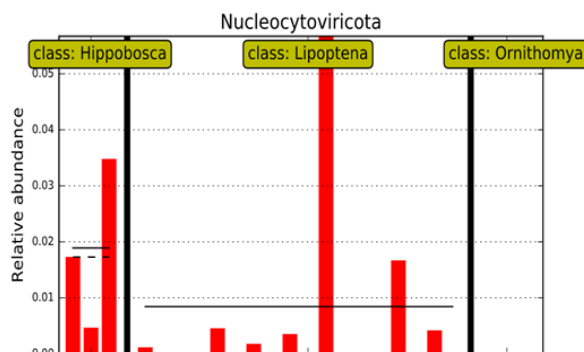
Obr.1. Histogram signifikantných rozdielov v relatívnej početnosti baktérií (LDA >2) u kuklorodiek (*Hippobosca*, *Lipoptena*, *Ornithomya*) ($p < 0.05$).

Rod *Lipoptena* má 2-3x vyššie zastúpenie baktérií *Rickettsiales*, *Anaplasmataceae*, *Vibrio*, *Clostridium*, *Legionella*, *Bacillus* v porovnaní s rodmi kuklorodiek *Hippobosca* a *Ornithomya*. Vo viacerých štúdiách bol tiež potvrdený prenos nami identifikovaných patogénov *Vibrio*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Anaplasma phagocytophilum* kuklorodkami rodu *Lipoptena* [4,7].

Endosymbiotická baktéria z kmeňa *Proteobacteria*, rodu *Sodalis* (1,7%), *Sodalis glossinidius* s priemernou rel. početnosťou (0,09%) má 2,5x vyššie zastúpenie u rodu *Hippobosca*. Táto baktéria sa môže podieľať na znížení schopnosti prenášať patogény alebo parazity na hostiteľa hematofágneho hmyzu, ako sú napr. mucha Tse-tse alebo komár rodu

Aedes. [3]. S nízkou rel. početnosťou (od 0,1-0,8%) sme detegovali aj symbiotické baktérie: *Capnocytophaga*, *Blautia*, *Elizabethkingia*, *Enterococcus*, *Faecalibacterium*, *Flavobacterium*, *Alistipes*, ktoré sú bežnou súčasťou mikrobioty stavovcov či komárov a múch. Práve u rodu *Lipoptena* majú 2-3x signifikantne vyššie zastúpenie v porovnaní s *Hippobosca* a *Ornithomya* (Obr.1).

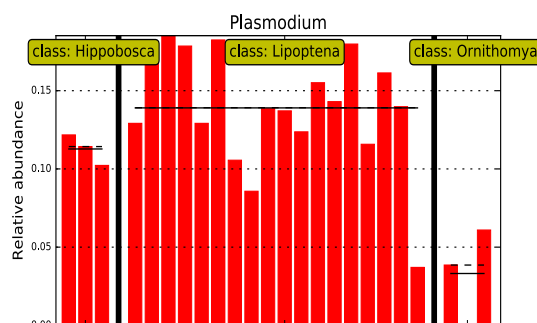
Z vírusovej zložky sme detegovali 8 kmeňov vírusov, pričom s najvyššou priemernou rel. početnosťou boli kmene *Uroviricota* (38,24%), *Artverviricota* (37,43%), *Preplasmiviricota* (13,96%) a *Nucleocytoviricota* (4,34%). Identifikovali sme aj entomopatogénny rod *Betabaculovirus* s vysokou početnosťou 21,9%, ktorý patrí do triedy *Naldaviricetes*, ktorého hostiteľmi sú *Lepidoptera*, *Hymenoptera*, *Diptera* [8-9]. K najpočetnejším zástupcom jednotlivých kmeňov patrili *Pahexavirus* (12,05%) (*Uroviricota*), pravdepodobne bakteriofág *Cutibacterium acnes*, *Gammaretrovirus* (33%) (*Artverviricota*), spôsobujúci ochorenia u cicavcov, vtákov a plazov s *Mastadenovirus* (13%) z kmeňa *Preplasmiviricota* [10]. Kmeň *Nucleocytoviricota* sa s najvyšším zastúpením (4,34%) nachádzal u jedinca z rodu *Lipoptena*, avšak celkovú vyššiu relatívnu početnosť mal u jedincov rodu *Hippobosca*. (Obr.2).



Obr.2. Histogram relatívnej početnosti vírusov kmeňa *Nucleocytoviricota* u rodov kuklorodiek *Hippobosca*, *Lipoptena*, *Ornithomya* ($p < 0,05$).

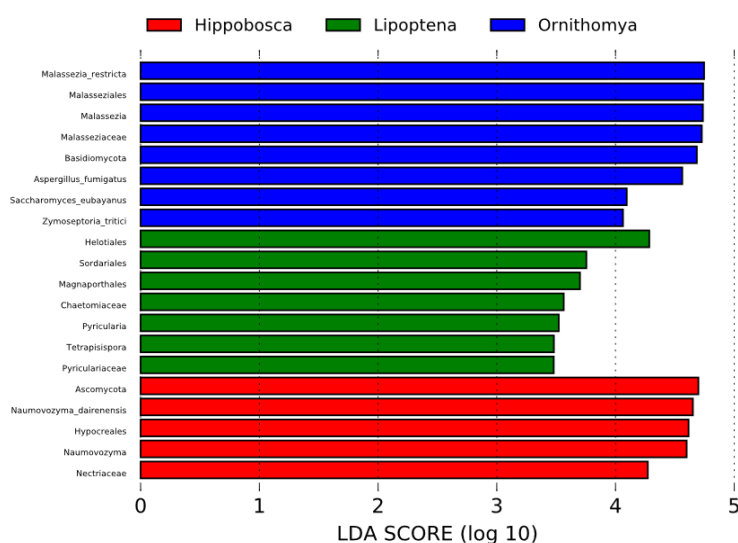
V rámci analýzy sme identifikovali aj *Protozoa*, z ktorých mali najpočetnejšie zastúpenie kmene *Apicomplexa* (83%) a *Euglenozoa* (10%). Medzi zástupcov *Apicomplexa* patrilo 10 rodov, z toho s najvyššou priemernou početnosťou vo všetkých jedincoch boli rody *Plasmodium* (60,97%), *Toxoplasma* (16,68%), *Leishmania* (6%). Najpočetnejším druhom v rámci rodu *Plasmodium* bol *P. chabaudi* (17,53%). V menšej početnosti od 2-6% boli nájdené patogénne druhy *P. malariae* (6,15%), *P. falciparum* (2,02%) spôsobujúce infekčnú maláriu u ľudí. Sice *Plasmodium* spp. je prenášaný najmä komármi rodov *Aedes* a *Anopheles*,

tento rod bol nájdený aj v mikrobióme kuklorodiek rodu *Lipoptena* [4, 5]. Relatívna početnosť patogénnych prvkov rodov *Plasmodium* je signifikantne najvyššia u kuklorodiek *Lipoptena* (Obr.3).



Obr.3. Histogram relatívnej početnosti obligátne parazitického rodu *Plasmodium* u kuklorodiek rodu *Lipoptena*, *Hippobosca*, *Ornithomya* ($p < 0,05$).

Zo skupiny mikroskopických húb sme detegovali zástupcov kmeňov *Ascomycota* s relat. početnosťou (63%), s hlavný zástupcom rod *Botrytis* (13%) a s najväčšou početnosťou kvasinky rodu *Candida* (15,91 %) a *Naumovozyma* (6,62%), ktoré patria medzi komenzálne mikroorganizmy v črevnom mikrobióme komárov, kliešťov, múch [11]. Druhý najpočetnejší bol rod *Malassezia* (37%), hlavne *M. restricta* (36,53%). Kuklorodky rodu *Ornithomya* mali v porovnaní s *Hippobosca* a *Lipoptena* signifikantne (cca.4,7x) vyššie zastúpenie rodu *Malassezia*. (Obr.4).



Obr.4. Histogram signifikantných rozdielov relatívnej početnosti mikroskopických húb identifikovaných u kuklorodiek rodov *Hippobosca*, *Lipoptena* a *Ornithomya* (LDA>3,5).

Záver

Sekvenovaním novej generácie na platforme Illumina sme identifikovali bakteriálnu, vírusovú, fungálnu a protozoálnu zložku mikrobiómu hematofágneho hmyzu rodov *Lipoptena*, *Hippobosca*, *Ornithomya*, čeľade *Hippoboscidae*. Identifikovali sme endosymbiotické baktérie rodov, akými sú *Arsenophonus*, *Wolbachia*, *Acinetobacter*, *Sodalis*, kvasinky rodov *Candida*, *Sacharomyces*, *Naumovozyma*, či vírusy patriace k *Nucleocytoviricota* ktoré sú bežnou súčasťou GIT viacerých zástupcov dvojkrídlavcov (kliešťov, komárov, múch).

Detegovali sme prítomnosť možných patogénov alebo parazitov ako sú *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma*, *Rickettsiales*, *Bacillus*, *Bartonella*, *Clostridium*, *Corynebacterium* či entomopatogénny rod *Betabaculovirus*. Signifikantne najväčšie zastúpenie nájdených potenciálnych patogénov bolo v kuklorodkách rodu *Lipoptena* v porovnaní s *Hippobosca* a *Ornithomya*. Získané výsledky poukazujú na to, že kuklorodky môžu prenášať patogény, ktoré by mohli vyvolať infekčné ochorenia u vtákov a cicavcov s následným prenosom aj na človeka a ich monitoring je preto žiadúci.

PodĎakovanie

Predložená práca vznikla vďaka finančnej dotácii z projektov APVV 16-0411 a VEGA 1/0404/19.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Petersen F. T., Meier R., Kutty S. N., et al. (2007) Mol. Phylogenet. Evol. 45, p. 111
- [2] Oboňa J., Sychra O., Greš S., et al. (2019) ZooKeys 862, p. 129
- [3] Šochová E., Husník F., Nováková E., et al. (2017) PeerJ. 5, p. 4099
- [4] Gałęcki R., Jaroszewski J., Bakuła T., et al. (2021) Pathogens 10, p. 324
- [5] Cirimotich C., Ramirez J., Dimopoulos G., (2011) Cell Host Microbe 10, p. 307
- [6] Pimentel A., Cesar C., Martins M. (2021) Front. Immunol., 11, p. 3690
- [7] Bezerra-Santos M., Otranto D. (2020) Acta Trop., p. 209
- [8] Harrison R., Herniou E., Jehle J., et al. (2018) J. Gen. Virol. 99 (9), p. 1185
- [9] Klimov P., Chetverikov P., Dodueva I., et al. (2022) Sci. Rep. 12(1), p. 1
- [10] MacLachlan J., Dubovi E. (2017) Retroviridae. In: MacLachlan J., Dubovi E. Fenner's (ed.) Veterinary Virology (Fifth Edition). Academic Press, Massachusetts, USA, p. 269
- [11] Malassigné S., Minard G., Vallon L., et al. (2021) Microorganisms. 9, p. 1552

Charakterizácia mutantných foriem katalázy-peroxidázy z *Archaeoglobus fulgidus* AfKatG

Alexandra Křížová, Eva Struhárňanská, Miroslav Dolník

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
alexandra.krizova@uniba.sk

Abstract

Characterization of mutant forms of catalase-peroxidase from *Archaeoglobus fulgidus* AfKatG

Catalases-peroxidases are bifunctional enzymes with great catalase activity and substantial peroxidase activity. Mutant forms of AfKatG were prepared to lose catalase activity but only Mut2AfKatG lost it completely. We analysed the kinetics of this form AfKatG to determine which substrate is the best to degrade with thermostable catalase-peroxidase AfKatG. Besides we also determined peroxidase activity for wild-type and mutant forms of the enzyme for every studied substrate.

Keywords: catalase-peroxidase; *Archaeoglobus fulgidus*; kinetics

Úvod a formulácia cieľa

Katalázy-peroxidázy (KatG) patria do prvej triedy rastlinných, fungálnych a bakteriálnych peroxidáz [1]. Ich hlavnou úlohou je ochrana baktérií proti oxidačnému stresu, s ktorým súvisí aj štiepenie peroxidázových väzieb v hydroperoxidoch. Ako už z názvu vyplýva, KatG sú bifunkčné enzýmy s významnou katalázovou aktivitou a slabšou peroxidázovou aktivitou. V oblasti prostetickej skupiny, protoporfyrínu IX, sa nachádzajú konzervované aminokyselinové zvyšky, rovnaké pre peroxidázy triedy I. Špecifická väzba aminokyselín vyskytujúca sa len v KatG umožňuje heterolyticky štiepiť peroxid vodíka na vodu a kyslík [2,3]. Katalytický cyklus štiepenia peroxidu je podobný peroxidázam, kedy dochádza k vzniku zlúčenín I a II, resp. III. Počas vzniku týchto zlúčenín nastáva výmena voľných elektrónov medzi atómom hémového železa a vhodným substrátom za vzniku vody a príslušného substrátového produktu [4]. Látky aromatickej povahy sú dobrým substrátom KatG a využívajú sa v rôznych odvetviach priemyslu. Ich rozkladom v prítomnosti peroxidu vodíka vznikajú menej toxické a nesolubilné produkty, ktoré je možno lepšie spracovávať [5].

Kataláza-peroxidáza z *Archaeoglobus fulgidus* (AfKatG) bola izolovaná z termofilného archeónu, vďaka čomu je stabilná aj pri teplotách okolo 80 °C. Skladá sa z dvoch podjednotiek s veľkosťou 85 kDa [6]. Bodovými mutáciami v oblasti aktívneho miesta boli vytvorené mutované formy enzýmu, Mut1AfKatG a Mut2AfKatG. Cieľom týchto mutácií bolo inaktivovať katalázovú aktivitu a posilniť peroxidázovú aktivitu [7].

V práci sme charakterizovali a stanovili rýchlosť premeny substrátu na produkt na rozličných substrátoch s využitím mutovaných foriem AfKatG a ako kontrolu sme využili divý typ AfKatG.

Materiál a metódy

Kinetické parametre k_{cat} a K_m a peroxidázovú aktivitu mutovaných a nemutovaného typu AfKatG katalázy-peroxidázy sme zaznamenali spektrofotometricky ako nárast absorbancie v čase pri vlnovej dĺžke špecifickej pre použitý substrát (Tab. 1). Reakčná zmes obsahovala fosfátový tlmivý roztok (pH = 4,5) s koncentráciou 50 mM, peroxid vodíka s koncentráciou 2 mM a 1 μ l enzýmu s koncentráciou 2 mg/ml. Meranie prebiehalo 120 sekúnd a pri stanovení kinetických parametrov sme použili aspoň štyri rozdielne koncentrácie na zabezpečenie kvalitného výsledku. Následne sme využili algoritmus Metropolis-Hastings založený na Bayeovskej štatistike. Štatistika je súčasťou balíčka EKMCMC (<https://CRAN.R-project.org/package=EKMCMC>), spolu s balíčkom sme využili model celkovej aproximácie kvázi ustáleného stavu (tQSSA) [8]. Merania sa uskutočnili na prístroji UV-1800 UV VIS Spectrophotometer (SHIMADZU) vo viacerých opakovaniach a boli vyhodnotené pomocou softvéru UV Probe Ver. 2.42 (Shimadzu).

Tab. 1. Zoznam použitých substrátov.

Substrát	Vlnová dĺžka (nm)	Molárny absorpčný koeficient ($M^{-1}.cm^{-1}$)	Výsledná koncentrácia (mM)
ABTS	420	36 000	0,9
o-fenyléndiamín	450	21 380	1,0
o-dianizidín	460	11 300	0,3
hydrochinón	242	21 000	0,3
veratryl alkohol	310	9 300	0,2

Výsledky a diskusia

Porovnávali sme kinetiku divého typu a dvoch mutovaných foriem katalázy-peroxidázy AfKatG pri premene vybraných substrátov na produkt. Výsledkom bodových mutácií v oblasti aktívneho miesta bola strata katalázovej aktivity a zosilnenie peroxidázovej aktivity. Analýzou katalázovej aktivity sme dokázali významnú aktivitu pri divom type a Mut1AfKatG. Na základe týchto výsledkov sme zaradili túto mutovanú formu medzi kontrolu a ďalej sme pracovali len s formou Mut2AfKatG.

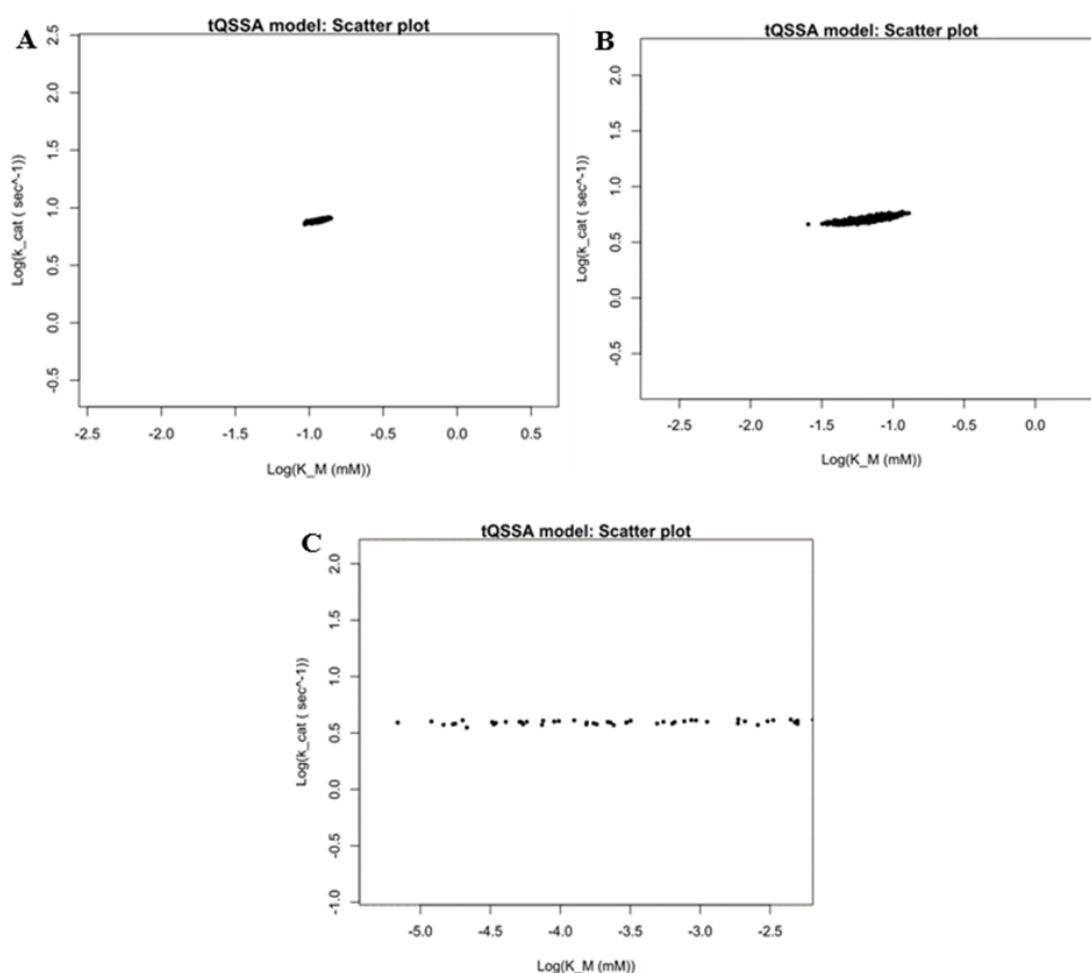
Kinetické parametre sme určili pomocou balíčka EKMCMC pre všetky formy enzýmu pre substrát ABTS (Obr.1). Výsledky nemutovanej formy a Mut1AfKatG však boli nepresné a hodnota K_m nezodpovedala použitému substrátu. Dôvodom nepresnosti bola prítomnosť peroxidu vodíka ako kosubstrátu, ktorý bol primárne spotrebovávaný katalázovou aktivitou. Preto sme na stanovenie kinetických parametrov používali Mut2AfKatG. Výsledné hodnoty Michaelis-Mentenovej konštanty K_m a katalytickej konštanty k_{cat} sa líšili vzhľadom na použitý substrát, pretože pre správnu funkciu enzýmu je potrebný prenos elektrónov substrátu do aktívneho miesta enzýmu. Najvyššia nameraná rýchlosť bola zaznamenaná pre substráty hydrochinón ($40,38 \text{ s}^{-1}$), o-fenyléndiamín ($8,641 \text{ s}^{-1}$), ABTS ($7,758 \text{ s}^{-1}$) a relatívne vysoká pre o-dianizidín ($2,755 \text{ s}^{-1}$) (Tab.2). V porovnaní s našimi výsledkami pre mutovanú formu sú hodnoty k_{cat} a K_m pre divý typ AfKatG odlišné. V práci [9] študovali divý typ AfKatG, na určenie kinetických parametrov použili substrát ABTS a získali vyššie hodnoty. V rámci tejto práce sme testovali mutovanú formu AfKatG, a preto sú namerané hodnoty mierne odlišné. V prípade veratryl alkoholu nebolo možné kinetické konštanty zmerať. Zatiaľ neboli napísané publikácie, ktoré stanovujú peroxidázovú aktivitu a kinetické parametre pre veratryl alkohol v prítomnosti katalázy-peroxidázy AfKatG. V práci [10], v ktorej bola skúmaná lignín peroxidáza pre rovnaký substrát, sa však podarilo stanoviť kinetické konštanty nasledovne, $K_m = 54 \text{ } \mu\text{M}$ a $k_{cat} = 0,8 \text{ s}^{-1}$, čo môžeme vysvetliť rozdielnym mechanizmom účinku lignín peroxidáz.

Tab. 2. Zhrnutie kinetických parametrov pre substráty a stanovená peroxidázová aktivita pre formy AfKatG.

Namerané hodnoty k_{cat} a K_m sú stanovené pre Mut2AfKatG a peroxidázová aktivita pre jednotlivé mutované formy a divý typ katalázy-peroxidázy AfKatG.

			Peroxidázová aktivita (U/mg)		
Substrát	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	Mut2AfKatG	Mut1AfKatG	divý typ AfKatG
ABTS	7,758	0,116	10,28	8,57	7,66
o-fenyléndiamín	8,641	9,533	1,69	0,88	0,68
o-dianizidín	2,755	0,236	4,84	4,28	2,53
hydrochinón	40,38	0,39	34,7	1,69	2,92
veratryl alkohol	-	-	0,13	0,09	0,11

Zároveň sme stanovili aj hodnotu peroxidázovej aktivity pre ostatné formy enzýmu na jednotlivých substrátoch. Najvyššie hodnoty peroxidázovej aktivity boli namerané u katalázy-peroxidázy Mut2AfKatG pre substráty hydrochinón (34,7 U/mg), ABTS (10,28 U/mg) a o-dianizidín (4,84 U/mg), čo potvrdzuje účinnú mutáciu a posilnenie peroxidázovej aktivity. Nižšiu, ale významnú aktivitu sme zaznamenali v prípade o-fenyléndiamínu (1,69 U/mg). V porovnaní s našimi nameranými aktivitami pre ABTS a o-dianizidín sa aktivity v publikácii [6, 9] výrazne nelíšili. Naše hodnoty sú trochu vyššie, nakoľko Mut2AfKatG má silnejšiu peroxidázovú aktivitu. Veľmi nízka peroxidázová aktivita bola stanovená pre veratryl alkohol (0,13 U/mg). V publikácii [10] sa nepodarilo určiť presnú aktivitu pre veratryl alkohol, hoci bol použitý iný typ peroxidázy. Rovnako však autori uvádzajú, že pri pH 5,0 je peroxidázová aktivita veľmi blízko nule a v našich podmienkach sme pracovali pri pH 4,5.



Obr. 1 Výstupy z balíčka EKCMCM po simulácii tQSSA modelu pre substrát ABTS. Mut2AfKatG (A); Mut1AfKatG (B); divý typ AfKatG (C).

Záver

Charakterizovali sme mutované formy katalázy-peroxidázy AfKatG a stanovili kinetické parametre Mut2AfKatG pre vybrané substráty.

PodĎakovanie

Príspevok je výsledkom realizácie projektov APVV-17-0333, APVV-20-0284 a LISPER (ITMS2014:313011V446) na základe podpory operačného programu Integrovaná infraštruktúra financovaného z ERDF.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Wellinder K. G. (1992) *Curr. Opin. Struc. Biol.* 2(3), p. 388
- [2] Zámocký M, Obinger C. (2010) Molecular phylogeny of heme peroxidases. In: Torres E., Ayalla M. (ed.) *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases: Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts*. Springer, Heidelberg, p. 7
- [3] Ghiladi R. A., Medzihradsky, K. F., Ortiz de Montellano P. R. (2005) *J. Biol. Chem.* 44(46), p. 22651
- [4] de Montellano P.R.O. (2010) Catalytic mechanisms of heme peroxidases. In: Torres E., Ayalla M. (ed.) *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases: Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts*. Springer, Heidelberg, p. 79
- [5] Bhunia A., Durani S., Wangikar P. P. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 72(5), p.562
- [6] Kengen S.W., Bikker F.J., Hagen W.R., et al. (2001) *Extremophiles* 5, p. 323
- [7] nepublikované
- [8] Choi B., Rempala G.A., Kim J.K. (2017) *Sci. Rep.* 7(1), p. 17018
- [9] Sing R., Wiseman B., Deemagarn T., et al. (2008) *Arch. Biochem. Biophys.* 471(2), p. 207
- [10] Tien M., Kirk T.K., Bull C., et al. (1986) *J. Biol. Chem.* 261(4), p. 1687

Ektomykorízne huby ako rezervoár peroxidázových génov

Bohuš Kubala¹, Peter Ferianc¹, Andrej Poljovka¹, Marcel Zámocký^{1,2}

¹*Laboratórium fylogenomického ekológie Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Ústav molekulárnej biológie, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovenská republika; kubala37@uniba.sk*

²*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra anorganickej chémie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika*

Abstract

Ectomycorrhizal fungi as a reservoir of diverse peroxidase genes

Peroxidases are metalloenzymes capable of participating in oxidation reactions that take place in the presence of peroxides. In this work, we are devoted to the identification of fungal species from mushroom fruiting bodies from different parts of Slovakia and from soil samples that originate exclusively from the Badín primeval forest, which is characterized by a highly preserved environment. This makes it possible to identify a wide spectrum of ectomycorrhizal fungi. However, the main goal is the search and discovery of new peroxidase genes from certain identified ectomycorrhizal fungi. Searching for novel peroxidase genes is important, as they are enzymes that, with their properties, find use in various biotechnological industries and in green biotechnology. We managed to identify mainly heme thiolate peroxidase genes known also as peroxygenases, which will be the subject of our research in further works.

Keywords: peroxidase; bioinformatics; enzymology; fungi; sequencing; PCR

Úvod a formulácia cieľa

Peroxidázy sú druhou najväčšou triedou enzýmov, ktoré majú využitie v biotechnologických odvetviach. Zaraďujú sa medzi oxidoreduktázy, ktoré sú schopné katalyzovať rôzne oxidačné reakcie v prítomnosti peroxidov [1].

Peroxidázové enzýmy sú využiteľné v bioenergetike, degradácii huminových kyselín, celulózovom priemysle, degradácii priemyselných farbív a podobne. Z hľadiska znečistenia životného prostredia majú schopnosť degradovať polutanty ako sú ropné uhľovodíky, pesticídy a herbicídy, dioxíny a iné. Funkcia peroxidáz závisí aj od ich pôvodu alebo zdroja [1].

Špecifická bioinformatická databáza zameraná najmä na peroxidázy a katalázy sa nazýva PeroxiBase (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>). Jej hlavná úloha je v klasifikácii získaných sekvencií (z rôznych genómových projektov a z metagenomiky) do peroxidázových rodín a superrodín. Nedávno boli do tejto databázy pridané nové funkcie a nástroje na analýzu [2] a je neustále aktualizovaná.

BLAST alebo Basic Local Alignment Search Tool je jedným z najviac využívaným nástrojom vyhľadávania a zarovnávanie sekvencií. Do BLASTu zadávame nukleotidovú alebo proteínovú sekvenciu ako vstup a ten ju vyhledá voči databáze nukleotidových alebo proteínových sekvencií [3].

BioEdit je jedným z najfrekvencovanejších programov používaných pri bioinformatických analýzach v molekulárnej biológii. Zahŕňa pôvodné možnosti ako sekvenačné zarovnanie, jednoduché manuálne zarovnania, zobrazovanie rozdelených okien, ale aj novšie funkcie ako napríklad anotácia a kreslenie plazmidov, restriktčné mapovanie a iné [4].

Cieľom tejto práce bolo vyhľadať a identifikovať rôzne druhy ektomykorizných húb, a tiež objaviť nové peroxidázové gény z identifikovaných fungálnych genómov.

Materiál a metódy

Z hubových plodníc boli izolované genómy pomocou Thermo Scientific® GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit (Cat. No. K0702, Thermo Fisher Scientific®, Litva) a z pôdných vzoriek boli izolované metagenómy pomocou DNeasy® PowerMax® Soil Kit (10), (Cat. No. 12988-10, Qiagen GmbH®, Nemecko). Genomická, respektíve metagenomická DNA bola použitá ako templát pri PCR amplifikácii s príslušnými primermi. Na identifikáciu druhov boli použité primery ITS a NL (Tab. 1). Za účelom amplifikácie peroxidázových génov boli použité rôzne primery navrhnuté podľa známeho peroxidázového génu *Suillus luteus*. Na amplifikáciu konzervovaného úseku kódujúceho katalytické jadro enzýmu boli použité primery SlutHTP4aFwd a SlutHTP4aRev (Tab. 1). Za účelom amplifikácie kompletných peroxidázových génov sa použili primery SlutHTP4cFwd a SlutHTP4cRev (Tab. 1). Na amplifikáciu génu bez intrónov sme použili rovnake primery a postup PCR, avšak ako templát bola použitá cDNA získaná prepisom celkovej RNA pomocou Thermo Scientific® Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase (Ref. No. K1671, Thermo Fisher Scientific®, Litva). Celková RNA bola získaná pomocou RNeasy® PowerSoil® Total RNA Kit (25) (Cat. No. 12866-25, Qiagen GmbH®, Nemecko).

PCR produkty boli elektroforeticky separované a následne extrahované z agarózového gélu pomocou Monarch® DNA Gel Extraction Kit, (Cat. No. #T1020S, New England Biolabs® Inc., USA). Prečistené PCR produkty s príslušnou veľkosťou boli klonované do plazmidu, ktorý je súčasťou Zero Blunt® TOPO® PCR cloning Kit for Sequencing, (Cat. No. 450031, Invitrogen™, USA) a následne nimi boli transformované chemicky kompetentné bunky baktérie *Escherichia coli* One Shot® TOP10 (Cat. No. 450031, Invitrogen™, USA), ktoré boli vysiaté na Petriho misky s tuhým LB médiom s kanamycínom. Inkubovali sme ich cez noc pri 37 °C. Rekombinanty sme od transformantov bez inzertu rozoznali na základe modro-bieleho skrínungu, kedy boli na tuhé LB pôdy na Petriho miskách aplikované IPTG a X-gal. Biele kolónie boli odobrate a následne roztréť na väčšiu plochu na tuhom LB médiu s

kanamycínom v novej Petriho miske. Tie boli rovnako inkubované cez noc pri 37 °C. Z vyrastených rekombinantov sme inokulovali 5 ml tekutého LB média s kanamycínom, ktoré bolo inkubované cez noc pri 37 °C. Následne sa nočná kultúra centrifugovala a izolovali sme z nej rekombinantný plazmid, pričom bola použitá laboratórna súprava Monarch® Plasmid Miniprep Kit (Cat. No. #T1010L, New England Biolabs® Inc., USA).

Tab. 1. Prehľad použitých primerov v práci – Primery použité pri identifikácii fungálnych druhov, fungálnych peroxidáz a pri ich sekvenovaní

Názov primeru	Sekvencia (5'-3')	Orientácia	Dĺžka (bp)	Zdroj
ITS_1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Priamy (Forward)	19	[5]
ITS_4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Reverzný (Reverse)	20	[5]
NL_1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAG	Priamy (Forward)	24	[6]
NL_4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	Reverzný (Reverse)	19	[6]
M13 Forward	GTAAACGACGGCCAG	Priamy (Forward)	16	Zero Blunt® TOPO® PCR cloning Kit for Sequencing, (Cat. No. 450031, Invitrogen™, USA)
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	Reverzný (Reverse)	17	Zero Blunt® TOPO® PCR cloning Kit for Sequencing, (Cat. No. 450031, Invitrogen™, USA)
SlutHTP4aFwd	CCTTGTCAGCACTCAATGCACTTGC	Priamy (Forward)	26	Táto práca
SlutHTP4aRev	TGCATGAACGAGGGATGCGTCGTGTTC	Reverzný (Reverse)	27	Táto práca
SlutHTP4cFwd	ATGTCGACTCCAAATTGGACCTGTCCACCT	Priamy (Forward)	30	Táto práca
SlutHTP4cRev	TTATGAATCGCACGTAAGTATTGTCCTTAAACCCA	Reverzný (Reverse)	35	Táto práca

Vyizolovaný rekombinantný plazmid bol zaslaný na sekvenovanie, ktoré sprostredkovala spoločnosť Eurofins Genomics (Nemecko). Do centrifugačnej mikroskúmavky označenej barkódom sme napipetovali 7,5 µl rekombinantného plazmidu a 2,5 µl primer M13 Forward alebo M13 Reverse (Tab. 1).

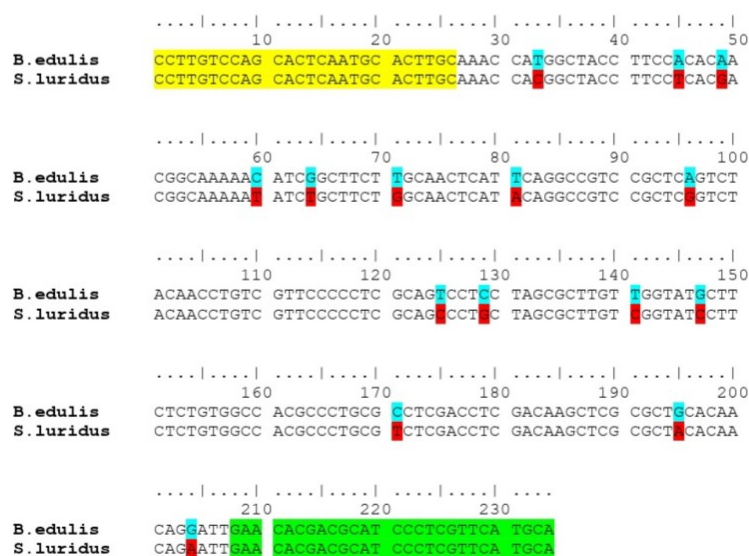
Výsledne dáta zo sekvenovania sme spracovali v programe BioEdit, kde sme sekvencie obsahujúce plazmidovú DNA odstránili na základe ohraničenia cieľovej sekvencie primermi použitými v PCR reakcii. Sekvencie boli následne zarovnané pomocou funkcie Pairwise

Alignment nachádzajúcej sa v programe BioEdit.

V bioinformatickom nástroji BLAST (NCBI) sme priradili k danej sekvencii najviac podobný výsledok. ITS a NL sekvencie boli vyhodnocované pomocou Nucleotide BLAST a sekvencie získané z PCR amplifikácie so sériami primerov SlutHTP4a a SlutHTP4c boli vyhodnotené prostredníctvom nástroja blastX.

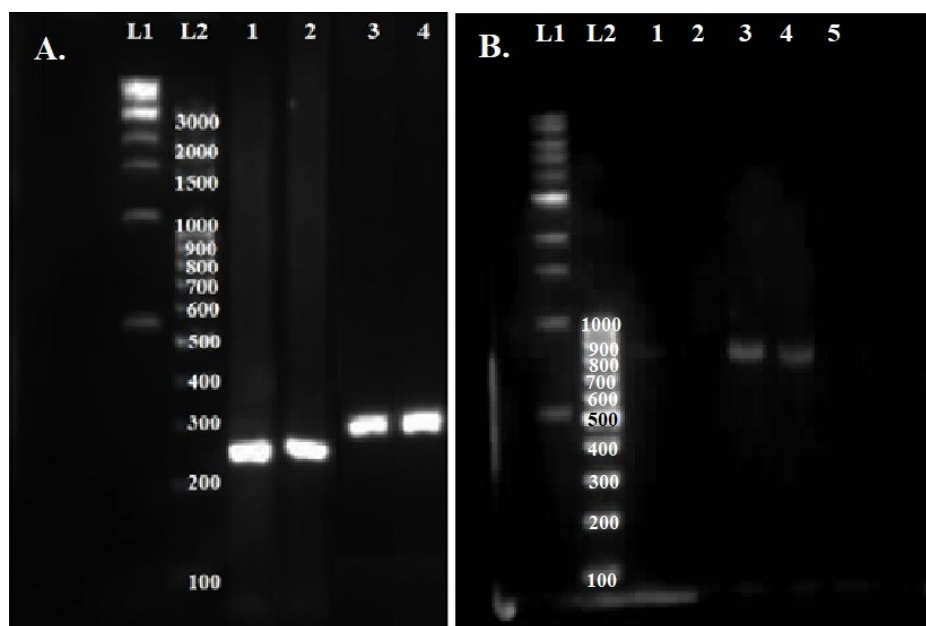
Výsledky a diskusia

Pomocou Sangerovho sekvenovania a bioinformatických analýz sa nám podarilo z klonovaných PCR produktov identifikovať 8 fungálnych druhov z hubových plodníc. Išlo o druhy *Phaeoclavulina alboapiculata*, *Suilellus luridus*, *Xerocomellus pruinatus*, *Boletus pinophilus*, *Lactarius deterrimus*, *Boletus edulis*, *Agaricus benesii* a *Suillus fluryi*. Rovnako sa nám podarilo identifikovať 13 druhov ektomykoríznych húb, ku ktorým patria *Inocybe cookei* (AM882952), *Oudemansiella* (MT272119), *Russula laurocerasi* (E00290481, KF245533), *Sebacina endomycorrhiza* L7-09 (AF440655), Uncultured *Atheliaceae* clone FOM_g09 (HM488525), Uncultured *Russula* clone RELIS K5 D05 (JF519199), Uncultured *Russula* (LS987353), Uncultured *Sebacina* isolate TUB 019403 (HQ154311), Uncultured soil fungus clone BD92, (JQ666715), *Clavulinaceae* sp. LM3585 (KM576336), Uncultured soil fungus NCD_LSU_otu2339 (KF567309), Uncultured fungus clone GUYSOILG06 (JN890029) a *Fulvifomes* sp. XHJ-2021a isolate CLZhao 11692 (OM001212).



Obr. 1. Porovnanie konzervovaných sekvencií peroxidázových génov – porovnanie konzervovaných sekvencií peroxidázových génov z *Boletus edulis* a *Suilellus luridus* amplifikovaných pomocou SlutHTP4aFwd (žltá farba) a SlutHTP4aRev (zelená farba) primermi. Modrou a červenou farbou sú označené rozdiely na DNA sekvencií.

Tiež sa nám podarilo rovnakým spôsobom identifikovať časti peroxidázových génov z 2 génomov izolovaných z hubových plodníc (Obr. 2A), ktoré boli naamplifikované pomocou primerov SlutHTP4aFwd a SlutHTP4aRev. Tieto gény sa nám podarilo tiež získať bez intrónov (Obr. 1 a Obr. 2A) z vyzolovanej celkovej RNA, následnému reverznému prepisu a PCR amplifikácie so sériou primerov SlutHTP4a, kde bola ako templát použitá cDNA z predošlého reverzného prepisu. Pomocou primerov SlutHTP4cFwd a SlutHTP4cRev sa nám podarilo z genómu *Boletus edulis* amplifikovať celý peroxidázový gén (Obr. 2B), avšak doteraz sme nestanovili primárnu štruktúru tohto génu. V prípade *Boletus edulis* sa nám kompletný gén so sériou primerov SlutHTP4c nepodarilo amplifikovať. Pravdepodobne je to kvôli vysokej variabilite na 3' konci DNA medzi peroxidázovými génmi medzi zástupcami rodu *Boletus/Suillellus*.



Obr. 2. Výstup z elektroforetickej separácie PCR produktov v 1 % agarózovom géli. A. PCR produkty z reakcie so SlutHTP4aRev a SlutHTP4aFwd. B. PCR produkty z reakcie so SlutHTP4cRev a SlutHTP4cFwd – Obr.2A - L1: štandard molekulovej hmotnosti DNA 1kB, L2: Štandard molekulovej hmotnosti DNA 100 bp, Dráha 1: PCR produkt z cDNA zo *Suillellus luridus*, Dráha 2: PCR produkt z cDNA z *Boletus edulis*, Dráha 3: PCR produkt z genomickej DNA zo *Suillellus luridus*, Dráha 4: PCR produkt z genomickej DNA z *Boletus edulis*. Obr.2B - L1: štandard molekulovej hmotnosti DNA 1kB, L2: Štandard molekulovej hmotnosti DNA 100 bp, Dráha 1: PCR produkt zo *Suillellus luridus*, Dráha 2: PCR produkt zo *Suillellus luridus*, Dráha 3: PCR produkt z genomickej DNA zo *Boletus edulis*, Dráha 4: PCR produkt z genomickej DNA z *Boletus edulis*. Dráha 5: Negatívna kontrola.

Záver

Úspešne sa nám podarilo identifikovať 8 druhov húb z plodníc. Išlo o tieto druhy: *Phaeoclavulina alboapiculata*, *Suillellus luridus*, *Xerocomellus pruinosus*, *Boletus pinophilus*,

Lactarius deterrimus, *Boletus edulis*, *Agaricus benesii* a *Suillus fluryi*. Najzaujímavejšie pre túto prácu boli druhy *Boletus edulis* a *Suillellus luridus*. U nich sme preto pokračovali ďalej v identifikácii peroxidázových génov, ktoré sa nám podarilo úspešne amplifikovať PCR metódou a stanoviť ich primárnu štruktúru. Rovnako sa nám podarilo identifikovať viacero druhov húb z pôdných vzoriek pochádzajúcich z Badínskeho pralesa. U vybraných zástupcov budeme pokračovať v identifikácii peroxidázových génov.

PodĎakovanie

Our research was supported by the Slovak Grant Agency with project VEGA 2/0012/22 and by the Slovak Research and Development Agency with project APVV-20-0284.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Twala P. P., Mitema A., Baburam C., et al. (2020) AIMS Microbiol. 6(3), p. 330
- [2] Fawal N., Li Q., Savelli B., et al. (2013) Nucleic acids res. 41(Database issue) p. D441
- [3] Boratyn G. M., Camacho Ch., Cooper P. S., et al. (2013). Nucleic Acids Res. 41(W1), p. W29
- [4] Hall T., Biosciences I., Carlsbad C. J. G. B. B. (2011). GEF Bull. Biosci. 2(1), p. 60
- [5] White T. J., Bruns T., Lee S. J. W. T., et al. (1990). PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, Inc., San Diego, Calif. 18(1), p. 315
- [6] Kurtzman C. P., Robnett C. J. (1997). J. Clin. Microbiol 6(3), p. 330

Objasnenie funkcie proteínu Dbl2 v procese tvorby chromatinových štruktúr v bunkách *Schizosaccharomyces pombe*

Laura-Olivia Laláková¹, Alexandra Piteľová², Silvia Bágel'ová Poláková^{1,2}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;

lalakova.lauraolivia@gmail.com

²Centrum biovied Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Elucidation of the function of the Dbl2 protein in the formation process of chromatin structures in fission yeast

In *Schizosaccharomyces pombe* CENP-B homologues, encoded by three genes – *cbp1*, *cbh1* and *cbh2*, play an important role in regulating the expression of retrotransposons. These homologues are important for organizing the *Tf2* LTR retrotransposons into dynamic structures called *Tf bodies*. The formation of *Tf bodies* is initiated by Cbp1 protein. In this project we used different approaches to determine whether or not Dbl2 and Cbp1 play a role in the same process. Our results suggest, that Cbp1 and Dbl2 proteins in *S. pombe* may play a role in some processes together, but in other they work separately.

Keywords: retrotransposons; *Tf bodies*; CENP-B; *Schizosaccharomyces pombe*; *dbl2*

Úvod a formulácia cieľa

Mobilizácia retrotranspozónov *Tf1* a *Tf2* s LTR zo *Schizosaccharomyces pombe* je založená na reverznej transkripcii existujúceho retrotranspozónu a opätovnej integrácii do genómu. *Tf1* a *Tf2* sa však líšia od ostatných prvkov LTR v tom, že zhromažďujú častice podobné vírusu z jedného primárneho translačného produktu, iniciujú reverznú transkripciu neobvyklým spätným skladaním oligonukleotidov a v prípade *Tf1* sa integrujú prednostne do oblastí promótorov génov transkribovaných RNA pol II [1]. Aby sa zabránilo nestabilite chromozómov a poškodeniu genómu, ktoré je dôsledkom zvýšeného počtu kópií retroelementov v genóme, *S. pombe* využíva rôzne obranné mechanizmy, ktoré obmedzujú aktivitu retroelementov *Tf1* a *Tf2*. Jedným z týchto mechanizmov je proces skladania špecifických nukleoproteínových štruktúr nazývaných *Tf bodies*. *Tf bodies* sú štruktúry, ktoré riadia rozsah transkripcie genetickej informácie retroelementu z DNA do mRNA, čím bránia ich ďalšej propagácii [2].

Mnohé štúdie skutočne naznačujú, že expresia retrotranspozónov *Tf2* je regulovaná rôznymi faktormi, vrátane proteínov CENP-B [3], histón metyltransferázy Set1 [4], mnohých histón deacetyláz [3, 5, 6] a histón šaperónov HIRA a Asf1 [7 – 8] a Sap1 [9].

Umlčanie *Tf* sprostredkované CENP-B je čiastočne závislé od náboru multienzymového efektorového komplexu (SHREC), histón deacetyláz Clr6 a Clr3 (HDACs), ktoré sú tiež potrebné pre umlčanie centromerických opakovaní. Heterochromatín a CENP-B proteíny využívajú rovnaké faktory zabezpečujúce génovú represiu. Tento poznatok naznačuje, že regulácia *Tf* prostredníctvom CENP-B môže predstavovať „jednoduchú“ formu utlmenia heterochromatínu [3].

Proteíny CENP-B, najmä Cbp1, sa podieľajú aj na stabilizovaní zastavenej replikačnej vidlice v dôsledku väzby proteínu Sap1 na vlákno DNA. Počas replikácie LTR sa Sap1 naviaže na SAS1 sekvenciu a zastaví replikáciu. Replizóm nemôže pokračovať, čo pre bunku predstavuje zvýšené riziko vzniku genómovej nestability, v dôsledku ktorej môže dochádzať k zlomu a následnej rekombinácii. Cbp1 sa naviaže na replizóm, stabilizuje ho, a napomáha k reštartu vidlice náborom Cdc23 a Mst1 [10].

Dbl2 bol identifikovaný pri skríningu mutantov s defektom v segregácii chromozómov počas meiózy. Poláková a Molnárová a kol. (2016) zistili, že v neprítomnosti Dbl2 a Rad51 pretrvávajú medziprodukty opravy dvojitých zlomov a často bránia správnej segregácii chromozómov počas meiózy I [11].

Je známe, že represia *Tf2* alebo LTR, sprostredkovaná CENP-B je nezávislá od represívnej funkcie komplexu HIRA [3]. Pozitívna genetická interakcia medzi Dbl2 a HIRA naznačila, že Dbl2 a HIRA sa môžu podieľať na priebehu rovnakej dráhy utlmovania expresie v okolí LTR oblastí, ktorá by mohla byť odlišná od utlmovania *Tf2* pomocou CENP-B [3]. Z predchádzajúcich experimentov pracovnej skupiny S. Bágeľovej Polákovskej je známe, že proteín Dbl2 vytvára v jadre nešpecifikované ložiská, ktorých pôvod je nejasný [11]. Na základe týchto zistení spolu s nedávno publikovanými informáciami o zmenách expresie v oblasti LTR spôsobených deléciou génu *dbl2* [12] sme predpokladali, že Dbl2 by sa mohol podieľať na zostavovaní retroelementov do *Tf bodies*.

Materiál a metódy

Použité kvasinkové kmene *S. pombe*:

SP65	<i>h⁺, leu1-32 ura4D18 ade6-216 cbp1::NAT</i>
SP67	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 dbl2::CloneNAT (dbl2Δ)</i>
SP1185	<i>h⁺, sap1-48ts-3FLAG:kanMX6 dbl2::ClonNAT omn</i>
SP1275	<i>h⁹⁰, cbp1Δ (CRISPR)</i>
SP1339	<i>dbl2Δ cbp1Δ</i>

Mikroskopická analýza

Na krycie sklíčko sme naniesli 2 μ l poly-L-lyzínu, rozotreli po celom povrchu sklíčka a nechali uschnúť. Rozrastené bunkové kultúry transformantov exprimujúcich Dbl2-YFP sme sedimentovali centrifugáciou a pelet rozsuspendovali v 20 μ l destilovanej vody. Z takto pripravenej suspenzie sme odobrali 3 μ l, ktoré sme rovnomerne naniesli na celý povrch krycieho sklíčka ošetreného poly-L-lyzínom. Na podložné sklíčko sme napipetovali 3 μ l *mounting* média (obsahujúce DAPI) a prekryli pripraveným krycím sklíčkom tak, aby boli bunky ponorené v médiu. Pomocou priesvitného laku aplikovaného po okrajoch krycieho sklíčka sme zabezpečili preparát pred prípadným posunom alebo odlepením krycieho sklíčka. Preparáty sme skladovali pri 4°C a následne pozorovali pomocou fluorescenčného mikroskopu (Olympus IX83 s 60x PlanApo NA 1.42 (olejový imerzný objektív)).

Kvapkové testy

Pre kvapkové testy sme pripravili 10-násobné sériové riedenia kultúr v exponenciálnej fáze rastu, ktoré sme naniesli na médiá s prídavkom rôznych mutagénov. Bunky boli vykvapkané v počte 10^5 , 10^4 , 10^3 a 10^2 buniek v jednej kvapke na YES médium, YES médium s prídavkom kamptotecínu (CPT, 4 μ M), hydroxyurei (HU, 7 mM) a metyl metánsulfonátu (MMS, 0,0075 %). Riedené kultúry sme kvapkali pomocou prístroja Liquidator96 (Rainin) a experiment vyhodnocovali po 3 dňoch kultivácie pri 30°C.

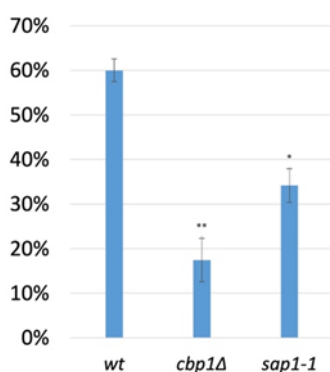
Kvantitatívna PCR

Na izoláciu RNA z buniek nachádzajúcich sa v exponenciálnej fáze rastu sme použili komerčnú súpravu *GeneJET RNA Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific), pre odstránenie zvyškov DNA z RNA vzoriek komerčnú súpravu *RapidOut DNA Removal Kit* (Thermo Fisher Scientific) a na prepis RNA do cDNA komerčnú súpravu *LunaScript RT SuperMix Kit* (New England Biolabs). Na detekciu syntézy PCR produktu sme použili *FastStart Essential DNA Green Master Mix* (Roche) a qPCR cykler AriaMX (Agilent). Kvantitatívne vyhodnotenie sme uskutočnili pomocou AriaMX softvéru a Microsoft Excel. Naše zistenia sme štatisticky potvrdili T-testom.

Výsledky a diskusia

Mutantné kmene *cbp1* aj *sap1* sme transformovali plazmidom nesúcim Dbl2 vo fúzii s YFP (žltá fluorescenčná farbička) a pozreli sme sa na lokalizáciu Dbl2 v podmienkach, kedy sú tieto dva gény nefunkčné. Pri *sap1-1* sme pozorovali mierne znížený výskyt

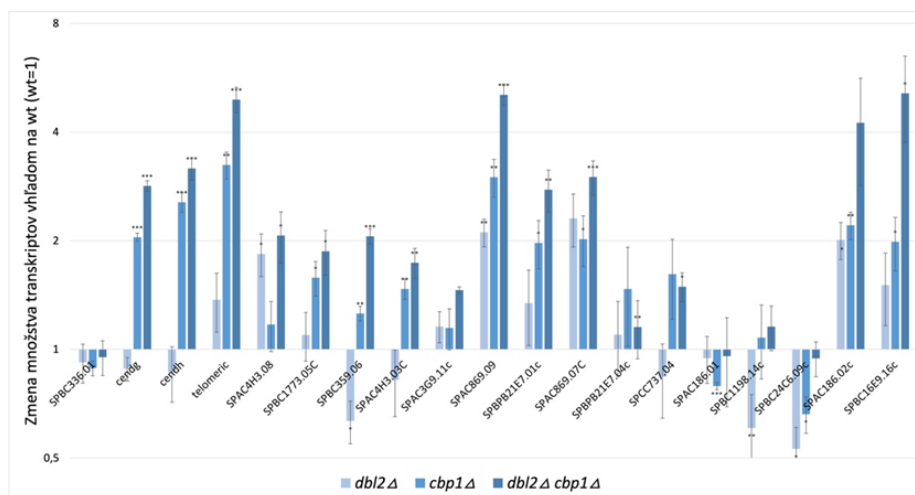
Dbl2-YFP značených fókusov (34,17 %) v porovnaní so štandardným kmeňom (59,99 %) (Obr. 1). Malý rozdiel medzi frekvenciou výskytu Dbl2-YFP u *sap1-1* a v bunkách štandardného kmeňa mohol byť spôsobený prípravou mutanta. *sap1* gén predstavuje esenciálny gén, ktorý nie je možné úplne odstrániť, a tak v našich experimentoch využívame len teplotne senzitívny kmeň. Časť buniek mohla preto obsahovať aj čiastočne funkčnú verziu Sap1 proteínu, ktorého prítomnosť mohla ovplyvniť finálny výsledok nášho experimentu. Pri *cbp1Δ* bola zmena frekvencia výskytu Dbl2-YFP ložísk omnoho výraznejšia – pokles na 17,43 % (Obr. 1). Z týchto výsledkov môžeme predpokladať, že mutácia *sap1* aj delécia *cbp1* ovplyvňuje výskyt Dbl2.



Obr. 1. Frekvencia výskytu Dbl2-YFP fókusov v bunkách štandardného kmeňa (wt), *cbp1Δ* a *sap1-1*
Výsledné hodnoty sú priemerom troch nezávislých replík. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)

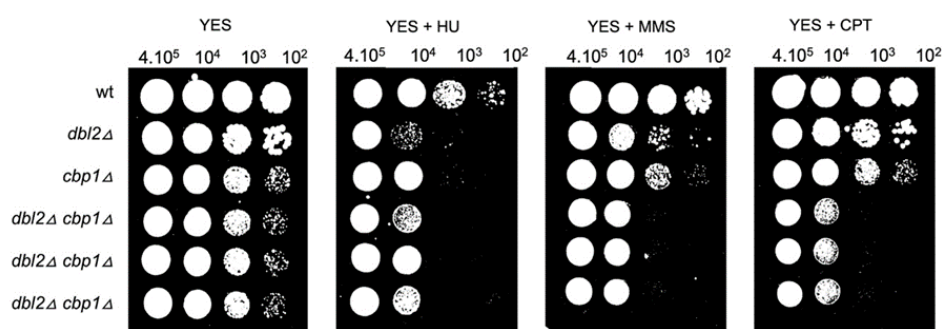
Ďalej sme sa rozhodli prioritne venovať spolupráci Cbp1 a Dbl2 nakoľko vykazoval signifikantnejšie výsledky pri mikroskopickej analýze. Z predchádzajúcich experimentov vieme, že delécia *dbl2* a *cbp1* ovplyvňuje expresiu podobného setu génov.

Preto sme sa pozreli na to, ako simultánna delécia *cbp1* a *dbl2* ovplyvňuje expresiu vybraných génov, o ktorých vieme, že ich expresia je zmenená u oboch jednoduchých mutantov. Ukázalo sa, že dvojité mutant vykazuje aditívny efekt na expresiu analyzovaných génov (Obr. 2), čo naznačuje, že Dbl2 a Cbp1 sa pravdepodobne nepodieľajú na priebehu rovnakej dráhy vedúcej k represii génovej expresie.



Obr. 2. Expresia kandidátnych génov v bunkách jednoduchých mutantov *dbl2Δ*, *cbp1Δ* a dvojitého mutantu *dbl2Δcbp1Δ* Výsledné hodnoty sú priemerom troch nezávislých replík a normalizované vzhľadom na referenčné gény (*act1*, *tbp1*). Expresia nameraná v bunkách štandardného kmeňa = 1. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)

V neposlednom rade sme pomocou kvapkových testov analyzovali citlivosť kmeňov na vybrané mutagény, teda sledovali rast jednoduchých a dvojitých mutantov na médiách s prídavkom rôznych mutagénov. Rast dvojitých mutantov v prítomnosti HU pripomínal rast jednoduchého *cbp1* mutantu, zatiaľ čo *dbl2* mutant vykazoval výraznejší rastový defekt (Obr. 3). Tento výsledok predstavuje pozitívnu genetickú interakciu. Hydroxyurea inhibuje aktivitu ribonukleotid reduktázy, ktorá umožňuje syntézu DNA a teda zastavuje bunky v S fáze. Naše výsledky naznačujú, že ako Dbl2, tak aj Cbp1 by sa mohli spoločne podieľať na procesoch súvisiacich s reštartom replikačnej vidlice.



Obr. 3. Analýza citlivosti kmeňov na mutagény Rast buniek jednoduchých mutantov *dbl2Δ*, *cbp1Δ* a dvojitého mutantu *dbl2Δcbp1Δ* na YES a YES doplnených o hydroxyureu (HU) (7 mM), metyl metánsulfonát (MMS) (0,0075 %) a kamptotecín (CPT) (4 μ M) sme vyhodnocovali po 3 dňoch kultivácie pri 30°C

Ďalším mutagénom bol kamptotecín, ktorý inhibuje aktivitu topoizomeráz, a tak vzniká pnutie, ktorého výsledkom je zlom molekuly DNA. V tomto prípade môžeme

pozorovať, že jednoduchí mutanti rástli lepšie ako dvojité, čo hovorí o negatívnej genetickej interakcii. Negatívna genetická interakcia naznačuje, že Dbl2 a Cbp1 môžu v tomto prípade figurovať v dvoch odlišných molekulárnych dráhach. Posledný bol metyl metansulfonát, ktorý metyluje guanín a adenín, čím spôsobuje nesprávne párovanie báz a zastavuje replikačnú vidlicu. Opäť jednoduchí mutanti rástli lepšie ako dvojité, čo aj v tomto prípade svedčí o dvoch odlišných dráhach (Obr. 3).

Záver

Delécia génu *cbp1* a mutácia génu *sap1* znižujú množstvo fokusov proteínu Dbl2-YFP v bunkách, čo naznačuje, že Dbl2 by mohol byť zapojený v rovnakej dráhe ako Cbp1 a Sap1. Čo sa týka génovej expresie, dvojité mutanti vykazovali aditívny efekt v porovnaní s jednoduchými mutantmi, najmä v prípade génov umiestnených v blízkosti LTR, čo hovorí o dvoch separátnych molekulárnych dráhach. Podobný výsledok sme získali aj v prípade analýzy citlivosti voči CPT a MMS. Avšak v prípade zastavenia replikačnej vidlice spôsobeného v dôsledku prítomnosti HU by mohli byť zapojené v jednej molekulárnej dráhe vedúcej k jej stabilizácii alebo reštartu.

PodĎakovanie

Tento projekt vznikol vďaka finančnej podpore APVV-21-210 grantu.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Esnault C., Levin H. L. (2015) Microbiol. Spectr. 3(4), p. 997
- [2] Latchman D. S. (1997) Int. J. Biochem. Cell. Biol. 29(12), p. 1305
- [3] Cam H. P., Noma Ki., Ebina H., et al. (2008) Nature 451, p. 431
- [4] Lorenz D. R., Mikheyeva I. V., Johansen P., et al. (2012) Mol. Cell. Biol. 32, p. 4215
- [5] Hansen K. R., Burns G., Mata J., et al. (2005) Mol. Cell. Biol. 25, p. 590
- [6] Durand-Dubief M., Sinha I., Fagerstrom-Billai F., et al. (2007) EMBO J. 26, p. 2477
- [7] Greenall A., Williams E. S., Martin K. A., et al. (2006) J. Biol. Chem. 281, p. 8732
- [8] Anderson H. E., Wardle J., Korkut S. V., et al. (2009) Mol. Cell. Biol. 29, p. 5158
- [9] Hickey A., Esnault C., Majumdar A., et al. (2015) Genetics 201(3), p. 905
- [10] Zaratiegui M., Vaughn M. W., Irvine D. V., et al. (2011) Nature 469(7328), p. 112
- [11] Poláková S., Molnárová L., Hyppa R. W., et al. (2016) PLoS Genet. 12(6), p. e1006102
- [12] Misova I., Pitelova A., Budis J., et al. (2021) Nucleic Acids Res. 49(4), p. 1914

Kondicionané médium z adipocytov izolovaných z karcinómu prsníka zvyšuje expresiu karbonickej anhydrázy IX

Jana Lapinová, Martina Takáčová

*Virologický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Biomedicínske centrum, Oddelenie nádorovej biológie, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika;
jlapinova1@gmail.com*

Abstract

Conditioned media gained from adipocytes isolated from breast cancer increases the expression of carbonic anhydrase IX

Adipocytes produce a variety of cytokines, growth hormones, and adipokines. Some of the adipokines that are overproduced during obesity play a role in tumorigenesis, invasion, and metastatic spread of the tumour mass. Moreover, excess body fat results in the development of hypoxia. Hypoxia-inducible transcription factor 1 activates the adaptive responses of cells to hypoxia, including the increased expression of carbonic anhydrase IX (CA IX). CA IX is strongly associated with the poor cancer prognosis and resistance to therapy. The aim of our work was to investigate the effect of conditioned medium gained from adipocytes on the expression of the tumour-associated biomarker CA IX in breast and colorectal cancer cells.

Keywords: *carbonic anhydrase IX; hypoxia; obesity; colorectal cancer; breast cancer; conditioned media*

Úvod a formulácia cieľa

Obezita je jedným z hlavných problémov dnešného zdravotníctva. Bolo preukázané, že toto ochorenie zvyšuje riziko vzniku viacerých typov nádorov, vrátane karcinómu prsníka a kolorektálneho karcinómu [1]. Tukové tkanivo, pozostávajúce prevažne z adipocytov, má okrem ukladania prebytočnej energie aj metabolickú a endokrinnú funkciu, pričom produkuje hormóny, cytokíny, rastové faktory a adipokíny. Faktory produkované adipocytmi preukázateľne regulujú expresiu génov spojených s nádorovou progresiou (adhézia, invázia, angiogenéza a apoptóza) v nenádorových bunkách prsníka, čo naznačuje ich úlohu v iniciácii karcinogenézy [2]. Okrem toho bolo popísané, že kondicionané médium z adipocytov prispieva k zníženiu senzitivity nádorových buniek na terapeutiká v bunkách odvodených z karcinómu prsníka [3].

Nádory pozostávajú z nádorových a zdravých buniek, spoločne koexistujúcich v hypoxickom, na živiny chudobnom mikroprostredí. K adaptívnej odpovedi na hypoxiu patrí okrem prepnutia buniek z aeróbnej glykolýzy na anaeróbnú aj aktivácia hypoxiou-indukovaného transkripčného faktora 1 (HIF1). HIF1 je heterodimér pozostávajúci z konštitutívne exprimovanej β a hypoxiou-indukovanej α podjednotky. V podmienkach hypoxie dochádza k dimerizácii oboch podjednotiek a následne k väzbe na hypoxia-responzívne elementy viacerých génov, napríklad karbonickej anhydrázy IX (CA IX) [4].

CA IX je transmembránový glykoproteín katalyzujúci reverzibilnú premenu CO_2 a H_2O na H^+ a HCO_3^- . Pozostáva z N-terminálnej proteoglykánovej domény, katalytickej domény, transmembránovej domény, a intracelulárnej C-koncovkej časti. Vyskytuje sa vo viacerých typoch solídnych nádorov, pričom prispieva k acidifikácii extracelulárneho mikroprostredia, ktorá má za následok zvýšenú migráciu a invazívnosť nádorových buniek [5]. Zároveň CA IX prispieva k neutralizácii vnútrobunkového pH hypoxických nádorových buniek. Prítomnosť proteínu CA IX v nádorových bunkách súvisí s ich agresívnejším fenotypom a je taktiež spojená so zlou prognózou u pacientov s rakovinou a rezistenciou na chemoterapiu [6].

Cieľom našej práce bolo sledovať vplyv kondicionovaného média získaného z adipocytov na expresiu CA IX v bunkových líniiach derivovaných z karcinómu prsníka a kolorektálneho karcinómu. Vzhľadom k tomu, že expresia CA IX úzko súvisí s hladinou HIF1, bol sledovaný aj vplyv kondicionovaného média na α podjednotku tohto proteínu. Predpokladáme, že nové poznatky o vplyve média produkovaného adipocytmi na nádorové bunky v kontexte hypoxie by mohli prispieť k hlbšiemu pochopeniu mechanizmov zodpovedných za vzťah medzi obezitou a nádorovými ochoreniami.

Materiál a metódy

Bunkové línie: HCT116 (ATCC® CCL-247) predstavuje bunkovú líniu izolovanú z kolorektálneho karcinómu. Na jej kultiváciu bolo použité DMEM, ktoré obsahovalo 10% fetálneho teľacieho séra (FCS) a 0,1% gentamicínu. Lúnia ZR-75-1 (ATCC® CRL-1500), ktorá je izolovaná z pacientky s karcinómom prsníka, bola kultivovaná v RPMI s prídavkom 10% FCS a 0,1% gentamicínom. Obe bunkové línie boli v termostate pri 21% O_2 , 5% CO_2 a teplote 37°C. Na experimenty bola využitá hypoxická stanica (Invivo200 Ruskinn Technologies) s 1% O_2 , 5% CO_2 a teplotou 37°C.

Príprava adipocytárneho kondicionovaného média (adipCM): Adipocyty izolované od pacientky s karcinómom prsníka boli založené na Petriho misky s priemerom 10 cm a kultivované v kultivačnom médiu v termostate. Po 9 dňoch bolo odobraté médium centrifugované a následne zamrazené.

Opracovanie buniek adipCM: Bunkové línie HCT116 (1 500 000 buniek) a ZR-75-1 (3 300 000 buniek) boli založené na miskú s priemerom 6 cm v štandardnom kultivačnom médiu. Po 24h bolo médium vymenené buď za adipCM (v pomere 1/4, 1/8 a 1/16), alebo médium bez adipCM (kontrola). Následne boli bunky 24 h inkubované v normoxických alebo hypoxických podmienkach.

Tvorba kolonosfér a ich treatment: Na tvorbu kolonosfér z bunkovej línie HCT116 bola použitá

Spinnerova fľaša s objemom 250 ml, do ktorej sme okrem kultivačného média pridali 5 000 000 buniek. Následne bola fľaša spolu s miešadlom umiestnená do termostatu (5% CO₂, 37°C) po dobu 28 dní. Okrem kontinuálneho premiešavania bola zabezpečená aj pravidelná výmena kultivačného média. Vytvorené kolonosféry boli následne prenesené na Petriho misku, kde k nim bolo na 24h pridané adipCM v pomere 1/4, 1/8 a 1/16.

SDS PAGE: Kolonosféry a bunky opracované adipCM boli po 24h lyzované v RIPA lyzačnom roztoku (150 mM NaCl, 1% Triton X100, 0,05% deoxycholát sodný, 1 mM EDTA, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4) s pridaním inhibítorov proteáz a fosfatáz, a centrifugované pri 14 000 × g, 4°C po dobu 15 min. Koncentrácia proteínov bola stanovená pomocou BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Vzorky boli zmiešané s 2x Laemmliho pufrom (10% glycerol, 0,01% SDS, 5% β-mercaptoetanol, 0,005% brómfenolová modrá, 30 mM Tris-HCl, pH 6,8) a nanesené na 10% SDS-PAGE gél.

Western blot (WB): Po elektroforetickej separácii pri 90V boli proteíny prenesené z gélu na PVDF membránu (Millipore), pričom transfer prebiehal pri 300 mA po dobu 2h. Membrána bola následne blokována v 5% odtučnenom mlieku s 0,1% Tween-20 alebo 0,2% NP-40 (membrána na detekciu CA IX proteínu) v PBS 1h pri izbovej teplote (RT). Primárne protilátky boli podľa Tab. 1 nariedené v TBST (20 mM Tris, pH 7,6, 140 mM NaCl, 0,1% Tween20, 3% BSA) a membrány boli inkubované cez noc pri 4°C. Membrány určené pre detekciu CA IX a β-aktín boli inkubované s primárnymi protilátkami 1h pri RT.

Tab.1. Použité primárne protilátky

Primárna protilátka voči proteínu	Riedenie	Pôvod	Firma	Veľkosť [kDa]
CA IX	1:3	Myš	hybridómové médium	54-58
HIF1α	1:250	Myš	BD Biosciences	120
β-aktín	1:5000	Myš	Cell Signaling Technology	45
pAKT (Ser473)	1:1000	Králik	Cell Signaling Technology	60
pERK1/2 (p-p44/42 MAPK)	1:1000	Králik	Cell Signaling Technology	42-44
p-mTOR (Ser2448)	1:1000	Králik	Cell Signaling Technology	289
pSTAT3 (p-Y705)	1:1000	Králik	Cell Signaling Technology	86

Imunodetekcia: Nasledujúci deň boli membrány premyté v 0,1% Tween-20 alebo 0,2% NP-40 v PBS 4x 10 min a inkubované so sekundárnymi protilátkami (anti-králičia IgG/HRP alebo anti-myšia IgG/HRP (Dako), riedenie 1:5000 v 5% odtučnenom mlieku) po dobu 1h pri RT.

Membrány boli opäť premyté v 0,1% Tween-20 alebo 0,2% NP-40 v PBS a vyvolané pomocou chemiluminiscenčného substrátu (ECL). Signál bol detegovaný pomocou röntgenových filmov (FUJI).

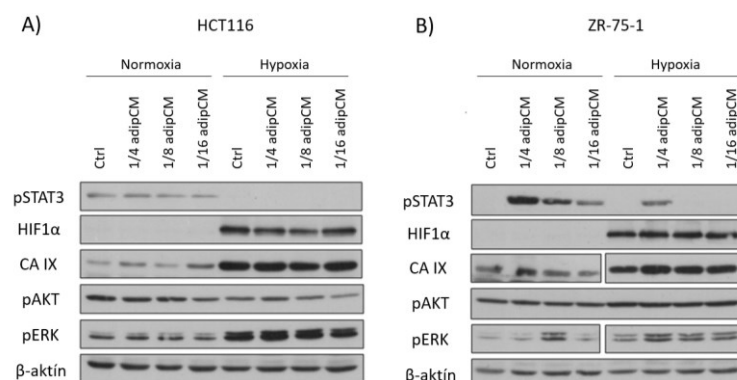
Výsledky a diskusia

Na analýzu vplyvu adipCM na bunky odvodené z karcinómu prsníka a kolorektálneho karcinómu boli použité bunkové línie ZR-75-1 a HCT116. Zmena expresie CA IX a HIF1 α po pridaní adipCM bola pozorovaná na proteínovej úrovni pomocou WB.

ZR-75-1 a HCT116 bunkové línie boli založené v požadovanej hustote a na druhý deň im bolo pridané kultivačné médium zmiešané s adipCM v pomere 1/4, 1/8 a 1/16. Na Obr. 1A a 1B môžeme vidieť, že v porovnaní s kontrolou dochádza po pridaní 1/4 a 1/16 adipCM k bunkám oboch línií k zvýšeniu expresie CA IX v normoxii aj hypoxii. Z literatúry je známe, že adipCM prispieva k invázií buniek karcinómu prsníka a zvýšenej proliferácii buniek kolorektálneho karcinómu [7, 8, 9]. Na základe našich výsledkov môžeme predpokladať, že práve proteín CA IX, ktorý prispieva k agresívnejšiemu fenotypu buniek, by mohol byť zodpovedný za spomínané efekty.

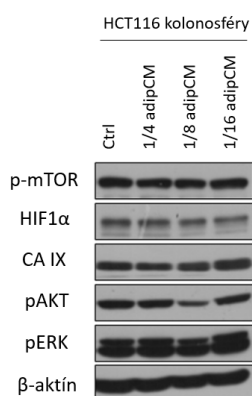
Okrem proteínu CA IX je možné pozorovať po pridaní adipCM aj zvýšenie expresie HIF1 α v hypoxii v bunkovej línii ZR-75-1. Korelácia medzi hladinami týchto dvoch proteínov v bunkovej línii ZR-75-1 naznačuje, že k ovplyvneniu hladiny CA IX dochádza prostredníctvom transkripčného faktora HIF1 α . Keďže v normoxických podmienkach nie je prítomný HIF1 α , navýšenie expresie CA IX bude pravdepodobne ovplyvnené iným mechanizmom.

Proteíny pSTAT3, pAKT a pERK slúžia na detekciu signálnych dráh, ktoré sú priamo ovplyvnené adipokínmi z adipCM. Po pridaní 1/4 adipCM k HCT116 je možné v normoxii pozorovať zvýšenie fosforylácie pERK v porovnaní s kontrolou. Ten istý efekt pozorujeme v týchto bunkách aj v hypoxii, kde je prítomná zvýšená fosforylácia proteínov pAKT a pERK. Zvýšenú fosforyláciu proteínu pSTAT3 a pERK pozorujeme v bunkovej línii ZR-75-1 (v normo- aj hypoxických podmienkach), pričom zvýšená hladina proteínu CA IX koreluje práve s fosforylovanou formou pSTAT3. Tento výsledok je v súlade s literatúrou, kde expresia pSTAT3 koreluje s expresiou CA IX v bunkách odvodených z karcinómu prsníka [10]. β -aktín slúži ako kontrola naniesenia rovnakej koncentrácie proteínov na gél.



Obr. 1. Vplyv adipocytárneho kondiciovaného média (adipCM) na expresiu CA IX a HIF1 α v bunkách odvodených z kolorektálneho karcinómu (HCT116) a karcinómu prsníka (ZR-75-1). pAKT, pERK a pSTAT3 sú použité na detekciu signálnych dráh indukovaných adipocytmi a nimi produkovanými adipokínmi. β -aktín slúži ako kontrola nanosenia rovnakého množstva proteínov na gél.

Kolonosféry predstavujú vhodný 3D model, ktorý dokáže napodobniť nádorové mikroprostredie. Okrem buniek v monovrstve sme preto analyzovali aj vplyv adipCM na kolonosféry vytvorené z buniek HCT116. Na Obr. 2 vidieť, že po pridaní 1/16 adipCM dochádza k zvýšeniu hladiny CA IX ako aj k zvýšenej fosforylácii proteínov pERK a p-mTOR. Naše výsledky sú v súlade s literatúrou, kde pridanie adipCM k nádorovým bunkám melanómu a kolorektálneho karcinómu taktiež aktivovalo signálnu dráhu pAKT/mTOR. Práve aktiváciou týchto dráh došlo k zvýšeniu proliferácie, migrácie a invázie nádorových buniek [11]. Keďže rovnako ako pri HCT116 v monovrstve, tak aj v HCT116 kolonosférach hladina proteínu HIF1 α nekoreluje s hladinou CA IX, tak k navýšeniu expresie CA IX dochádza v dôsledku aktivácie inej signálnej dráhy, v tomto prípade napr. PI3K/pAKT/mTOR.



Obr. 2. Vplyv adipocytárneho kondiciovaného média (adipCM) na expresiu CA IX a HIF1 α v kolonosférach vytvorených z buniek HCT116. pAKT, pERK a p-mTOR sú použité na detekciu signálnych dráh indukovaných adipocytmi a nimi produkovanými adipokínmi. β -aktín slúži ako kontrola nanosenia rovnakého množstva proteínov na gél.

Záver

Analyzované bunkové línie karcinómu prsníka a kolorektálneho karcinómu, spolu s vytvorenými kolonosférami, reagovali na opracovanie adipCM zvýšenou expresiou CA IX, pričom tento efekt bol pozorovaný po pridaní 1/4 a 1/16 adipCM. Bunky ZR-75-1 reagovali po pridaní adipCM aj zvýšenou expresiou HIF1 α v hypoxii, čo naznačuje, že k zvýšeniu hladiny CA IX dochádza v dôsledku spustenia signálnej dráhy HIF1. Naopak v bunkách HCT116 (v monovrstve aj v kolonosférach) je navýšenie expresie CA IX nezávislé od hladiny proteínu HIF1 α a je spôsobené iným mechanizmom, pravdepodobne v dôsledku aktivácie PI3K/AKT/mTOR alebo STAT3 signálnej dráhy.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla vďaka podpore grantov: APP0434, VEGA 2/0076/20 a v rámci Operačného programu integrovanej infraštruktúry pre projekt: Dlhodobý strategický výskum prevencie, intervencie a mechanizmov obezity a jej komorbidít, kód ITMS: 313011V344, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Lauby-Secretan B., Scoccianti C., Loomis D., et al. (2016) N. Engl. J. Med. 375(8), p. 794
- [2] Carter J. C., Church F. C (2012) Exp. Mol. Pathol. 92(3), p 312
- [3] Geneste A., Duong M. N., Molina L., et al. (2020) BMC Pharmacol Toxicol. 21, p. 61
- [4] Wykoff C. C., Beasley N. J., Watson P. H., et al. (2000) Cancer Res. 60(24), p. 7075
- [5] Svastova E., Witariski W., Csaderova L., et al. (2012) J. Biol. Chem. 287(5), p. 392
- [6] Pastorek J., Pastorekova S. (2015) Semin. Cancer. Biol. 31, p. 52
- [7] Adib T., Henderson S., Perrett C., et al. (2004) Br J Cancer. 90, p. 686
- [8] Carter J. C., Church F. C. (2012) Exp Mol Pathol. 92, p. 312
- [9] Amemori S., Ootani A., Aoki S., et al. (2006) Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 292, p. 923
- [10] Schoppmann S. F., Jesch B., Friedrich J., et al. (2012) Clin. Exp. Metastasis. 29(6), p. 615
- [11] Ko J. H., Um J. Y., Lee S. G., et al. (2019) J. Cell Physiol. 234, p. 249

Interakcia ACE I/D genetického variantu so životným štýlom a ich vzájomný vplyv na tukovú hmotu u mladých dospelých

Dominika Lechmanová, Lenka Vorobeľová, Darina Falbová, Viktória Kovalčíková, Barbara Matzenauerová, Frederika Hanuliaková

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra antropológie,
Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
dlechmanova@gmail.com*

Abstract

ACE I/D gene-lifestyle interactions on fat in Slovak young adults

The genetic polymorphism ACE I/D is characterized by insertion or deletion of a fragment of Alu sequences in intron 16. The enzyme ACE is expressed in adipose tissue and therefore associated with the development of overweight and obesity. In analyzing the increased risk for the development of overweight and obesity, we also considered lifestyle factors such as physical activity and smoking. The aim of this study was to determine the interaction of the genetic variant ACE I/D with lifestyle factors and their joint effect on fat mass in young adults. Our results showed a significant association between the ACE I/D variant and smoking on fat mass (kg) in females. In males, fat mass parameters were significantly associated with the ACE I/D variant and sports activity. Thus, we conclude that the genetic variant ACE I/D and lifestyle are important factors influencing fat mass in young Slovak females and males.

Keywords: *renin angiotensin enzyme; polymorphism; fat mass; lifestyle*

Úvod a formulácia cieľa

Angiotenzín konvertujúci enzým (ACE) je metalopeptidáza zinku distribuovaná na povrchu endotelových a epitelových buniek. ACE premieňa neaktívny dekaeptid, angiotenzín I (Ang I alebo Ang 1-10), na aktívny oktapeptid a silný vazokonstriktor angiotenzín II (Ang II alebo Ang 1-8), ktorý je hlavným aktívnym produktom renín-angiotenzínového systému [RAS, 1].

Gén kódujúci ACE je lokalizovaný na dlhom ramene 17. chromozómu (17q23). Gén je dlhý 21 kilobáz (kb) s obsahom 26 exónov a 25 intrónov. [2] Polymorfizmus, predstavuje prítomnosť dvoch alebo viacerých variantných foriem špecifickej sekvencie DNA, ktoré sa môžu vyskytovať medzi rôznymi jednotlivcami alebo populáciami. Ide teda o zmenu v sekvencii DNA, ktorá sa vyskytuje v bežnej populácii s frekvenciou vyššou ako 1 %. V géne pre ACE je známych viac ako 160 polymorfizmov z čoho väčšina sú SNP (jednonukleotidové polymorfizmy), 34 z nich sa nachádza v kódujúcej oblasti a 18 sú „missense“ mutácie [3].

Najviac sledovaný polymorfizmus v ACE géne je inzerčno-delečný polymorfizmus (I/D) charakteristický prítomnosťou (inzercia, I) alebo chýbaním (delécia, D) fragmentu opakujúcich sa Alu sekvencií o veľkosti 287 bp v intróne 16. Nachádza sa v nekódujúcej

oblasti ACE génu. Hladiny ACE u každého jedinca sú stále, no líšiť sa môžu interindividuálne. D/D homozygoti majú hladiny enzýmu ACE v plazme aj dvojnásobne vyššie ako I/I homozygoti [4].

ACE je exprimovaný v adipóznom tkanive a jeho aktivita je spájaná so stavom zloženia tela jedinca a náchylnosti ku nadváhe až obezite. Cieľom tejto práce bolo potvrdiť asociáciu ACE I/D genetického variantu s faktormi životného štýlu (šport a fajčenie) a ich spoločný vplyv na tukovú hmotu v rôznych segmentoch ľudského tela.

Materiál a metódy

Sledovaný súbor pozostával zo 62 jedincov vo veku od 19 do 28 rokov. Zber dát prebiehal od februára 2019 do novembra 2022. Všetci probandi patrili ku kaukazoidnej variete s pobytom v Slovenskej republike s priemerným vekom $22,56 \pm 1,99$ rokov. Súbor pozostával z 37 žien s priemerným vekom $22,57 \pm 2,09$ a 25 mužov s priemerným $22,56 \pm 1,87$.

Výskum pozostával z dvoch fáz. V prvej časti probandi vyplňali dotazník, ktorý sa zameriaval na spôsob života a životný štýl. Pre dotazník sme zvolili validovanú štandardizovanú formu odborného dotazníka Svetovej zdravotníckej organizácie WHO z roku 2014 v slovenskom preklade. Tento dotazník bol prispôbený účelom nášho výskumu a pred jeho vyplňaním probandi podpisom písomne súhlasili s využitím dát v rámci tejto štúdie. V ďalšej fáze proband podstúpil odber bukalneho steru vatovou tyčinkou, meranie telesnej výšky, obvodu pásu a bokov podľa Martina a Sallera (1957) a bioimpedančné vyšetrenie pomocou prístroja Inbody 770, pri ktorom sme zisťovali hodnoty parametrov celkového obsahu tuku a obsahu tuku v segmentoch hornej a dolnej končatiny a trupu [5].

DNA sme izolovali pomocou izolačného kitu „Buccal Swab DNA Extraction Kit“. ACE I/D genetický variant sme analyzovali pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Získané dáta boli následne štatisticky spracované v programe IBM SPSS Statistics 24. Pre základné určenie normality dát sme používali Kolmogorovov - Smirnov test. Na analýzu dát sme využili dvojfaktorovú analýzu kovariancie (two-way ANCOVA) na základe, ktorej sme získali prehľad o interakciách medzi ACE genetickým variantom a faktormi životného štýlu a či táto interakcia vplýva na namerané parametre. Pre analýzu vzťahu ACE a faktorov prostredia sme využívali aditívny model, kde boli všetky tri typy polymorfizmu (II, ID, DD) dominantný model, kde sme porovnávali genotypy DD / ID s recesívnym homozygotom (II). V recesívnom modeli sme zlúčili genotypy II a ID a porovnávali ich s dominantným homozygotom. Výsledky štatistických analýz sú vyjadrené pomocou hodnoty významnosti (p). Za štatisticky významné boli považované hodnoty $p < 0,05$.

Výsledky a diskusia

U žien signifikantná interakcia ACE I/D variantu so športom nebola preukázaná v žiadnom modeli, tiež nebol potvrdený ani ich vzájomný vplyv na hodnoty parametrov tukovej hmoty. Pri analýze interakcie ACE I/D variantu s pitím kávy taktiež nebol preukázaný signifikantný vzťah s tukovou hmotou. Významná interakcia ACE I/D variantu sa však potvrdila v prípade fajčenia v dominantnom modeli. Ženy s II genotypom, ktoré fajčili mali výrazne vyššie hodnoty FM (kg) v porovnaní s fajčiacimi ženami s D alelou (27,40 vs. 18,36 a 16,53). Vyššie hodnoty boli zaznamenané aj v prípade ďalších nasledovných parametrov: viscerálny tuk (97,25 vs. 87,44 a 78,04), PBF % (30,85 vs. 28,97 a 28,73) a FMI (9,50 vs. 6,63 a 6,20; Tab. 1).

Percento tukovej hmoty v hornej končatine, trupe a dolnej končatine u fajčiarok s II genotypom boli tiež vyššie oproti fajčiarkam s D alelou: FM horná končatina (142,85 vs. 116,73), FM trup (182,55 vs. 153,93), FM noha (124,55 vs. 108,77; Tab. 2).

Pri analýze vzorky mužov boli výsledky oproti ženám výrazne odlišné. Hoci nebol potvrdený vzájomný vplyv ACE genotypu s kávou a ani s fajčením na hodnoty sledovaných parametrov tukovej hmoty, signifikantné výsledky boli pozorované v súvislosti s ACE genotypom a športom. Nižšie percento telesného tuku mali aktívne športujúci muži s II genotypom v porovnaní so športujúcimi mužmi s D alelou (14,80 vs. 17,47). Taktiež športujúci muži s D alelou mali vyššie hodnoty viscerálneho tuku (61,10) v porovnaní s mužmi s II genotypom (44,24; Tab. 3).

Tab. 1. Priemerné hodnoty tukových parametrov u žien v závislosti od fajčenia a ACE genotypu. PBF % - percento telesného tuku, FMI – index tukovej hmoty, FM kg – tuková hmota v kg, ACE – genotyp, n – počet probandov patriacich ku genotypu, Priemer – priemerná hodnota tukovej hmoty, SD – smerodajná odchýlka, p – hodnota významnosti, AM – aditívny model, DM – dominantný model, RM – recesívny model

N = 37	ACE	n	PBF %		Viscerálny tuk %		FMI		FM kg	
			Priemer	SD	Priemer	SD	Priemer	SD	Priemer	SD
Fajčiarky	II	2	30,85	4,74	97,25	28,92	9,50	1,98	27,40	5,37
	ID	13	28,97	5,62	87,44	35,85	6,63	1,14	18,36	2,27
	DD	7	28,73	4,97	78,04	24,28	6,20	1,11	16,53	2,08
Nefajčiarky	II	7	29,00	7,95	85,24	42,96	5,81	5,81	16,49	6,04
	ID	3	29,10	0,96	77,93	14,87	6,80	2,36	19,75	7,40
	DD	5	28,12	1,63	65,30	6,65	6,22	1,46	17,31	4,56
	p (AM)		0,056		0,056		0,134		0,108	
	p (DM)		0,019		0,019		0,039		0,031	
	p (RM)		0,100		0,100		0,430		0,422	

Tab. 2. Priemerné hodnoty tukovej hmoty v jednotlivých segmentoch ľudského tela u žien v závislosti od fajčenia a ACE genotypu. FM rameno – tuková hmota segmentu hornej končatiny v %, FM trup – tuková hmota segmentu trupu v %, FM noha – tuková hmota segmentu dolnej končatiny v %, SD – smerodajná odchýlka, ACE – genotyp, n – počet probandov patriacich ku genotypu, p – hodnota významnosti, AM – aditívny model, DM – dominantný model, RM – recesívny model

N = 37	ACE genotyp	n	FM rameno %		FM trup %		FM noha %	
			Priemer	SD	Priemer	SD	Priemer	SD
Fajčiarky	II	2	142,85	41,51	182,55	38,11	124,55	30,33
	ID	13	133,11	60,52	167,10	60,16	117,24	35,97
	DD	3	116,73	13,56	153,93	23,02	108,77	13,18
Nefajčiarky	II	7	125,26	67,36	152,23	72,22	111,64	46,89
	ID	7	120,13	38,31	155,10	35,95	112,60	32,51
	DD	5	107,68	15,22	141,78	25,64	103,56	11,06
	p (AM)		0,096		0,208		0,060	
	p (DM)		0,026		0,068		0,015	
	p (RM)		0,360		0,508		0,339	

Tab. 3. Priemerné hodnoty tukových parametrov u mužov v závislosti od fyzickej aktivity a ACE genotypu. WHR – pomer pásu k bohom, PBF % - percento telesného tuku, BMI – index telesnej hmoty, ACE – genotyp, n – počet probandov patriacich ku genotypu, SD – smerodajná odchýlka, p – hodnota významnosti, AM – aditívny model, DM – dominantný model, RM – recesívny model

N = 25	ACE	n	WHR		PBF %		VISCERÁLNY TUK		BMI	
			Priemer	SD	Priemer	SD	Priemer	SD	Priemer	SD
Aktívny šport	II	5	0,78	0,02	14,80	5,43	44,24	22,24	22,90	1,25
	ID	9	0,82	0,04	17,27	7,38	65,80	39,88	25,10	3,01
	DD	3	0,83	0,04	17,47	10,68	61,10	59,95	26,87	4,90
Bez športu	II	2	0,87	0,01	30,40	6,22	143,40	73,68	29,75	6,72
	ID	2	0,79	0,01	26,55	10,68	100,90	50,77	27,05	4,31
	DD	4	0,77	0,01	14,78	3,84	36,50	15,73	19,80	2,09
	p (AM)		0,002		0,095		0,044		0,004	
	p (DM)		< 0,001		0,063		0,016		0,009	
	p (RM)		0,052		0,036		0,031		0,002	

Rozdiely medzi skupinou aktívne športujúcich mužov boli prítomné v analýze jednotlivých segmentov tela. Najvýraznejší rozdiel bol v percentuálnej hodnote ramena jedincov s II genotypom, ktorí aktívne športovali ($79,24 \pm 51,70$ vs. $148,67 \pm 191,74$; Tab. 4).

Tab. 4. Priemerné hodnoty tukovej hmoty v jednotlivých segmentoch ľudského tela u mužov v závislosti od fyzickej aktivity a ACE genotypu. FM – tuková hmota, FM rameno – tuková hmota segmentu hornej končatiny v %, FM trup – tuková hmota segmentu trupu v %, FM noha – tuková hmota segmentu dolnej končatiny v %, SD – smerodajná odchýlka, ACE – genotyp, n – počet probandov patriacich ku genotypu, p – hodnota významnosti, AM – aditívny model, DM – dominantný model, RM – recesívny model

N = 25	ACE	n	FM rameno %		FM trup %		FM noha %	
			Priemer	SD	Priemer	SD	Priemer	SD
Aktívny šport	II	5	79,24	51,70	122,92	58,51	95,76	34,69
	ID	9	122,64	106,67	171,51	96,85	113,80	51,49
	DD	3	148,67	191,74	187,37	159,56	127,30	89,27
Bez športu	II	2	374,20	246,21	351,00	154,43	216,15	58,05
	ID	2	260,70	203,51	269,85	137,67	196,70	109,60
	DD	4	72,80	32,96	95,85	32,48	85,83	16,74
	p (AM)		0,044		0,031		0,041	
	p (DM)		0,028		0,022		0,062	
	p (RM)		0,020		0,014		0,011	

Existuje málo výskumov zaoberajúcich sa interakciou ACE I/D s fajčením a následným vplyvom na tukovú hmotu. Je však známe, že fajčenie zvyšuje počet tukových buniek v tele a riziko vzniku obezity je najvyššie u ťažkých fajčiarov [6]. V našom prípade môže mať kombinácia ACE I/D variantu s fajčením za výsledok výrazné zvýšenie obsahu tuku v tele u žien. V prípade mužov, naše výsledky potvrdzujú tvrdenie autorov, ktorí zistili významnú asociáciu v prípade genotypu ACE II so zvýšenou fyzickou výkonnosťou. Celkovo II genotyp spájali s lepšími výsledkami v rámci vytrvalostných športov [7]. V našom výskume mali muži, ktorí aktívne športovali a mali genotyp II výrazne nižšie percentá obsahu tuku, čo môže súvisieť práve s lepšou výkonnosťou vďaka prítomnosti I alely v genotype.

Záver

V tejto štúdii sme potvrdili vplyv ACE I/D polymorfizmu s jednotlivými faktormi životného štýlu a ich vzájomný vplyv na tukovú hmotu ľudského tela. U žien bola potvrdená súvislosť ACE I/D a fajčenia s vplyvom na hodnoty tukových parametrov. Ženy s genotypom II, ktoré fajčili dosahovali vyššie hodnoty PFB %, FMI a boli u nich pozorované aj zvýšené hodnoty viscerálneho tuku. U mužov sme preukázali významnú interakciu ACE I/D variantu s fyzickou aktivitou a ich vzájomný efekt na množstvo tukovej hmoty. Muži, ktorí mali genotyp II a aktívne športovali mali hodnoty tukových parametrov výrazne nižšie oproti športujúcim mužom s D alelou, I alela sa javí ako protektívna a znižuje % tuku.

PodĎakovanie

Táto publikácia je výsledkom realizácie projektov: KEGA 046UK-4/2023 a Vedeckého parku Univerzity Komenského v Bratislave podporeného z Operačného programu Výskum a vývoj financovaného z ERDF. [Grant number: ITMS 26240220086, ITMS2014p: 313021D075].

Zoznam použitej literatúry

- [1] Carluccio M., Soccio M., De Caterina R. (2001) EJCI. 31(6), p. 476
- [2] Hovard T. E., Shai S. Y., Langford K. G., et al. (1990) Mol. Cell. Biol. 10, p. 4294
- [3] Sayed-Tabatabaei F. A., Oostra B. A., Isaacs A., et al. (2006) Circ. Res. 98, p. 1123
- [4] Danková Z., Siváková D., Vorobeľová L., et al. (2017) Genetická variabilita v ľudských populáciách inovatívna učebnica s príručkou. Bratislava, p. 101
- [5] Martin, R., Saller, K., 1957: Lehrbuch der Anthropologie. Gustav Fisher Verlag. Stuttgart. p. 661
- [6] Dare S., Mackay D. F., Pell J. P. (2015) PLoS One. 10(4): e0123579
- [7] Ma F., Yang Y., Li X., et al. (2013) PLoS One. 8(1):e54685

Gén *YIERG1* z kvasinky *Yarrowia lipolytica* dokáže nahradiť funkciu génu *ScERG1* kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

Marek Lúčan¹, Daniela Krajčiová², Martina Garaiová², Roman Holíč²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; lucanmarek25@gmail.com

²Ústav biochémie a genetiky živočíchov Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Centrum biovied, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Gene *YIERG1* from *Yarrowia lipolytica* substitutes function of gene *ScERG1* in *Saccharomyces cerevisiae*

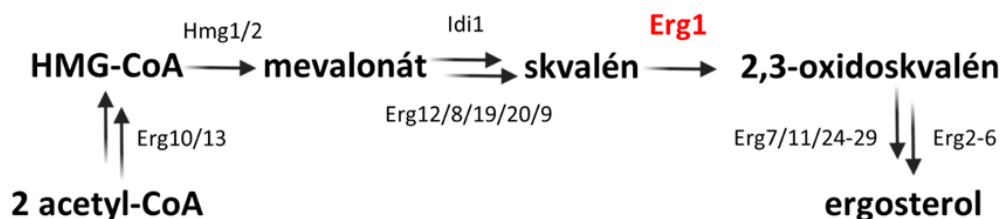
Squalene is an intermediate in ergosterol synthesis pathway which has many applications in medicine, pharmacy and cosmetics. Because its main source - shark liver - is limited, scientists search for alternative sources such as microorganisms. In former studies genetic manipulation of squalene monooxygenase (Erg1p) led to increased squalene production in yeast *S. cerevisiae*. The same gene alterations could be even more beneficial when introduced to oleaginous yeast *Y. lipolytica*. The aim of this study was to test whether Erg1p from *Y. lipolytica* can complement the loss of native enzyme in *S. cerevisiae*. By *in silico* analysis and selection based on auxotrophy we demonstrated that Erg1p from *Y. lipolytica* can substitute the essential function of squalene monooxygenase in baker's yeast.

Keywords: yeast; squalene; squalene monooxygenase; ergosterol; *Yarrowia lipolytica*

Úvod a formulácia cieľa

Skvalén je lipid, ktorý je tvorený lineárnou 30-uhlíkatou molekulou. Je jedným z intermediátov v biosyntetickej dráhe sterolov, ktoré plnia dôležitú úlohu v stabilizácii biomembrán [1]. Má široké využitie v medicíne, farmácii, potravinárstve, kozmetike a v priemysle. Hlavným zdrojom skvalénu je pečeň hlbokomorských žralokov, no rybolov za účelom získania tejto látky zásadne prispieva k znižovaniu populácie žralokov [2 – 4]. Preto sa v súčasnosti začínajú využívať alternatívne zdroje skvalénu pozostávajúce zväčša z rastlinných olejov. Perspektívnu možnosť však predstavuje využitie mikroorganizmov, najmä kvasiniek, a to prostredníctvom zásahu do biosyntetickej dráhy ergosterolu (Obr. 1). Jedným z jej hlavných kontrolných bodov je oxidácia skvalénu enzýmom skvalénmonooxygenáza (Erg1p). V dôsledku inhibície Erg1p sa syntéza ergosterolu zastavuje na úrovni skvalénu, ktorý sa v bunke akumuluje. V predchádzajúcich experimentálnych prácach sa ukázalo, že genetickou manipuláciou, ktorá mala za následok parciálnu inaktiváciu Erg1p, je možné dosiahnuť zvýšenú produkciu skvalénu v kvasinkách *S. cerevisiae* [5]. V súčasnosti sa v biotechnologickom priemysle venuje pozornosť najmä tukotvorným kvasinkám, napríklad *Y. lipolytica*, ktoré majú prirodzene väčšiu kapacitu akumulovať tuky, a preto by u nich mutagenéza *ERG1* mohla viesť k ešte vyšším výťažkom skvalénu ako u tradičných kvasiniek

S. cerevisiae [6].



Obr. 1. Hlavné body biosyntetickej dráhy ergosterolu

Acetyl koenzým A (acetyl-CoA) kondenzuje a konvertuje na 3-hydroxy-3-metylglutarylkoenzým A (HMG-CoA), ktorý je premieňaný na mevalonát a po niekoľkých krokoch až na skvalén. Po oxidácii skvalénu enzýmom Erg1p po viacerých medzikrokoch vzniká ergosterol

Aby sme v ďalších experimentoch s *Y. lipolytica* mohli použiť mutácie, ktoré u *S. cerevisiae* viedli ku zvýšenej tvorbe skvalénu (viď [5]), cieľom našej práce bolo overiť, či gén *ERG1* v *Y. lipolytica* (*YIERG1*) plní rovnakú funkciu ako v *S. cerevisiae* (*ScErg1*) – teda či sú gény funkčnými ortológmi. V takom prípade by *YIERG1* mal v *S. cerevisiae* komplementovať deléciu *ScERG1*. Gén *YIERG1* sme identifikovali na základe *in silico* analýz, klonovali do kvasinkového vektora a transformovali do *erg1* delečného kmeňa *S. cerevisiae*, ktorého esenciálnu funkciu zabezpečoval *ScERG1* na plazmide. Následne sme sledovali schopnosť straty *ScERG1* obsiahnutého na plazmidovej DNA.

Materiál a metódy

Kmene: V experimente sme použili kmeň *S. cerevisiae* 350 (*MATa leu2 ura3 trp1 ERG1::URA3 pRS315-ScERG1(LEU2)*) a komerčne dostupné kompetentné baktérie *Escherichia coli* DH5a (*Thermo Fisher Scientific*).

***In silico* analýza:** Primárnu sekvenciu proteínu Erg1 (skvalénmonooxygenázy) zo *S. cerevisiae* a z *Y. lipolytica* sme získali z databázy National Center for Biotechnology Information pomocou nástroja BLAST [7] respektíve z databázy *Saccharomyces* Genome Database [8]. Aminokyselinové sekvencie Erg1p z oboch druhov kvasiniek sme zarovnali pomocou softvéru Benchling, vďaka čomu sme určili ich homológiu.

Príprava konštruktu s *YIERG1*: Gén *YIERG1* sme amplifikovali z genómu *Y. lipolytica* pomocou PCR reakcií s *Phusion*TM *High-Fidelity DNA Polymerase* podľa návodu od výrobcu. V prvej PCR reakcii vznikol produkt obsahujúci otvorený čítací rámec *YIERG1* a prilahlé oblasti (66 bp *upstream* a 394 bp *downstream*), ktorý sme použili ako templát v druhej PCR reakcii s párom primerov navrhnutým na klonovanie do vektora YCplac22-PMA1pt pomocou *Gibson assembly*. Na ligáciu vektora YCplac22-PMA1pt s PCR produktom sme použili

GeneArt™ Gibson Assembly® HiFi Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) podľa návodu od výrobcu. Po tvorbe konštruktov prostredníctvom *Gibson assembly* nasledovala transformácia konštruktov do kompetentných baktérií *DH5α* pre amplifikáciu *in vivo*. Plazmid sme izolovali pomocou *GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific)* a štiepili restriktázami *PaeI* a *NotI* podľa návodu od výrobcov. Separácia restriktčných fragmentov prebiehala za pomoci agarózovej elektroforézy v 1 % géli (30 min v 0,5x TAE pri 100 V) a veľkosť vzniknutých DNA fragmentov sme zistili porovnaním s 1kb DNA štandardom. Plazmidové konštrukty o správnej veľkosti boli sekvenované firmou *Macrogen Europe*.

Transformácia kvasiniek a selekcia kolónií s *YIERG1*: Bunky *S. cerevisiae* kmeňa 350 sme transformovali konštruktom YCplac22-*PMA1*pt-*YIERG1* podľa Gietza [9]. Bunky sme vysiali na pevné minimálne médiá bez prídavku leucínu, tryptofánu a uracilu (YNB-Leu-Trp-Ura) a po kultivácii (3 dni pri 30°C) sme z narastných kolónií transformantov inokulovali bunky do tekutého YNB-Trp. Bunky sme kultivovali (2x 3 dni pri 30°C a 130 rpm), vysiali na YNB-Trp a následne preočkovali na YNB-Trp, YNB-Leu, YNB-Leu-Trp-Ura a YNB-kompletné pevné médiá.

Výsledky a diskusia

Prvým predpokladom, aby YlErg1p mohol funkčne nahradiť ScErg1p, je ich vzájomná sekvenčná homológia. Na identifikáciu YlErg1p sme preto využili *in silico* analýzu BLAST zameranú na vyhľadávanie podobných sekvencií. Homológia medzi *ScERG1* a *YIERG1* bola na úrovni nukleotidov 35 % (výsledky neuvádzame) a na úrovni aminokyselinových zvyškov 42 % (Obr. 2).

```

1                               101
YlErg1p MVT-QQSAETSATQTNEDYDVVIVGAGIAGPALAVALGNQGRKVLVVERDLSEPDRIVGELLQPGGVAALKTLGLGSCIEDIDAIPCQGYNVIYSGECEVL
ScErg1p MSAAVNAPELINAQNTTETDYDAIVGAGVGGPQVATGLARRCKKVLVVERDNNMPDRIVGELMPPGGVRAIRSLGMLTQSINNIEAMPVETGYTFNNGEQVDI

102                               202
YlErg1p KYPKVPDRIQ-QDYNELYRSGKS-----ADISNEAPRGVSFHHGRFVMNLRRAARDTPNVTLLLEATVTEVVKNPYTGHIIGVKTFSKTGGAKIYK
ScErg1p RYPYKADIPKVEKLKDLVKDQNDKVLEDSTHIDYEDDERGVRNVHGRFLNNLRNITAGSPNVTIVQGNCEIEKDEKNE-VVAKVDIDGR---GKV

203                               303
YlErg1p HFFAPLTVVCDGTFSKFRKDFSTNK-TSVRSHFAGLILKDAVLPSPOGHVILSPNSCPVLVYQVGARETRILCDIQGPVPSNATGALKEHMEKNVMPHLP
ScErg1p RFAHLTTECDGEFSRFRKELHPDHVPTVSSVFCMSLENAKNPFPMHGHVILGSDHNPVLVYQISPEETRIILCAVNSPKV---PADIKSNTEKDVQPEP

304                               404
YlErg1p KSIQPSFQAALKEQTIKRVMPNSFLSASKNDHGLILLGDALNMRHPLTGGGMTVALNDALLSRLLTGVLNEDTYAVSSVMSSQFHWQRKHLDSIVNLSM
ScErg1p KSIRPSFQDAVSQGFAMPNSVILPARGNDVTCMVGGDALNMRHPLTGGGMTVGLHCVLLIKKIGDLDFSRKVLDS-LIDVHFERKSVDSVENLSV

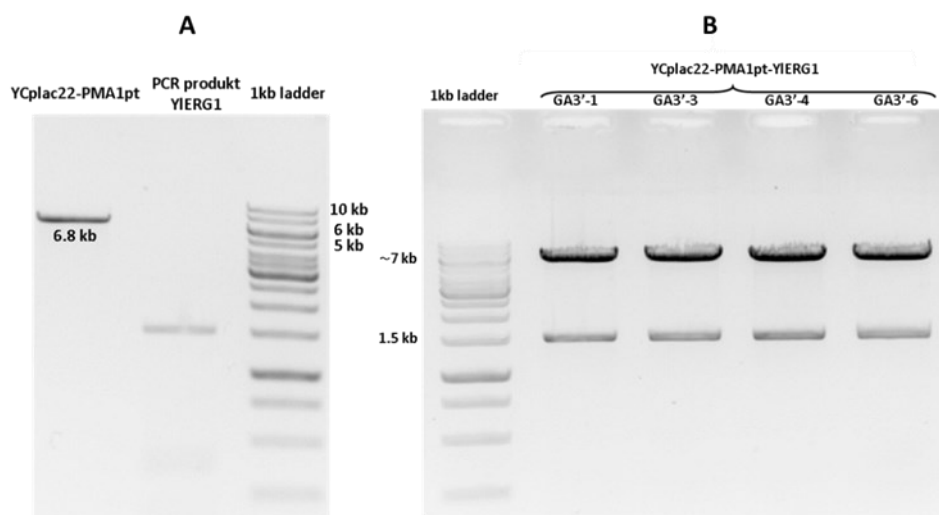
405                               504
YlErg1p ALYSLFAADS DYLRILQLGCFNYFKLGGICVDHPVMLLAGVLPMPYLFTHFFVVAIYGGICNMQANGIAKLPAISLLQFVASLVTACTIVFPYIWSLT-
ScErg1p ALYSLFAADS NLKALQKCFNYFQKGGDCVNPVEELSGVLNPFQLERMFPAVAEYEVENMEERGELGLFMALEGIMILETAEVETFPPEDELIG

```

Obr. 2. Zarovnanie YIERG1p a ScERG1p

Proteín Erg1p zo *S. cerevisiae* a *Y. lipolytica* sme zarovnali pomocou programu *Benchling*. Červenou farbou sú zvýraznené nezhody aminokyselín v sekvencii

Následne sme pokračovali klonovaním *YIERG1* identifikovaným *in silico* analýzou do vektora *YCplac22-PMA1pt* a prípravou plazmidu *YCplac22-PMA1pt-YIERG1*. Z genómu štandardného kmeňa *Y. lipolytica* sme za pomoci PCR amplifikovali gén *YIERG1*. Plazmid *YCplac22-PMA1pt* sme po izolácii z baktérií štiepli príslušnými restriktázami a po separácii elektroforézou v agarózovom géli sme izolovali fragment o veľkosti 6,8 kb. Prítomnosť a čistotu PCR produktu ako aj 6,8 kb fragmentu vektora sme overili DNA elektroforézou (Obr. 3A). PCR produkt sme klonovali do prázdneho vektora *in vitro* pomocou metódy *Gibson assembly*. Rekombinantnú DNA sme transformovali do baktérií a na základe rezistencie k antibiotiku sme selektovali transformantov obsahujúcich plazmid. Po restriktkej analýze plazmidov sa nám podarilo určiť rekombinátov so správnym konštruktom (Obr. 3B). Konštrukty sme poslali na sekvenáciu a výsledok sekvenačnej analýzy potvrdil, že v sekvenciách nie sú žiadne amplifikačné chyby, ktoré by viedli k posunu čítacieho rámca alebo ku zmene primárnej štruktúry proteínu.

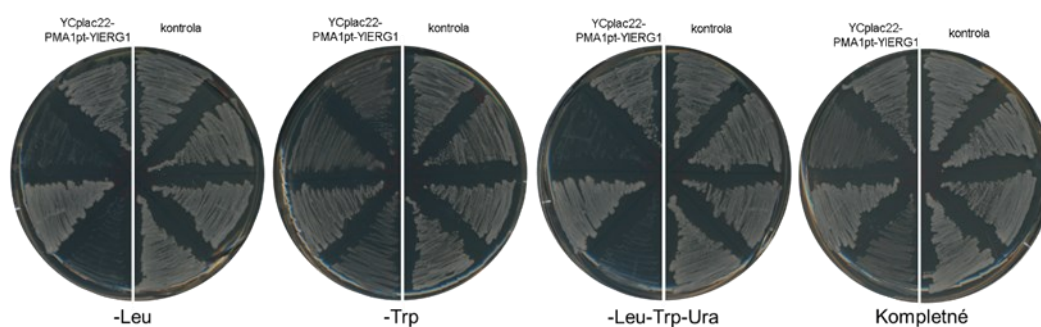


Obr. 3. Výsledky DNA elektroforézy v agarózovom géli

Na Obr. 3A je prázdny vektor po extrakcii z gélu a PCR produkt *YIERG1*. Na Obr. 3B sú fragmenty restriktkej analýzy po štiepení enzýmami *PaeI* a *NotI* (všetky kolónie GA3'-1/3/4/6 obsahovali správny konštrukt). Ako štandard sme použili *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (*Thermo Fisher Scientific*)

V nasledujúcej časti projektu sme po transformácii *S. cerevisiae* kmeňa č. 350 plazmidom *YCplac22-PMA1pt-YIERG1* na základe auxotrofie sledovali schopnosť *YIERG1* funkčne nahradiť *ScERG1*. Ako kontrolu sme použili prázdny plazmid *YCplac22-PMA1pt*. Pomocou kultivácie na selekčných médiách sme dokázali odlíšiť bunky s *ScERG1* (médiu bez leucínu), *YIERG1* (médiu bez tryptofánu) alebo bunky s oboma plazmidmi (médiu bez leucínu a tryptofánu). Podarilo sa nám získať kolónie, ktoré stratili *ScERG1*, čo znamená, že

jeho funkciu nahradil gén *YIERG1*. Tieto kolónie však v porovnaní s kontrolou vykazovali zníženú schopnosť rastu (Obr. 4). Tá môže odrážať rozdiely v primárnej štruktúre proteínov, z toho vyplývajúce iné usporiadanie v priestore a napokon jemné rozdiely vo funkcii, stabilite alebo aktivite enzýmu. Okrem toho, pozorované rozdiely v raste môžu byť spôsobené rôznymi expresnými hladinami jednotlivých génov v bunkách. Predpokladáme, že v bunkách, v ktorých *YIERG1* dokáže zastúpiť *ScERG1* len parciálne dochádza k hromadeniu skvalénu. Zvýšená hladina skvalénu by mohla tiež spôsobiť znížený nárast buniek, pretože po prekročení skladovacej kapacity bunky, skvalén pôsobí na bunku toxicky [10].



Obr. 4. Selekcia kolónií s *YIERG1*

Na obrázku sú bunky kmeňa *S. cerevisiae* č. 350 po selekcii plazmidu s génom *YIERG1* kultivované na pevnom médiu bez leucínu, tryptofánu, alebo ich kombinácie. Bunky, ktoré rástli na médiu -Trp a nerástli na médiu -Leu a -Leu-Trp obsahovali len plazmid s génom *YIERG1* (a prejavovali sa zníženým rastom). Ako kontrolu sme použili prázdny plazmid

Záver

Na základe výsledkov našej práce môžeme povedať, že gén pre skvalénmonooxygenázu z *Y. lipolytica* je ortológom génu pre tento enzým v *S. cerevisiae*, pretože dokáže nahradiť jeho funkciu, avšak len čiastočne. Vyslovené hypotézy vysvetľujúce zníženú schopnosť rastu bude potrebné experimentálne potvrdiť alebo vyvrátiť. Naším ďalším cieľom bude integrácia *ScERG1* a jeho mutantných variant [5] do genómu *Y. lipolytica*. V takýchto bunkách prerušíme esenciálny gén *YIERG1* a následne budeme sledovať zmeny v tvorbe skvalénu spolu so schopnosťou tolerovať jeho zvýšenú hladinu v bunkách *Y. lipolytica*. Vo výsledku by naša práca mohla priniesť prielom v biotechnologickej produkcii skvalénu a využitiu mikroorganizmov ako jeho alternatívneho zdroja.

PodĎakovanie

Práca vznikla vďaka finančnej podpore grantu APVV-20-0166 a VEGA 2/0036/22.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Micera M., Botto A., Geddo F., et al. (2020) *Antioxidants* 9(8), p. 688
- [2] Tsujimoto M. (1916) *Ind. Eng. Chem.* 8(10), p. 889
- [3] Yarkent Ç., Oncel S. S. (2022) *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 27(3), p. 295
- [4] Short K. K., Lathrop S. K., Davison C. J., et al. (2022) *Pharmaceutics* 14(7), p. 1455
- [5] Garaiová M., Zambojová V., Šimová Z., et al. (2014) *FEMS Yeast Res.* 14(2), p. 310
- [6] Zhang G., Wang H., Zhang Z., et al. (2022) *Crit. Rev. Biotechnol.* 42(4), p. 618
- [7] National Center for Biotechnology Information [Citované: 22. marec 2023]
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/QNQ00130.1>>
- [8] *Saccharomyces* genome database [Citované: 22. marec 2023]
<<https://www.yeastgenome.org/locus/S000003407/sequence>>
- [9] Gietz D., St Jean A., Woods R. A., et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20(6), p. 1425
- [10] Valachovič M., Garaiová M., Holič R., et al. (2016) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 469(4), p. 1123

Analýza genomickej DNA pacientov s kolorektálnym karcinómom s využitím long-range PCR a sekvenovania za účelom identifikácie mutácií v rámci mismatch - repair génov asociovaných s Lynchovým syndrómom

Lýdia Lukyová^{1,3}, Lucia Krasničanová², Tatiana Sedláčková^{3,4}, Jaroslav Budiš^{3,4,5}, Natália Forgáčová^{1,3}, Zuzana Holešová⁴, Tomáš Szemes^{1,3,4}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
lukyova6@uniba.sk

²Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta a Univerzitná nemocnica Bratislava, Ústav Lekárskej Biológie, Genetiky a Klinickej Genetiky, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovenská republika

³Univerzita Komenského v Bratislave, Vedecký park, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava, Slovenská republika

⁴Geneton s.r.o., Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava, Slovenská republika

⁵Centrum vedecko technických informácií, Lamačská cesta 8/A, 840 05 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Analysis of genomic DNA of patients with colorectal cancer using long-range PCR and sequencing in order to identify mutations in mismatch-repair genes associated with Lynch syndrome

Lynch syndrome is a hereditary type of autosomal dominant cancer syndrome that results from the presence of germline mutations in at least one of the *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *PMS2* genes. These genes are included in the group of mismatch repair (MMR) genes, which within a healthy human organism perform the task of repairing mispaired bases that occur during the DNA replication process. As a result of the malfunctioning of the MMR system, somatic mutations accumulate in patients with Lynch syndrome, which increases the lifetime risk of several types of cancer, but the most common are colorectal cancer and endometrial cancer.

Keywords: Lynch syndrome; colorectal cancer; MMR genes; long-range PCR; sequencing

Úvod a formulácia cieľa

Lynchov syndróm (LS, *Lynch syndrome*), známy aj pod názvom hereditárny nepolypózny kolorektálny karcinóm, je dedičný typ autozomálne dominantného syndrómu. Príčinou vzniku LS je prítomnosť mutácií v rámci niektorého génu zo skupiny mismatch – repair (MMR, *mismatch – repair*) génov, do ktorej zaraďujeme gény *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2*. Proteíny kódujúce MMR génmi vytvárajú heterodimérne komplexy MutS a MutL, ktoré vytvárajú MMR systém zabezpečujúci udržiavanie genomickej stability prostredníctvom rozpoznania a následnej opravy chybné párovaných báz pri procese DNA replikácie [1 – 3].

Práve prítomnosť mutácií v niektorom z MMR génov môže spôsobiť nefunkčnosť MMR systému. To sa následne prejavuje vo forme hromadenia somatických mutácií sprevádzaných mikrosatelitovou intabilitou, ktorá v konečnom dôsledku vyúsťuje až do

rakovinového bujnenia. Pre pacientov s LS je typickým zvýšenie náchylnosti na rozvoj nádorových ochorení. Priemerný vek nástupu niektorého typu alebo súčasne viacerých typov karcinómov asociovaných s LS je 44 rokov. Vo väčšine prípadov majú pacienti počas ich života až 70% riziko rozvoja kolorektálneho karcinómu, 70% riziko rozvoja karcinómu endometria a taktiež je možný rozvoj aj iných menej často sa vyskytujúcich typov nádorových ochorení, ku ktorým patria karcinóm vaječníkov, kože, žalúdka, močovodu, tenkého čreva a iných [3 – 4].

Kolorektálny karcinóm (CRC, *colorectal cancer*) je na základe údajov z GLOBOCAN celosvetovo tretím najčastejším typom rakoviny, pričom Slovensko, ktorého ročný prírastok pacientov s CRC je pomerne vysoký, je na popredných miestach celosvetového rebríčka. V rámci údajov z roku 2020 až 15,9 % zo všetkých typov karcinómov v rámci Slovenska tvoril práve CRC [5]. Z výskumu vyplýva, že približne 3% všetkých prípadov CRC vznikajú práve v dôsledku LS [6, 2]. Preto predpokladáme, že jednou z možných príčin vysokého ročného prírastku CRC v slovenskej populácii je zvýšený počet CRC asociovaného s LS.

V prípade LS je veľmi dôležitou skorá diagnostika syndrómu. A to nielen z hľadiska zvýšeného nároku na pravidelnosť vyšetrení pacientov a účinnosti liečby, ale aj z hľadiska familiárneho výskytu a prenosu mutácií. Medzi používané skriningové metódy LS patria imunohistochemické farbenie zamerané na identifikáciu prítomnosti proteínov MMR systému a testovanie prítomnosti mikrosatelitovej instability. Obidve spomínané metódy sú vykonávané v rámci nádorového tkaniva pacienta. Výstupy zo spomínaných testov je však z dôvodu často prítomných falošne pozitívnych výsledkov potrebné verifikovať pomocou genetického testovania prítomnosti mutácií v MMR génoch. Jednou z možností genetického testovania je kombinácia PCR reakcie a sekvenovania genomickej DNA zo vzorky krvi pacienta [2,7,8].

V rámci výskytu mutácií asociovaných s LS sa v 60 – 80% prípadov jedná o mutácie lokalizované v rámci génov *MLH1* a *MSH2* pričom výskyt mutácií v rámci génov *MSH6* a *PMS2* je menej častým [9].

Cieľom našej práce bola identifikácia a analýza mutácií v rámci MMR génov u pacientov s CRC s využitím vlastnej optimalizácie long – range PRC eseje a masívne paralelného sekvenovania.

Materiál a metódy

Izolácia genomickej DNA a amplifikácia pomocou long- range PCR

Na analýzu sme použili genomickú DNA (gDNA) izolovanú z periférnej krvi 2 pacientov s CRC s využitím kitu QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemecko).

Po izolácii sme merali koncentráciu gDNA na fluorometri Qubit 3.0. s použitím kitu Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, Eugene, OR, USA).

Následne prebehla amplifikácia gDNA pomocou long – range PCR s využitím TaKaRa LA Taq® DNA Polymerase Kit (Takara Bio Inc. San Jose, CA, USA) zvoleného na základe výsledkov štúdie Jia, H. a kol., z roku 2014 [10]. V rámci pôvodného protokolu sme vykonali nasledovné optimalizácie. Pripravili sme dva mastermixy pozostávajúce z LA Taq DNA Polymerázy (5 jednotiek/μl), dNTP mixu (2.5 mM každý), 10x LA PCR Buffer II (Mg²⁺ plus) a milipórovej vody, avšak v porovnaní s originálnym protokolom sme využívali polovičné množstvo týchto reagentov. Objem PCR reakcie zodpovedal 25 μl pričom pre každú vzorku gDNA sme v rámci PCR reakcie amplifikovali 36 amplikónov. Do PCR platničky sme pridali 24-krát 21,5 μl mastermixu 1 a 12-krát 20,5 μl mastermixu 2. Do každej jamky platničky sme následne pridali 2,5 μl gDNA nariadenej na koncentráciu 10 ng/μl. Nakoniec sme napipetovali správnu kombináciu PCR primerov (0,2-1,0 pmol/ μl), ktoré sme navrhli pomocou programu Primer3. Pričom do jamiek obsahujúcich 21,5 μl mastermixu 1 sme pridávali 0,5 μl forward a 0,5 μl reverse primeru a do jamiek obsahujúcich 20,5 μl mastermixu 2 sme pridávali 1 μl forward a 1 μl reverse primeru. Následne sme spustili PCR program s parametrami uvedenými v pôvodnom protokole.

Prečistenie amplikónov, meranie koncentrácie a elektroforéza v agarózovom gély

Prečistenie amplikónov od zvyškových komponentov PCR reakcie sme vykonali pomocou Beckman Coulter™ Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter Inc. Brea, CA, USA), následne sme zmerali koncentráciu na fluorometri Qubit 3.0. s použitím kitu Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, Eugene, OR, USA) a amplikóny sme nanášali na agarózový gél s koncentráciou agarózy 1,5% s použitím veľkostného štandardu Gene ruler 1 kb plus DNA.

Príprava sekvenačnej knižnice a sekvenovanie

Po separácii sme PCR produkty spoolovali s prihliadnutím na ich veľkosť a pripravili sme sekvenačnú knižnicu s využitím Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina Inc. San Diego, CA, USA). Pri príprave sekvenačnej knižnice sme v porovnaní s pôvodným protokolom používali polovičný objem reagentov. Kvalitu sekvenačnej knižnice sme overili elektroforézou na čipe na prístroji Agilent 2100 Bioanalyzer s použitím High Sensitivity DNA Kitu (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Sekvenovanie prebehlo s využitím platformy Illumina – NextSeq 2000 (Illumina Inc. San Diego, CA, USA).

Bioinformatické spracovanie sekvenačných dát a analýza variantov

V rámci primárnej analýzy dát sme vykonali kontrolu kvality sekvenačných čítaní

pomocou programu FastQC verzia 0.11.5 [11]. Na základe výsledných štatistík tohto programu sme odstránili nekvalitné konce niektorých čítaní a adaptérové sekvencie pomocou programu Trimmomatic verzia 0.36 [12]. V rámci sekundárnej analýzy sme na mapovanie čítaní na referenčný genóm použili program BWA [13]. Po generovaní súboru SAM sme čítania roztriedili na základe poradia na chromozómoch a indexovali pomocou programu SAMtools [14]. Následne sme použili program Picard [15] na odstránenie duplikátov čítaní a celkovú kontrolu kvality mapovania sme vykonali pomocou Qualimap 2 [16]. Finálnym výstupom analýzy sekvenačných čítaní boli dva súbory pacientov vo formáte VCF (*Variant Call Format*), ktoré v prípade prvého pacienta obsahovali 452 nájdených variantov, v prípade druhého pacienta 757. Filtrovanie identifikovaných variantov bolo vykonané z odbornej, verejne dostupnej databázy a pomocou programovacieho jazyka Python, ktorý v súčasnosti umožňuje vedeckým pracovníkom rýchlu a jednoduchšiu analýzu genetických variantov. V prvom kroku filtrovania variantov sme použili údaje z databázy ClinVar, pričom sme z uvedenej databázy vyfiltrovali všetky varianty asociované s LS a s klasifikáciou ako patogénne, pravdepodobne patogénne, varianty s neznámou signifikanciou, pravdepodobne benígne a benígne. Výsledkom bolo 3174 variantov, ktoré sme následne porovnali s VCF súbormi pacientov za účelom identifikácie variantov asociovaných s LS. Záverečnou časťou analýzy bolo porovnanie spoločných identifikovaných variantov medzi pacientmi.

Výsledky a diskusia

Výsledkom analýzy sekvenačných dát bolo 17 spoločných variantov zastúpených u 2 sledovaných pacientov s CRC (Tab. 1). Po dôkladnom porovnaní variantov s informáciami obsiahnutými v databázach ClinVar [17], dbSNP [18] a Varsome [19], sme identifikovali varianty zaradované do skupiny variantov s neznámou signifikanciou, pravdepodobne benígnych variantov a benígnych variantov. Nami identifikované varianty boli vo všetkých prípadoch zároveň študované v asociácii s LS.

Identifikované varianty predstavovali jednonukleotidové polymorfizmy (SNP, *Single nucleotide polymorphism*) v intrónových oblastiach v blízkosti génov *MLH1*, *MSH2* a *MSH6* ale aj SNP varianty v kódujúcich oblastiach MMR génov a to synonymné varianty a varianty so zmenou zmyslu (*missense*). V najväčšom zastúpení bolo 9 variantov v géne *PMS2*, 4 v géne *MSH6*, 3 v géne *MLH1* a 1 v géne *MSH2*. Najviac zaujímavým variantom sa javil variant rs63750668, v ktorého klasifikácii sa nezhodovali viaceré štúdie.

Tab. 1. Varianty identifikované v MMR génoch u pacientov s CRC

ID variantu	Chromozóm a pozícia	Alely (Ref/Alt)	Gén	Typ variantu	Klinický význam
rs4234259	chr3:37007142	A>G	<i>MLH1</i>	intrón	benígny
rs11129748	chr3:37025559	A>G	<i>MLH1</i>	intrón	benígny
rs2241031	chr3:37048783	C>T	<i>MLH1</i>	intrón	benígny
rs2347794	chr2:47429662	G>A	<i>MSH2</i>	intrón	benígny
rs3136329	chr2:47797737	C>T	<i>MSH6</i>	intrón	benígny
rs7562048	chr2:47805173	G>A	<i>MSH6</i>	intrón	benígny
rs3136359	chr2:47805798	T>C	<i>MSH6</i>	intrón	benígny
rs3136367	chr2:47806412	C>G	<i>MSH6</i>	intrón	benígny
rs1805319	chr7:5997349	G>C	<i>PMS2</i>	synonymný	benígny
rs267608167	chr7:5986813	T>C	<i>PMS2</i>	missense	s neznámou signifikanciou
rs551226281	chr7:5987076	T>C	<i>PMS2</i>	synonymný	pravdepodobne benígny
rs63750668	chr7:5987077	C>T	<i>PMS2</i>	missense	benígny/ s neznámou signifikanciou
rs2228006	chr7:5987144	T>C	<i>PMS2</i>	missense	benígny
rs1805320	chr7:5987277	G>A	<i>PMS2</i>	missense	benígny
rs786202567	chr7:5992027	T>C	<i>PMS2</i>	variant v iniciačnom kodóne	s neznámou signifikanciou
rs1802683	chr7:5973418	C>G	<i>PMS2</i>	missense	benígny
rs10000	chr7:5973522	A>G	<i>PMS2</i>	synonymný	benígny

Záver

Kvôli obmedzeniam našej štúdie, ako je napríklad veľkosť študovanej vzorky pacientov a extrémne nízkej frekvencii výskytu patogénnych variantov LS v bežnej populácii, sme u pacientov nedokázali identifikovať žiadne kauzálne varianty asociované s LS. Napriek tomu však naše výsledky poukazujú na potenciál a užitočnosť nami zvolených metód pre populačné genetické štúdie a lepšie pochopenie genetických súvislostí, ktoré ovplyvňujú riziko rakoviny. V budúcnosti preto plánujeme nami použitý prístup aplikovať na rozšírenú skupinu pacientov s CRC. Veríme, že získané poznatky môžu prispieť k objasneniu patogenézy nádorových ochorení a viesť tak k individualizovaným stratégiám prevencie a liečby.

PodĎakovanie

Táto publikácia vznikla vĎaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt ITMS: 313011W428 (BIOMEDIRES II) a pre projekt ITMS: 313011V578 (PreveLynch) spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Baretta M., Le D. T. (2018) *Pharmacol Ther.*, 189, p. 45
- [2] Abildgaard A. B., Nielsen S. V., Bernstein I., et al. (2023) *Br. J. Cancer.* 128(5), p. 726
- [3] Lynch H. T., Lanspa S., Smyrk T., et al. (1991) *Cancer Genet. Cytogenet.* 53(2), p. 143
- [4] Vasen H. F., Blanco I., Aktan-Collan K., et al. (2013) *Gut.* 62(6), p. 812
- [5] Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., et al. (2021) *C. A. Cancer J. Clin.* 71(3), p. 209
- [6] Biller L. H., Syngal S., Yurgelun M. B., (2019) *Fam. Cancer.* 18, p. 211
- [7] Lynch H., Snyder C., Shaw T., et al. (2015) *Nat. Rev. Cancer.* 15(3), p. 181
- [8] Yurgelun M. B., Hampel H. (2018) *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book.* 38, p. 101
- [9] Boland P. M., Yurgelun M. B., Boland C. R. (2018) *C. A. Cancer J. Clin.* 68(3), p. 217
- [10] Jia H., Guo Y., Zhao W., et al. (2014) *Sci. Rep.* 4(1), p. 5737
- [11] FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data [Citované: 20. marec 2023] <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>
- [12] Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. (2014) *Bioinformatics.* 30(15), p. 2114
- [13] Li H., Durbin R. (2009) *Bioinformatics.* 25(14), p.1754
- [14] Li H., Handsaker B., Wysoker A., et al. (2009) *Bioinformatics.* 25(16), p. 2078
- [15] Picard [Citované: 20. marec 2023] <<https://broadinstitute.github.io/picard/command-line-overview.html>>
- [16] Okonechnikov K., Conesa A., García-Alcalde F. (2016) *Bioinformatics.* 32(2), p. 292
- [17] ClinVar [Citované: 20. marec 2023] <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>>
- [18] dbSNP [Citované: 20. marec 2023] <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>>
- [19] Kopanos Ch., Tsiolkas V., Kouris A., et al. (2019) *Bioinformatics.* 35, p. 1978

Vplyv 10 nm nanočastíc zlata s obalom BSA na myšie hepatocyty (*in vitro*) a tkanivo pečene u myši (*in vivo*)

Radka Macová^{1,2}, Michal Šelc², Andrea Bábelová²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; radka.macova@savba.sk

²Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Ústav experimentálnej onkológie, Oddelenie nanobiológie, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Impact of 10 nm BSA-coated gold nanoparticles on mouse hepatocytes (*in vitro*) and mouse liver tissue (*in vivo*)

Gold nanoparticles are considered the most suitable material for a wide range of medical applications. However, systemic distribution and subsequent accumulation in vital organs (such as the liver) can be observed after administration of nanoparticles into organism. The presence of this exogenous material in the body brings several questions about its biological safety, which have not been answered yet. Therefore the aim of this study was to extend the available data on the possible adverse effect of 10 nm BSA-coated gold nanoparticles on the AML12 cell line (mouse hepatocytes) (*in vitro*) and mouse liver (*in vivo*). According to the results obtained from *in vitro* and *in vivo* experiments, the tested nanoparticles do not have a serious adverse effect on either AML12 cells (after 24 h treatment) or mice (after 30 days from treatment). Despite these optimistic results, many more analyzes are needed before implementing nanoparticles into routine medical practice.

Keywords: gold nanoparticles; hepatocytes; liver

Úvod a formulácia cieľa

V súčasnosti sú nanočastice zlata (AuNPs) považované za nanomateriál s najväčším potenciálom pre uplatnenie v biomedicínskom výskume, medicínskej a laboratórnej praxi. Esenciálnu úlohu by mohli zohrávať v nanomedicíne ako nosič na cielený transport liečiv, ktorého zámerom je zníženie dávky, zvýšenie účinnosti liečby a v ideálnom prípade úplne odstránenie nežiadúcich vedľajších účinkov [1 – 2]. Vhodným nosičom pre transport liečiv by mohli byť napríklad sférické AuNPs s priemerom 10 nm obalené albumínom z hovädzieho séra (BSA). Nanočastice, ktorých povrch tvorí práve tento proteín sa vyznačujú vysokou stabilitou, nepôsobia cytotoxicky, nevyvolávajú u myši klinické príznaky toxicity, zmeny v morfológii tkanív, ani parametroch determinujúcich funkčnosť pečene a obličiek [3]. Podobne ako obalový materiál aj priestorová geometria a rôzna veľkosť významným spôsobom prispieva ku charakteristickým vlastnostiam nanočastíc [4 – 5], avšak na komplexnejšie posúdenie vplyvu obalového materiálu, tvaru a veľkosti jednotlivých nanomateriálov je potrebné vykonať experimenty, ktorých dizajn spočíva v zmene len jedného z uvedených parametrov.

Nakoľko v prípade nanočastíc ide o pomerne nový materiál, biomedicínsky výskum prichádza do stretu s viacerými problémami – okrem nedostatočných informácií o vplyve rôznych parametrov na vlastnosti nanomateriálov, ide aj o nepreskúmané dôsledky akumulácie nanomateriálov v organizme. Cieľom tejto práce je posúdenie biologickej bezpečnosti daných nanočastíc nielen *in vitro* na myších hepatocytoch, ale aj *in vivo* v organizme myši.

Materiál a metódy

AML12 Bunková línia myších hepatocytov AML12 bola kultivovaná v termostate (37°C, 5 % CO₂) v DMEM:F12 médiu s 10 % FBS (fetálne hovädzie sérum), 1 % penicilín-streptomycín, 1 % ITS (inzulín-transferín-selén) a 40 ng/ml dexametazónu.

MTT test Na 96-jamkovú platničku boli nasadené bunky AML12 v množstve $1,5 \times 10^4$ buniek/jamka. O 48 hodín neskôr boli bunky ovplyvnené BSA-AuNPs v koncentráciách 0-50 µM v médiu so zníženým obsahom FBS (2 %). Po uplynutí 24 hodín bolo médium odstránené, bunky boli premyté PBS a následne bolo do každej jamky pridané čerstvé médium s MTT farbičkou. Po 3 hodinovej inkubácii bolo médium vymenené za DMSO a absorbancia jednotlivých vzoriek bola meraná spektrofotometricky pomocou prístroja X-mark pri vlnovej dĺžke 540 nm.

Bunkový cyklus Na 6-jamkovú platničku boli nasadené bunky AML12 v množstve 1×10^5 buniek/jamka. O 72 hodín boli bunky ovplyvnené BSA-AuNPs v koncentráciách 0-50 µM. Po uplynutí 24 hodín boli bunky trypsinizované a pelet buniek bol premytý PBS. Ku jednotlivým peletom bolo pridaných 300 µl roztoku TritonX a 15 µl RNázy A. Takto pripravené vzorky boli inkubované 20 min pri teplote 37°C. Na záver do každej skúmanky bolo pridaných

10 µl propidiumjodidu a vzorky boli analyzované pomocou prietokového cytometra.

Polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase (RT-PCR) Z pečeni 8 – 10 týždňov starých samcov myši kmeňa C57BL/6, ktorým boli 30 dní pred odobratím orgánov jednorazovo intravenózne podané 10 nm BSA-AuNPs bola izolovaná RNA pomocou TRIreagentu (Sigma) : chloroformu : izopropanolu. Na purifikáciu RNA od genómovej DNA sa použila DNase I, RNase-free (Thermo Scientific™) a RNA sa prepísala pomocou RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific™). RT-PCR sa vykonala pomocou primerov z Tab. 1. a FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche) s teplotným profilom podľa odporúčaní výrobcu v cykleri AriaMX (Agilent).

Tab. 1. Primery použité na RT-PCR Zoznam primerov, ktoré boli použité na RT-PCR s ich sekvenciami

gén	priamy primer	spätný primer
<i>Cat</i>	5'-GCATCGAGCCCAGCCCTGAC-3'	5'-GCACATGGGGCCATCACGCT-3'
<i>Colla1</i>	5'-GTCCCAACCCCCAAAGAC-3'	5'-CATCTTCTGAGTTTGGTGATACGT-3'
<i>Col III</i>	5'-TGGTTTCTTCTCACCTTCTTC-3'	5'-TGCATCCAAATTCATCTACGT-3'
<i>F4/80</i>	5'-TGGATGCTAGTGAGGCAGTGATG-3'	5'-GCAATGGCCTTGAAGGTCAGCAAC-3'
<i>Fn1</i>	5'-ATGCACCGATTGTCAACAGA-3'	5'-TGCCGCAACTACTGTGATTC-3'
<i>Il1β</i>	5'-GACCTTCCAGGATGAGGACATGAG-3'	5'-GGTGGGTGTGCCGTCTTTCATTAC-3'
<i>iNos</i>	5'-GCTCGCTTTGCCACGGACGA-3'	5'-AAGGCAGCGGGCACATGCAA-3'
<i>Tnfa</i>	5'-CCCACGTCGTAGCAAACCACCAAG-3'	5'-TCCAAAGTAGACCTGCCCCGACTC-3'
<i>Xdh</i>	5'-ATCTGGAGACCCACTGCACC-3'	5'-TGTGCTCACGAAGAGCTCAAT-3'
<i>β-act</i>	5'-CAAGTACTCTGTGTGGATCGG-3'	5'-TGCTGATCCACATCTGCTGG-3'

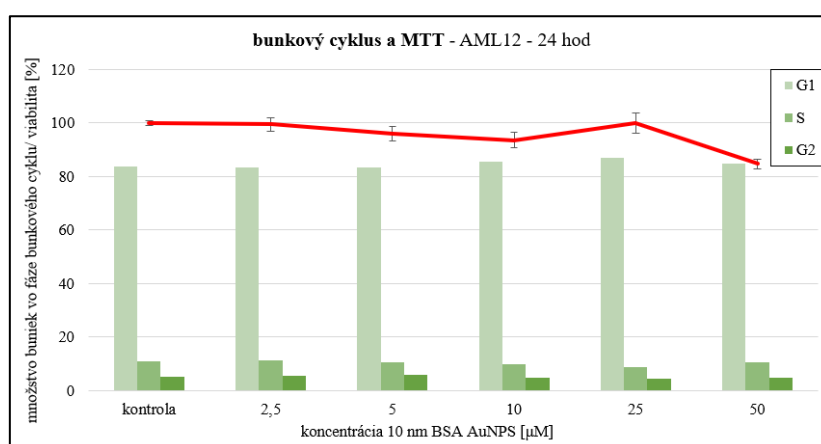
Tkanivá pečene spracované pre histologické účely Parafínové bločky obsahujúce tkanivá pečene boli nakrájané na mikrotóme na rezy s hrúbkou ~5 μ m. Tieto rezy boli vložené do kúpeľa s teplotou vody 37°C, z ktorého boli po krátkej dobe prenesené na podložné sklíčka a vysušené v inkubátore pri teplote 37°C.

Histologické farbenie Podložné sklíčka s rezmi pečene sa inkubovali postupne s xylolom, etanolmi (100 %, 96 %, 70 %, 50 %, 30 %) a destilovanou vodou. Následne boli tkanivá pečene vystavené pôsobeniu kyseliny pentahydrogénjodistej a Schiffovmu činidlu. Po premývaní bol na tkanivá nanesený hematoxylín, následne boli vzorky premývané vodou a na záver boli rezy pečene premyté v 70 % etanole, vysušené v inkubátore pri 37°C a zamontované do Entellanu.

Imunohistochemické farbenie Podložné sklíčka s rezmi pečene boli inkubované postupne s xylolom, etanolmi (96 %, 70 %, 50 %) a destilovanou vodou. Následne boli vzorky inkubované pri teplote 37 °C s *Digest-All Pepsinom*. Po premytí bol ku vzorkám pridaný roztok azidu sodného a H₂O₂. Po premytí nasledovala inkubácia v roztoku so sušeným mliekom, PBS a Tritonom X-100. Inkubácia s primárnou protilátkou (anti-F4/80 (*rabbit*)/ anti-Fibronektín (*rabbit*) - riedené s Rotiblock-om 1:200) prebiehala cez noc pri teplote 4°C. Na ďalší deň boli vzorky inkubované so sekundárnou protilátkou (*goat-anti-rabbit* POD). Po inkubácii boli tkanivá premyté PBS, vystavené 3,3'-diaminobenzidínovému substrátu a opäť premyté PBS. Na záver bol ku tkanivám pridaný hematoxylín, po ktorom boli vzorky preplachované vodou, vystavené 70 % etanolu a po sušení pri 37°C zamontované do Entellanu.

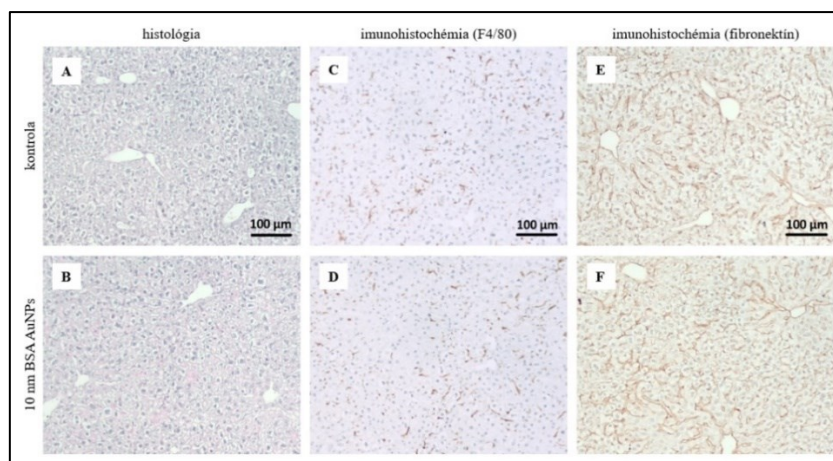
Výsledky a diskusia

Cytotoxický efekt 10 nm BSA-AuNPs na bunky AML12 bol skúmaný prostredníctvom MTT testu. Získaná krivka životaschopnosti naznačuje, že k miernemu poklesu životaschopnosti dochádza len v prípade ovplyvnenia buniek po dobu 24 hodín najvyššou testovanou koncentráciou (50 μ M) 10 nm BSA-AuNPs (Obr. 1). Podobný efekt bol pozorovaný aj po ovplyvnení ľudskej bunkovej línie HepG2 rovnakým typom nanočastíc [6]. Na analýzu bunkového cyklu bola využitá prietoková cytometria. Po 24-hodinovom ovplyvnení buniek AML12 BSA-AuNPs nedochádza v prípade žiadnej z použitých koncentrácií k zmenám v bunkovom cykle (Obr. 1).



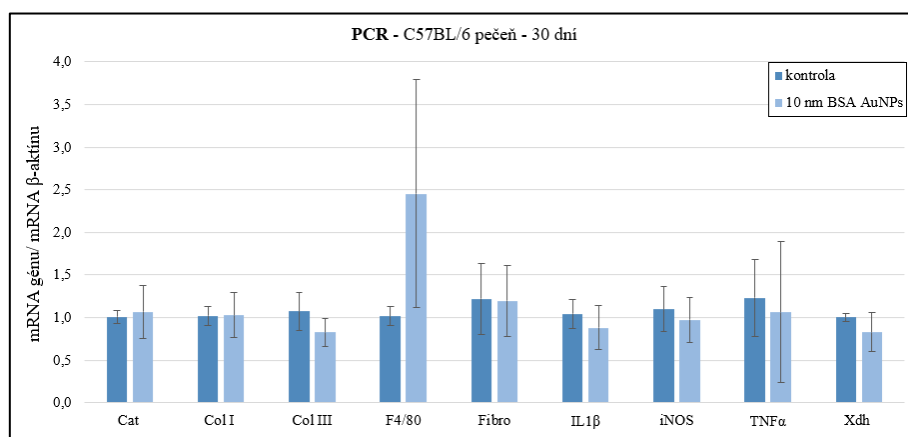
Obr. 1. Krivka životaschopnosti buniek AML12 po 24-hodinovom ovplyvnení rôznymi koncentraciami 10 nm BSA AuNPs a analýza vplyvu testovaných nanočastíc na bunkový cyklus týchto buniek Hodnoty, na základe ktorých bola zostavená krivka životaschopnosti, predstavujú priemer 8 paralelných experimentov

Histologické farbenie naznačuje, že po podaní testovaných nanočastíc nedochádza po 30 dňoch v pečeni k morfológickým zmenám (Obr. 2 A – B). Podobný efekt bol sledovaný aj pri myšiach kmeňa BALB/c s 10 nm AuNPs, avšak táto štúdia trvala iba 6 hodín [7]. Imunohistochemickým farbením taktiež neboli pozorované zmeny v množstve glykoproteínu F4/80 a fibronektínu, čo naznačuje fyziologickú prítomnosť rezidentných makrofágov v tkanivách pečene a fibronektínu v extracelulárnej matrix (Obr. 2 C – F).



Obr. 2. Histologické farbenie, imunohistochemické farbenie na detekciu prítomnosti F4/80 a fibronektínu vo vzorkách pečene 30 dní od ovplyvnenia testovanými nanočasticami (kontrola = vzorka pečene myši, ktorej bol jednorazovo podaný 5% roztok glukózy bez 10 nm BSA AuNPs; 10 nm BSA AuNPs = vzorka pečene myši, ktorej bol jednorazovo podaný 5% roztok glukózy s 10 nm BSA-AuNPs)

Prostredníctvom RT-PCR boli na úrovni mRNA sledované zmeny v expresii génov súvisiacich so zápalovým procesom, oxidačným poškodením a fibrotizáciou tkaniva, ktoré môže vzniknúť v dôsledku ovplyvnenia modelových organizmov AuNPs. Výsledky RT-PCR analýzy tkanív pečene myši naznačujú, že po 30 dňoch od podania 10 nm BSA-AuNPs nedochádza ku štatisticky významným zmenám génovej expresie na úrovni mRNA v žiadnej z pozorovaných skupín génov (Obr. 3).



Obr. 3. Relatívna expresia génov *Cat*, *Col1a1*, *Col III*, *F4/80*, *Fn1*, *Il1β*, *iNos*, *Tnfa* a *Xdh* vo vzorkách pečene kontrolných myši a myši ovplyvnených 10 nm BSA AuNPs po dobu 30 dní Znáznomené výsledky predstavujú priemer hodnôt získaných pre 2 kontrolné a 3 ovplyvnené vzorky. Štatistická analýza bola vykonaná pomocou dvojvýberového T-testu s nerovnakým rozptylom, pričom: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ a *** $p < 0.001$

Dosiahnuté výsledky môžu súvisieť s tým, že 10 nm AuNPs s väčšou pravdepodobnosťou indukujú akútnu zápalovú reakciu ako chronický zápal [8]. Skutočnosť, že v dôsledku opakovanej expozície potkanov AuNPs dochádza v ich pečeni

ku významnému poklesu množstva/ aktivity katalázy [9 – 10] je jedným z dôvodov pre zaradenie génov súvisiacich s oxidačným poškodením do palety testovaných génov. Podobne možno odôvodniť výber génov súvisiacich s fibrotizáciou tkaniva experimentom, v ktorom vplyvom aplikácie AuNPs na myšiu bunkovú líniu nastalo zvýšenie expresie *Colla1* [11].

Záver

Napriek tomu, že uvedené výsledky potvrdzujú biologickú bezpečnosť 10 nm BSA AuNPs v *in vitro* aj *in vivo* podmienkach, je potrebné overiť možné negatívne dôsledky pôsobenia nanočastíc v iných orgánoch a v organizme po časových úsekoch dlhších ako 30 dní.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla s podporou grantu Agentúry na podporu výskumu a vývoja pod číslom APVV-16-0579 a grantu Vedeckej grantovej agentúry MŠVVaŠ SR a SAV pod číslom VEGA 2/0116/22.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Kumar A., Zhang X., Liang X. J. (2013) *Biotechnol. Adv.* 31(5), p. 593
- [2] Iqbal J., Anwar F., Afridi S. (2017) *Infect. Disord. Drug Targets* 17(3), p. 149
- [3] Das S., Debnath N., Mitra, et al. (2012) *Biometals* 25(5), p. 1009
- [4] Steckiewicz K. P., Barcinska E., Malankowska A., et al. (2019) *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 30(2), p. 1
- [5] Xia Q., Huang J., Feng Q., et al. (2019) *Int. J. Nanomedicine* 14, p. 6957
- [6] Macová R. (2022) Analýza zmien štruktúry a funkcie tkanív v dôsledku biodistribúcie a akumulácie 10 nm nanočastíc zlata s obalom BSA v organizme myši. (Diplomová práca) Univerzita Komenského v Bratislave
- [7] Yang Y., Fan S., Chen Q., et al. (2022) *J. Nanobiotechnol.* 20(1), p. 1
- [8] Khan H. A., Abdelhalim M. A. K., Alhomida A. S., et al. (2013) *Biomed. Res. Int.* 2013, p. 1
- [9] Al-Hamadani M. Y., Alzahrani A. M., Yousef M. I., et al. (2020) *Int. J. Nanomedicine* 15, p. 5005
- [10] Alshammari G. M., Abdelhalim M. A., Al-Ayed M. S., et al. (2022) *Nutrients* 14(16), p. 3327
- [11] Gioria S., Chassaigne H., Carpi D., et al. (2014) *Toxicol. Lett.* 228(2), p. 111

MinION operon sequencing of Pazo de Raxoi (Santiago de Compostela, Spain) mural samples

Francesca Maisto¹, Nikola Klištincová¹, Anxo Mendez Villar², Zuzana Farkas¹, Jelena Pavlović¹, Patricia Sanmartín², Lucia Kraková¹, Magdaléna Rusková¹, Domenico Pangallo¹

¹*Institute of Molecular Biology of Slovak Academy of Sciences, v. v. i., Dúbravská Cesta 21, 84551 Bratislava, Slovak republic; maisto2@uniba.sk*

²*Grupo GEMAP. Grupo de Estudios Medioambientales Aplicados al Patrimonio natural y cultural, GI-1243 Ferrovial Construcción S.A. Departamento de Edafología e Química Agrícola, Facultade de Farmacia, Universidade de Santiago de Compostela, 15782, Santiago de Compostela, Spain*

Abstract

Pazo de Raxoi is a historic building in Santiago de Compostela, A Coruña province, Galicia, Spain. It was restored by the Consorcio de Santiago in 2011 and has since integrated the museum network of the historic city. It is currently a visitable exhibition building. In this study we have analyzed the bacterial communities of different mural samples of the internal courtyard (Patio de la Carcel) of the building in relation to their type of lighting. The analysis was based on high-throughput sequencing (MinION platform). By this approach it was possible to identify the diversity of the bacterial community present on the wall of the building and to understand whether the lighting positively or negatively influences bacterial growth.

Keywords: *MinION approach; Sequencing; Bacteria; Ribosomal operon; Cultural Heritage*

Introduction

Pazo de Raxoi ('Palace of Raxoi'; Spanish: Palacio de Rajoy) is a neoclassical palace in Santiago de Compostela, Galicia, Spain. Completed in 1766, it is located on the Praza do Obradoiro, in front of the cathedral. It is the seat of the city council and regional government and the Local police department. The illumination experiment set-up is located in an interior courtyard within the police department that gives access to some dungeons (hence the code name Patio de la Carcel or Prison Yard). It was selected as it presented a poor state of conservation (green patinas and vascular plants) and is closed to human transit. In this study we tried to answer the question of whether there are differences among bacteria present in different areas of the internal facade of the courtyard which could be related to the type of light and lighting applied every day. The analysis of the bacterial community was performed by the long-amplicon sequencing of the almost entire ribosomal operon (around 4000 bp) using the MinION device.

Materials and Methods

Three samples (A, B and C) were taken from the inner facade of the courtyard of the Patio de la Carcel (old prison courtyard). The first two were taken from two different areas illuminated with a metal halide lamp and CromaLux LED prototype 1 (amber + green), respectively, night lighting from 21:00 to 03:00 with a duration of 7 months. In particular, the CromaLux 1 prototype emits amber and green light with a low bandwidth. Sample C was not subjected to illumination and therefore is considered as a negative control. For each sampling point in the building slab, a surface of a size of 15x15 cm² was selected. Each area was sampled using swabs moistened with sterile phosphate buffer solution (PBS, 10 mL).

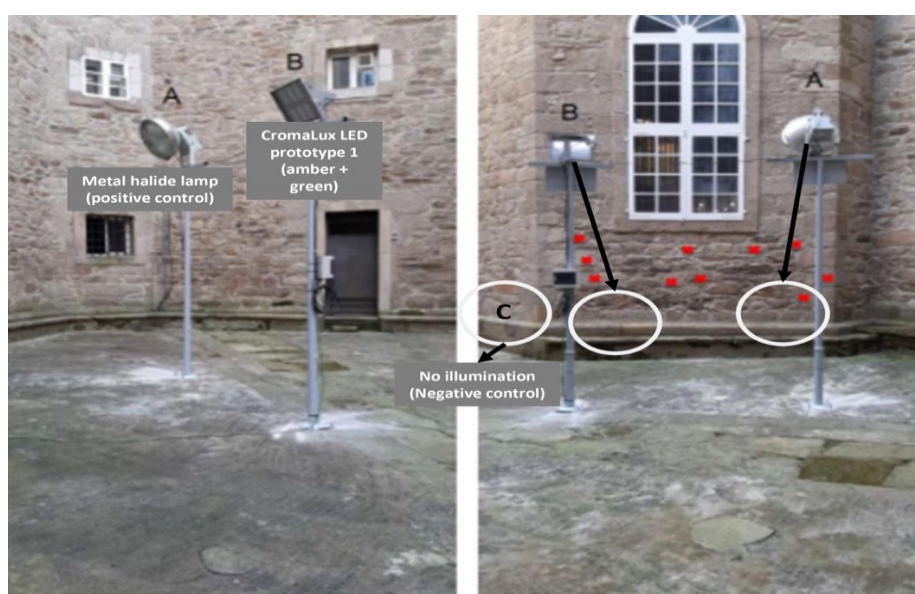


Fig. 1. Experimental set-up details in the inner courtyard. A: Metal halide lamp; B: CromaLux light; C: No illumination (negative control).

The samples were transported to the laboratory where they were frozen and stored at the same day at -80 °C. Subsequently we proceeded with molecular analyzes based on DNA extraction and sequencing using the MinION. [1]

DNA extraction, PCR amplification and MinION sequencing

Ten ml of each sample (A-C) in phosphate buffer were filtered through a 0.2 µm pore size nitrocellulose membrane. The membranes were cut in small pieces and the DNA was extracted using Dneasy PowerSoil extraction kit (Qiagen) following the protocol provided by the producer. The bacterial operon was amplified with the primers 27f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') and 2241r (5' ACCGOCCCAGTHAACT 3'). [1]

The sequencing library of *rrn* operons amplified from 3 different samples was prepared following the instructions provided in the protocol for ligation sequencing kit [SQK-LSK109; Oxford Nanopore Technologies (ONT), Oxford, UK]. Briefly, the initial DNA concentrations of all 3 samples were checked and adjusted to concentrations of 20 ng/μl DNA suspended in nuclease-free water (Qiagen) prepared in 1.5 mL LoBind microtubes (Eppendorf, Hamburg, Germany). A volume of 50 μl of each of these aqueous DNA suspensions, instead of the recommended 45, was used for the preparation of each 60 μl of the end-repair/dA-tailing reaction prepared in 0.2 thin-wall PCR tubes mixing with 7 μL of Ultra II End-prep Reaction Buffer and 3 μL of Ultra II End-prep Enzyme Mix. Multiplexing was done using six barcodes (BC01-BC03) from PCR Barcoding Expansion Kit 1–12 (EXP-PBC001; ONT). [1] The prepared libraries were loaded onto MinION flow cell FLOW-MIN 106D R9 version (ONT). For the Barcoding PCR, the following steps were used: initial denaturation step (95 °C, 3 min), followed by 19 cycles (95 °C for 15 s.; 62 °C for 15 s.; 65 °C for 2 min) and final extension step (65 °C for 10 min). [1] Were performed between each of the three abovementioned parts. The following steps i.e., cleanup with AMPure XP beads (Beckman Coulter, Brea, California, USA), DNA repair and final preparation, adapter ligation, and cleaning, priming and loading the SpotON FLO-MIN106D flow cell (R9.4.1; ONT) were performed according to the instructions of the SQK-LSK109 (ONT) protocol. [1]

Data processing and analyses

The sequencing run was performed for 24 hours on the MinION sequencer (Oxford Nanopore Technologies, ONT) using the R9 flow cell, connected to the appropriate personal computer meeting the recommended criteria. MinKNOW™ software was used to check the number of active pores and used with default settings. After sequencing, the Fast5.tmp files were converted to Fast5 files via the command prompt. Basecalling was done using Guppy v.5.0.16. [2] The adapter sequences were removed using Porechop v.0.2.4.[3] Reading processing was performed using NanoFilt v.2.8.0 (De Coster et al., 2018). Reads with a quality score below Q10 were also filtered out. [1] Taxonomic classification and quantitative analysis of reads derived from bacterial and fungal operons were performed using the "Kraken2" tool (v2.2.1). [1] The database used during the Kraken2 classification consisted of the PLUS PF (standard plus protozoa and fungi, constructed on September 19, 2020). R Survival Packs; survival, survminer and survdiff were used for Phylum and Gene abundance analysis. [1]

Result and Discussion

In sample A several phyla were identified, the most abundant was Firmicutes with 95.5%. Other phyla included Proteobacteria 3%, Actinobacteria 0.06%. In the sample B the phylum Firmicutes had an abundance of 89.5%. In addition, the phyla Actinobacteria (5.2%), Proteobacteria (4.3%) and Bacteroidota (0.6%) were also detected.

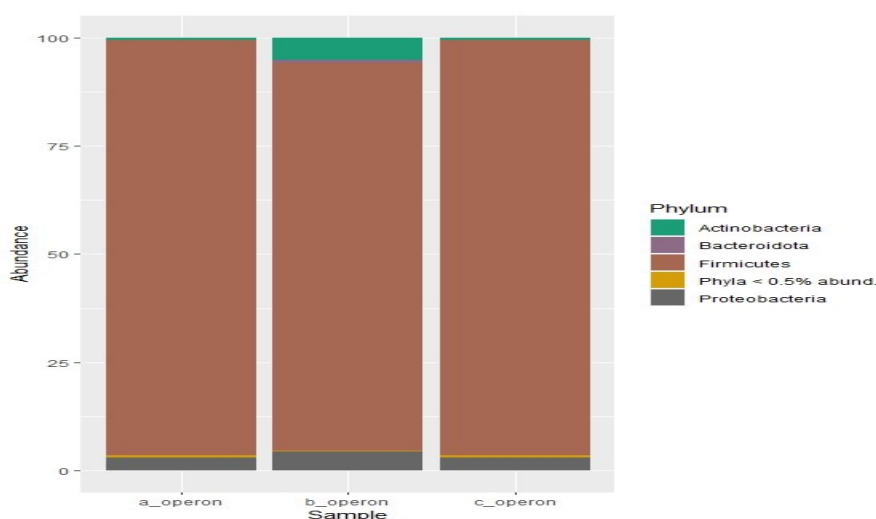


Fig.2 Phylum abundance.

MinION sequencing representing relative abundance of bacterial Phyla.

Phyla < 0.5 %” included the taxa for which the relative abundance in given samples did not reach higher than 0,5%.

Sample C, considered as negative control, had almost the same microbial characteristics as sample A, in fact the phyla Firmicutes (95.5%), Proteobacteria (3%) and Actinobacteria (0.06%) were identified (Fig. 1).

Considering the detected genera in samples A a significant amount of *Peaenibacillus* (93.4%) was found. Moreover, *Pseudomonas* (1.2%), *Peribacillus* (1.5%) and *Cupriavidus* (0.5%).

In sample B the genera *Psychrobacillus* (63.3%), *Bacillus* (17.2%), *Peribacillus* (8.2%), *Rubrobacter* (4.07%) and *Pseudomonas* (2.02%) were identified.

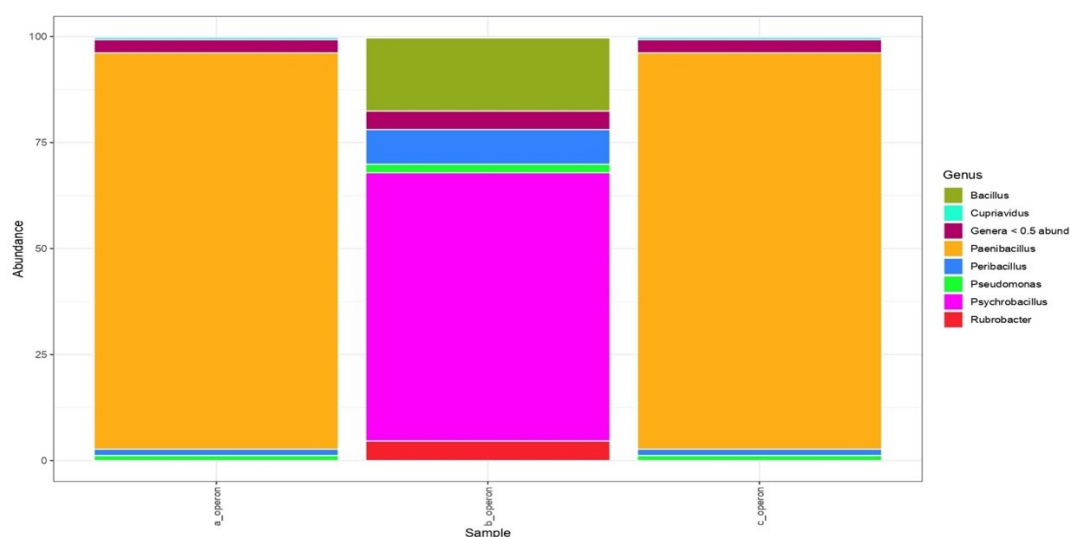


Fig 3 Genus abundance.
Graph elaborated by Rstudio which represents the abundance of genera in the samples detected by MinION sequencing.

The sample C again, also at genus level, displayed a remarkable similarity with sample A. Significant amount *Paenibacillus* (93.4%) was detected, followed by *Pseudomonas* (1.2%), *Peribacillus* (1.5%) and *Cupriavidus* (0.5%). “Genera <0,5% abund” representing the taxa that did not reach abundance higher than 0.5 % altogether reached the abundances of 4 % in samples A and C and 4,3 % in samples B. The second most dominant bacterial group belongs to the phylum Proteobacteria which is consistent with reports from many other studies related to cultural heritage ecosystems. [4] Actinobacteria are abundant in nature, and also in cultural heritage stone objects. They can be found in the extreme cold of the Arctic, boiling hot springs and salty seas. Some Actinobacteria thrive in environments that maintain a stable temperature between 10 and 15 °C and with relatively high humidity. [4] Different Actinobacteria colonize different rock surfaces based on the chemistry of the rock and the needs of the bacteria. *Paenibacillus* species were detected in samples A and C. Bacteria belonging to this genus have been isolated or encountered in a variety of environments, but most are found in soils often associated with plant roots. [5] The plant-associated species of *Paenibacillus* act as a plant growth promoter by producing various substances and fixing atmospheric nitrogen. Moreover, the members of the genus *Bacillus* are predominant in soil and several species have been reported from different ecological niches. [5]

Conclusion

In conclusion, it is possible to say that the sequencing of the almost entire bacterial ribosomal operon permit a more precise identification of the potential stone-degrading microorganisms. Therefore, the MinION approach was able to sequenced big amplicons of 4000 bp size. Unfortunately, our, survey did not evidenced the really efficiency of the illumination systems for mitigating the occurrence of stone-deteriorating bacteria. Therefore, further research is needed in the future oriented to the identification of other microbial groups, for example cyanobacteria and algae which are more sensitive to the different wavelengths of utilized lamps.

Acknowledgement

This study was supported by the projects APVV-19-0059, VEGA 2/099/2021 and the European Regional Development Fund project 313011V578.

Reference

- [1] Pavlović J., Bosch-Roig P., Rusková M., et al. (2022); *Applied Microbiology and Biotechnology* 106 p. 4297
- [2] Oxford Nanopore Technologies, ONT. [Cited: March 20, 2023]
- [3] Porechop v.0.2.4 [Cited: March 24, 2023]
- [4] Youssef N.H., Elshahed M. (2008); *Journal of Microbiological Methods* 75, (1), p. 86
- [5] Nicholas Grady E., MacDonald J., Liu L., et al. (2016) *Microbial Cell Factories* 15:203, p. 1

Využitie 3D bunkového modelu na štúdium liečivých látok na báze glykozaminoglykánov a sulfátovaných heteropolysacharidov

Silvia Majcherová¹, Lucia Zajíčková², Jozef Zima², Roman Bubica¹, Eva Nováková^{1,2},
Veronika Mikušová², Miroslava Šuplíková^{1,2}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie, Ilkovičová 6, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
majcherova8@uniba.sk

²Univerzita Komenského v Bratislave, Farmaceutická fakulta, Katedra galenickej farmácie, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava 3, Slovenská republika

Abstract

The use of a 3D cell model for the study of medicinal substances based on glycosaminoglycans and sulfated heteropolysaccharides

The current trend in cancer research is to approach the study and testing of drugs on 3D cell cultures. Cells cultured in 3D represent an alternative model to *in vivo* experiments. One of the most common and versatile methods of cell cultivation in 3D is spherical cell clusters – spheroids. The goal of the contribution was to define substances chondroitin sulfate and fucoidan. We prepared spheroids from BHK-21 and Hepa1c1c7 cell lines. We characterized the components of the oral suspension and their effect on the growth, viability and clonogenicity of cells in 3D. Using the flow cytometry method, we determined the quantitative representation of apoptotic, dead and living cells in the spheroids. Our experiments brought original results, we found that the size of spheroids from Hepa1c1c7 after treatment with substances fucoidan and chondroitin sulfate was significantly smaller compared to spheroids from BHK-21. Flow cytometry results indicated a lower percentage of live cells in Hepa1c1c7 spheroids after treatment with the studied substances.

Keywords : *chondroitin sulfate; fucoidan-sulfated heteropolysaccharide; 3D cell cultures*

Úvod a formulácia cieľa

V posledných rokoch sa vo výskume rakoviny dostáva do popredia štúdium a testovanie liečiv na 3D bunkových kultúrach. 3D modely bunkových kultúr sú charakteristické vlastnosťami, ktoré sú bližšie ku komplexným podmienkam *in vivo* [1]. Mikroskopické klastre buniek tvoriace sférické bunkové zhľuky tvorené vlastným zostavením sa nazývajú sféroidy. Sú jednou z najbežnejších a najuniverzálnejších metód kultivácie buniek v 3D [2]. Nevýhodou 2D bunkových kultúr je to, že nemajú schopnosť napodobňovať prirodzené štruktúry tkanív alebo nádorov [3]. 3D kultivačné systémy predstavujú model, ktorý v porovnaní s tradičnou 2D monovrstvou lepšie simuluje interakcie bunka-bunka a bunka-extracelulárna matrix (ECM)[5]. Sféroidy sú vytvorené na základe schopnosti adherujúcich buniek agregovať [6]. Generujú sa z veľkého množstva bunkových typov vrátane nádorových sféroidov, embryoidných teliesok, hepatosfér, neurosfér a mamosfér [4]. Sféroidy sú zložené z buniek v rôznych štádiách a to z proliferujúcich, pokojových, apoptotických, hypoxických a nekrotických [6].

Rastúci záujem o výskum interakcií glykozaminoglykánov s proteínmi a ich úlohy pri ľudských ochoreniach prináša nové liečivá zamerané na špecifické interakcie. Najviac zastúpeným glykozaminoglykánom v extracelulárnom priestore je chondroitín sulfát (CS), ktorý je základnou zložkou spojivových tkanív. Podieľa sa na mnohých fyziologických a biologických procesoch, akými sú pevnosť a elasticita kĺbovej chrupavky, hemostáza, zápal, regulácia vývoja buniek, bunková adhézia, proliferácia a diferenciácia buniek, metastatické procesy. Nadmerná expresia chondroitín sulfátu je spojená s niekoľkými typmi nádorov, vrátane malígneho melanómu, spinocelulárneho karcinómu, karcinómu prsníka, oligodendrocytómov alebo gliómov. Fukoidan (F), zástupca heteropolysacharidov sa vyznačuje širokým spektrom klinicky overených fyziologických účinkov, vrátane imunomodulačných, je schopný *in vivo* zvýšiť aktivitu NK buniek, ktoré napomáhajú regresii tumoru, a taktiež je schopný zvýšiť hladinu cytotoxických T-lymfocytov [7].

Cieľom nášho experimentálneho výskumu je charakterizovať zložky perorálnej suspenzie, tj. CS a F využitím 3D modelu nádorových (Hepa1c1c7) a nenádorových (BHK-21) bunkových línií. Zameriame sa na sledovanie rastu, morfológie a viability buniek formovaných do sféroidu. Metódou prietokovej cytometrie budeme monitorovať zastúpenie všetkých foriem buniek (živých, mŕtvych, apoptotických a nekrotických) vo sféroide po pridaní nami študovaných látok.

Materiál a metódy

Hepa1c1c7 - stabilizovaná adherentná bunková línia, derivovaná z hepatocelulárneho karcinómu myši C57L;

BHK-21 - stabilizovaná adherentná bunková línia, derivovaná z obličky 1-dňového zdravého sýrskeho škrečka;

Chondroitín sulfát 99% Gnosis Bioresearch, 0,004% w/w;

Fucoidan 70% KangCare Biotech, 0,002% w/w.

Príprava sféroidov metódou prekrytia tekutinou

Na prípravu sféroidov sme použili nenádorovú bunkovú líniu BHK-21 a nádorovú bunkovú líniu Hepa1c1c7. Princípom metódy je prekrytie jednotlivých jamiek 96-jamkovej platničky v tvare U neadhezívnym substrátom - v našom prípade sme použili 1% roztok agarózy (1g agaróza, 100 ml fyziologický roztok PBS). Do každej jamky sme pridali 200 µl roztoku agarózy, ktorý je nutné po pár sekundách odobrať, aby sa nám vytvorila tenká agarózová vrstva. Následne sme na 96-jamkovú platničku založili bunkové línie Hepa1c1c7 a BHK-21, v počte 10 000 buniek na jamku, v objeme 200 µl rastového média obohateného o

7% FCS. Bunky sme inkubovali v termostate tri dni pri 37 °C a 5% CO₂. Sféroidy sme pozorovali pod svetelným mikroskopom pri 100-násobnom zväčšení a ich veľkosť sme vyhodnocovali v programe ImageJ od spoločnosti National Institutes of Health.

Príprava lyzátov zo sféroidov

Po vytvorení sféroidov sme tieto sféroidy preniesli s kultivačným médiom do mikroskúmvky. Odobrali sme médium a sféroidy premyli roztokom PBS. Odobrali sme PBS a pridali 30 µl lyzačného roztoku RIPA. Sféroidy s lyzačným roztokom sme inkubovali 15 minút za občasného prefúkania. Následne sme sféroidy v lyzačnom roztoku centrifugovali pri 14 000 ot./min po dobu 15 minút. Supernatant sme preniesli do sterilnej mikroskúmvky.

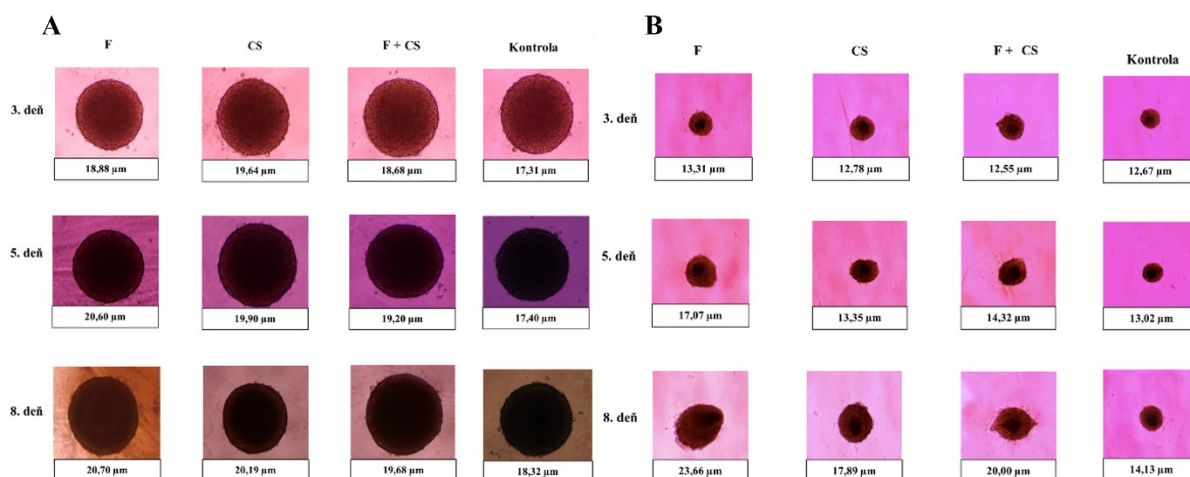
Prietoková cytometria

Na kvantitatívne zastúpenie rôznych foriem buniek vo sféroidoch sme použili metódu prietokovej cytometrie. Prvým krokom je prenesenie sféroidov spolu s kultivačným médiom na 96 jamkovú platničku so zaobleným dnom. Sféroidy sme následne prepláchli fyziologickým roztokom PBS a opracovali roztokom trypsín-EDTA, ktorý slúži na rozrušenie štruktúry sféroidov, bunky sme rozsuspendovali a fixovali. Nakoniec sme bunky zafarbili roztokom zloženým z propidium jodidu, ktorého funkciou je rozlíšiť živé bunky od mŕtvych a anexínu, ktorý slúži na rozlíšenie apoptických buniek. Na meranie sme použili prístroj *Guava® EasyCyte™* Plus Flow Cytometry System.

Výsledky a diskusia

Na nasledujúci deň po založení bunky začali agregovať, pričom sa sformovali do jedného sféroidu. Sféroidy z nádorovej bunkovej línie Hepa1c1c7, ku ktorým bol pridaný F rástli v prvých dňoch experimentu porovnateľne s kontrolnými sféroidmi opracovanými PBS. Na 3. deň bola veľkosť sféroidu 13,31 µm. Od 5. dňa sme pozorovali zväčšovanie sféroidov, čo pretrvávalo až do ukončenia experimentu na 8. deň. Na 5. deň bola veľkosť sféroidu opracovaného F 17,07 µm. Veľkosť sféroidu sa zväčšila o 3,76 µm, teda približne o 28,25 % pôvodnej veľkosti sféroidu sformovaného na 3. deň. Veľkosť sféroidu sa z 5. dňa na 8. deň zväčšila až o 10,35 µm, čo predstavuje zväčšenie až o 77,76 %. Kontrolná vzorka, kde bolo pridané len PBS vykazovala zväčšenie len o 1,46 µm (o 11,52 %) oproti 3. dňu. Sféroid opracovaný suspenziou s obsahom CS dosahoval v deň založenia veľkosť 12,78 µm. Na 5. deň sa veľkosť sféroidu zväčšila o 0,57 µm, čo je o 4,46 % pôvodnej veľkosti. Veľkosť sféroidu sa na 8. deň zvýšila o 5,11 µm, teda o 39,98 % veľkosti pôvodného sféroidu. Zväčšenie kontrolných sféroidov bolo približne o polovicu menej ako na 5. deň a to o 0,35 µm (o 2,76%). Po opracovaní sféroidu kombináciou CS+F bola veľkosť sféroidu založeného na 3. deň 12,55

μm . Opracovaný sféroid zväčšil svoju veľkosť o $1,74 \mu\text{m}$, čo predstavuje $14,10 \%$. Na 8. deň sme zaznamenali zväčšenie o $7,45 \mu\text{m}$, teda o $59,36 \%$, čo predstavuje päťkrát viac ako u kontrolných sféroidov, kde došlo k zväčšeniu o $1,46 \mu\text{m}$ (o $11,52\%$) pôvodnej veľkosti sféroidu sformovaného na 3. deň. Tieto výsledky dokumentuje Obr.1B



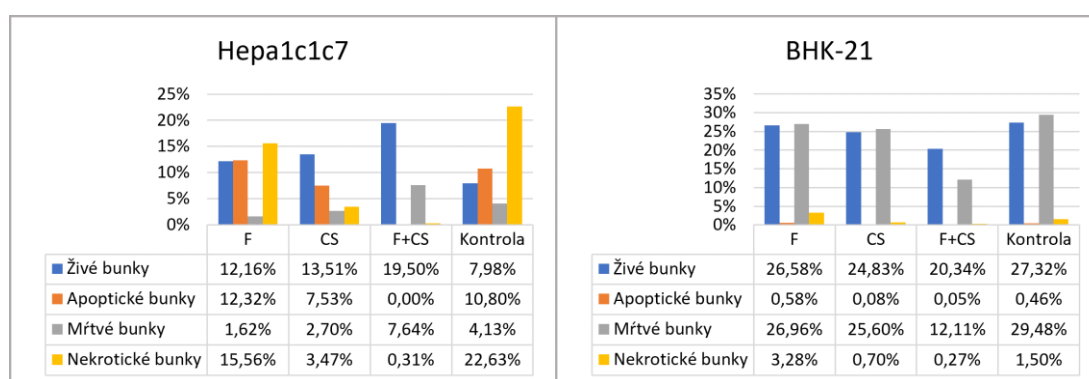
Obr. 1. Sledovanie morfológie sféroidov

A) Zobrazenie veľkosti sféroidov pripravených z nenádorovej bunkovej línie BHK-21; B) Zobrazenie veľkosti sféroidov z nádorovej bunkovej línie Hepa-1c1c7; Sféroidy boli opracované fukoidanom ($0,0078 \text{ mmol/l}$), chondroitín sulfátom ($0,00841 \text{ mmol/l}$) a kombináciou F+CS na 3., 5. a 8. deň od ich založenia a pozorované pod svetelným mikroskopom pri 100-násobnom zväčšení.

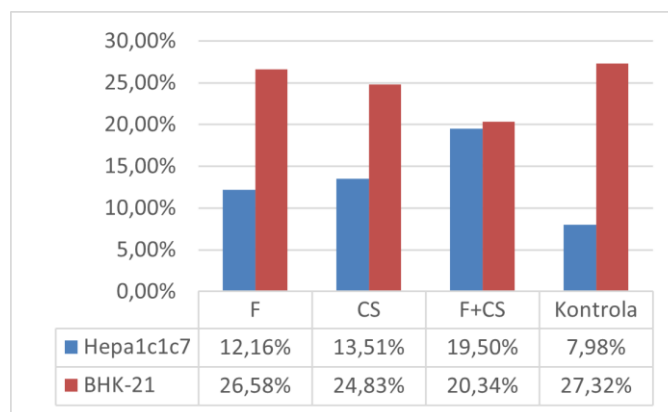
V druhej časti experimentu sme pripravili sféroidy z nenádorovej bunkovej línie BHK-21, ktorú sme založili rovnakým spôsobom ako sféroidy pri Hepa1c1c7 (Obr. 1A). Priemerná veľkosť sféroidov z BHK-21 bola $19,57 \mu\text{m}$. K sformovaným sféroidom sme pridali F, CS a F+CS. V prípade použitia F sféroidy rástli porovnateľne s kontrolnými sféroidmi, opracovanými PBS. Veľkosť sféroidu opracovaného F na 3. deň dosahovala $18,88 \mu\text{m}$ a na 5. deň vykazovala veľkosť $20,60 \mu\text{m}$. Veľkosť sféroidu sa zväčšila o $1,72 \mu\text{m}$, teda približne o 9% pôvodnej veľkosti sféroidu sformovaného na 3. deň. Zväčšovanie pokračovalo až do 8. dňa, kedy sa veľkosť sféroidu zväčšila o $1,82 \mu\text{m}$ (o $9,64 \%$) pôvodnej veľkosti sféroidu. Kontrolné sféroidy boli menšie, veľkosti vo všetkých časových intervaloch boli porovnateľné. Sféroid opracovaný CS dosahoval v deň založenia veľkosť $19,64 \mu\text{m}$. Na 5. deň sa veľkosť sféroidu zväčšila o $0,26 \mu\text{m}$, čo je o $1,32 \%$ pôvodnej veľkosti. Veľkosť sféroidu sa na 8. deň zväčšila o $0,55 \mu\text{m}$, teda o $2,8 \%$ veľkosti pôvodného sféroidu. Veľkosť kontrolných sféroidov sa na 5. deň zväčšila o $0,09 \mu\text{m}$ (o $0,51 \%$) a na 8. deň o $1,01 \mu\text{m}$ o $5,83\%$ pôvodnej veľkosti sféroidu založeného na 3.deň. Časť sféroidov bola opracovaná kombináciou F+CS a veľkosť sféroidu založeného na 3. deň bola $18,68 \mu\text{m}$. Na 5. deň sféroid dosahoval veľkosť $19,20 \mu\text{m}$. Na 8. deň

sme zaznamenali zväčšenie o 0,09 μm . Na kontrolných sféroidoch sme pozorovali na 5. deň zväčšenie veľkosti o 0,09 μm (o 0,51 %) a na 8. deň o 1,01 μm (o 5,38 %).

V poslednej časti experimentu sme metódou prietokovej cytometrie sledovali zastúpenie živých, apoptotických, nekrotických a mŕtvych buniek. V prípade sféroidov z nádorovej bunkovej línie Hepa1c1c7 došlo k zvýšeniu zastúpenia živých (o 4 %) a apoptotických buniek (o 1,5 %) po pridaní F v porovnaní s kontrolnými sféroidmi. Naopak došlo k poklesu mŕtvych (o 2,5 %) a nekrotických buniek (o 7 %). Po pridaní CS sa zvýšilo percento zastúpenia živých buniek (o 5,5 %) a poklesol počet apoptotických (o 3 %), mŕtvych (o 1,4 %) a nekrotických buniek (o 19 %) v porovnaní s kontrolou. Po pridaní kombinácie F+CS sme pozorovali vyššie zastúpenie živých (o 11,5 %) a mŕtvych buniek sféroidov (o 3,5 %) a nižšie zastúpenie nekrotických buniek (o 22 %) v porovnaní s kontrolnými. V prípade nenádorovej bunkovej línie BHK-21 sme zaznamenali pokles živých (o 1 %) a mŕtvych buniek (o 2,5 %) po pridaní F v porovnaní s kontrolnými sféroidmi. Naopak zvýšené bolo zastúpenie apoptotických (o 0,1 %) a nekrotických buniek (o 2 %). V prípade analýzy sféroidov opracovaných CS bolo percento zastúpenia všetkých typov buniek sféroidov nižšie v porovnaní s kontrolou : živých buniek (o 2,5%), mŕtvych (o 4 %), apoptotických buniek (o 0,4 %) a nekrotických buniek (o 1 %). Po pridaní F+CS sme pozorovali taktiež nižšie zastúpenie všetkých buniek vo sféroidoch v porovnaní s kontrolnými. Mierny pokles nastal u živých buniek (o 7 %), apoptotických (o 0,4 %) aj u nekrotických buniek (o 1 %) v porovnaní s kontrolnými. Viditeľnejší pokles bol pozorovaný u mŕtvych buniek (o 18 %). Tieto výsledky dokumentujú Obr. 2 a 3.



Obr. 2 Grafické znázornenie kvantitatívneho zastúpenia buniek vo sféroidoch pripravených z nádorovej bunkovej línie Hepa 1c1c7 a nenádorovej bunkovej línie BHK-21 vyhodnotené prietokovou cytometriou.



Obr. 3 Grafické znázornenie porovnania zastúpenia živých buniek vo sférodoch pripravených z nádorovej bunkovej línie Hepa 1c1c7 a nenádorovej bunkovej línie BHK-21.

Záver

Naše experimenty priniesli originálne výsledky. Zistili sme, že veľkosť sférodoch pripravených z nádorovej bunkovej línie Hepa1c1c7 po opracovaní liečivými látkami fukoidanom a chondroitín sulfátom bola výrazne menšia v porovnaní so sférodochmi pripravenými z nenádorovej bunkovej línie BHK-21. Výsledky prietokovej cytometrie potvrdili nižšie percento živých buniek vo sférodoch Hepa1c1c7 po opracovaní nami študovanými látkami.

PodĎakovanie

Predložený príspevok bol realizovaný s finančnou podporou grantu VEGA 1/0146/23.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Vinci M., Gowan S., Boxall B., et al. (2012) BMC Biology. 10 (29), p. 1
- [2] Mehta G., Hsiao A. Y., Ingram M., et al. (2012) J. C. R. 164(2), p.192
- [3] Kapalczynska M., Kolenda T., Przybzla W., et al. (2018) A. M. S.14 (4), p. 910
- [4] Joseph J. S., Malindisa S. T., Ntwasa M. (2018) IntechOpen. 2, p. 1
- [5] Li H., Fan X., Houghton J. M. (2007) J. Cell. Biochem. p. 805
- [6] Edmondson R., Broglie J. J., Adcock A. F., Yang L. (2014) Assay Drug Dev. Technol. 12(4), p. 207
- [7] Zima J., Nováková E., Mikušová V. et al. (2022) Bulletin ČSSM. 4. p. 140

Štúdium odpovede kvasinky *Yarrowia lipolytica* na absenciu telomerázy

Alex Márfoldi¹, Andrea Vetráková², Regina Sepšiová¹, Ľubomír Tomáška¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; marfoldi1@uniba.sk

²Ústav molekulárnej biológie Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

A study of the response of the yeast *Yarrowia lipolytica* to the absence of telomerase

Telomeres are essential parts of the chromosomes of the vast majority of organisms. They play an important role in chromosome stability, protecting the ends of chromosomes and also participate in maintaining the optimal length of chromosomes in cooperation with telomerase. However, the yeast *Yarrowia lipolytica* can survive even in the absence of telomerase. If the genes encoding the telomerase subunits (*EST2* and *TER*) are deleted, homologous recombination could represent a backup mechanism by which telomeres are maintained in this yeast.

Keywords: telomeres; telomerase; *Yarrowia lipolytica*; yeast; homologous recombination

Úvod a formulácia cieľa

Konce väčšiny eukaryotických organizmov sú tvorené nukleoproteínovými komplexami nazývanými teloméry, ktoré sú esenciálne pre ich ochranu a replikáciu. Skladajú sa z repetitívnych sekvenčných motívov, ktoré sa môžu medzi organizmami odlišovať. Teloméry vytvárajú na svojom konci 3'-jednovláknové prečnievanie, ktorého dĺžka varíruje medzi organizmami a pohybuje sa okolo 10 až 500 nukleotidov [1]. Na ochrane telomér a regulácii ich dĺžky sa podieľa komplex proteínov, ktorý sa u niektorých organizmov označuje ako šelterín. U kvasinky *Yarrowia lipolytica* bol identifikovaný proteín Tay1, ktorý sa viaže na dvojitú vláknovú oblasť telomerických repetícií. Iné proteíny asociované s telomérmi kvasiniek *Y. lipolytica* doposiaľ neboli objavené [2].

Y. lipolytica patrí podobne ako *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe* medzi askomycétne kvasinky [3]. Dĺžka telomér *Y. lipolytica* varíruje medzi 500 až 1000 bp, pričom telomerická sekvencia je zložená z pravidelne sa opakujúcej repetície TTAGTCAGGG a je veľmi podobná repetícii ľudských telomér TTAGGG [4–5]. *Y. lipolytica* preto predstavuje vhodný model na štúdium biológie telomér a taktiež evolučnej príbuznosti medzi kvasinkami a cicavcami [6]. Na replikáciu koncov chromozómov využíva väčšina buniek enzým telomerázu, ktorý sa skladá z reverznej transkriptázy (u *Y. lipolytica* označovaná Est2) a RNA (u *Y. lipolytica* označovaná ako TER) [7]. Pri nefunkčnej telomeráze je počet delení buniek limitovaný a bunky s kriticky krátkymi telomérmi podstupujú senescenciu,

resp. bunkovú smrť. Niektoré bunky však dokážu aktivovať alternatívne mechanizmy predlžovania telomér (ALT), ktoré zabezpečia ich životaschopnosť aj bez funkčnej telomerázy. Najčastejším mechanizmom pri alternatívnom predlžovaní telomér je homologická rekombinácia (HR) pozorovaná napr. aj u kvasiniek *S. cerevisiae* [8]. Bez funkčnej RNA podjednotky telomerázy dochádza u kvasinky *S. pombe* k senescencii, skracovaniu dĺžky telomér a po určitej dobe k fúzii telomér a cirkularizácii chromozómov za účasti mechanizmu spájania nehomologických koncov chromozómov (NHEJ) [9].

Červenák a kol. (2019) zistili, že nefunkčnosť telomerázy má u *Y. lipolytica* za následok rýchlu stratu telomerických sekvencií, pričom bunky výrazne nezaostávajú v raste v porovnaní so štandardným kmeňom (wt). Delécia génu pre proteín Ku80, ktorý je hlavným proteínom NHEJ dráhy, v Δter kmeni rovnako výrazne neznížila prežívanie, preto je možné predpokladať účasť HR ako ALT mechanizmu predlžovania telomér [10]. Cieľom našej práce bolo vytvoriť deléciu génu *RAD52*, ako hlavného proteínu HR dráhy, v bunkách *Y. lipolytica* s nefunkčnou telomerázou a zistiť, aký mechanizmus je zodpovedný za predlžovanie telomér pri absencii telomerázy.

Materiál a metódy

Použitie kmene *Y. lipolytica* – wt, Δter , $\Delta est2$, $\Delta ku80$, $\Delta rad52$, $\Delta ter\Delta ku80$, $\Delta est2\Delta ku80$, $\Delta est2\Delta rad52$, $\Delta ku80\Delta rad52$, $\Delta ter\Delta ku80\Delta rad52$

Kontrola rastu delečných kmeňov – Rast delečných kmeňov sme sledovali po dobu 24 hodín pri 29°C v YPD médiu v dvojhodinových intervaloch. Počet buniek sme merali na prístroji *Cell Drop* (Denovix).

Príprava genómovej DNA na analýzu množstva subtelomerickéj rDNA – Z buniek mutantných kmeňov sme izolovali genómovú DNA [11]. Genómová DNA určená na hybridizáciu s 18S rDNA próbou sa štiepila pomocou NdeI, EcoRI a KpnI (FD Thermo Scientific). Na štiepenie sme použili 1,5 µg gDNA, 1x FD Buffer a 0,7 µl z každého uvedeného enzýmu. Reakcia prebehla v celkovom objeme 30 µl pri 37°C 1 hodinu.

Príprava genómovej DNA na analýzu terminálnych restričných fragmentov (TRF) – Izolovanú gDNA na TRF analýzu sme štiepili *Shay-Wright* mixom [12] restričných enzýmov: HhaI, HinfI, MspI, HaeIII, RsaI, AluI. Na štiepenie sme použili 1,5 µg gDNA 1x CutSmart Buffer (NEB) a 0,3 µl z každého z uvedených enzýmov. Reakcia prebehla v celkovom objeme 40 µl pri 37°C cez noc.

Southern blotting – v prípade analýzy rDNA aj TRF sme štiepenú gDNA separovali v 1 % agarózovom géli pri 45 V cez noc. Obmývanie gélu a vákuový prenos DNA na nylonovú

membránu sme uskutočnili podľa Nosek a Tomáška (2013) [11].

Príprava 18S rDNA próby – Ako próba na detekciu množstva rDNA slúžil PCR produkt časti génu pre 18S rRNA. Reakčná zmes s objemom 50 µl obsahovala: 90 ng gDNA, 1x HF pufo, 0,12 mM dNTP, 0,4 µM primery 18S rDNA probe_fw (GCAATGCTCTATCCCCAGCA) a 18S rDNA probe_rev (TCCGGGGCTCTTTGAGTTTC), 1 U Phusion polymerázy. PCR reakcia prebiehala v termocykléri TOne (Biometra) za podmienok: 98°C 5 min, 98°C 30 s, 57°C 30 s, 72°C 30 s (32 cyklov), 72 °C 10 min. PCR produkt bol prečistený pomocou PCR Clean Up & Gel Extraction kitu (Macherey Nagel).

Príprava telomerickej próby – Telomerická próba bola pripravená štiepením plazmidu pYITEL81x restriktázami HindIII a BamHI. 1 µg plazmidu sme štiepili v prítomnosti 1x FD pufru a 0,3 µl príslušných enzýmov v objeme 40 µl pri 37°C 1 hodinu. Úsek dlhý 810 bp, ktorý predstavuje 81 opakovaní telomerickej sekvencie *Y. lipolytica* bol prečistený z gélu pomocou PCR Clean Up & Gel Extraction kitu (Macherey Nagel).

Značenie prób – 25 ng próby bolo rádioaktívne značených pomocou α -P³² dCTP a Prime-a-Gene Labeling kitu (Promega).

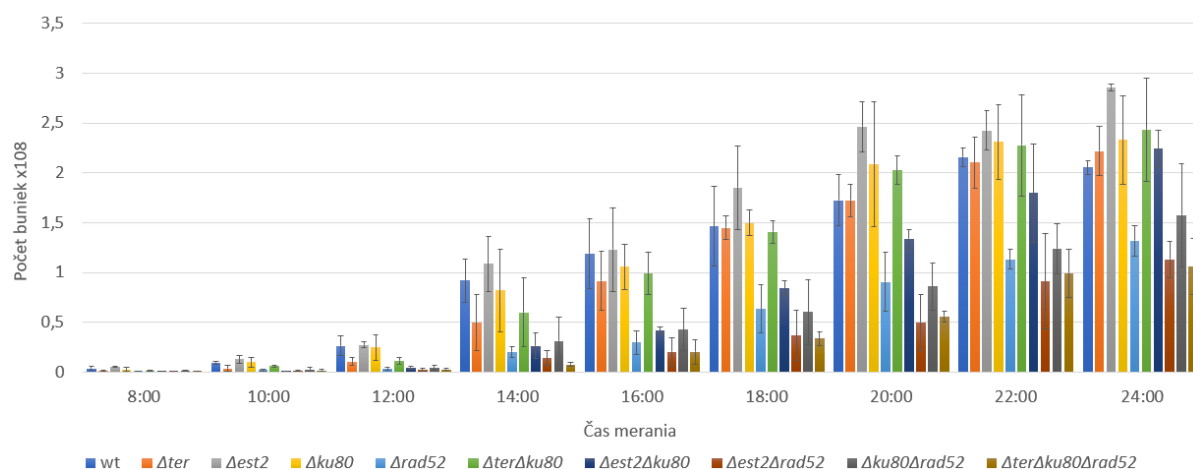
Hybridizácia membrány s rádioaktívne značenou próbou - Membránu sme hybridizovali cez noc pri teplote 65°C [11]. Signál bol zachytený na fosfoskrín a detekovaný prístrojom Typhoon (Amersham).

qPCR analýza počtu kópií 28S rDNA – Na kvantifikáciu počtu kópií rDNA sme použili qPCR analýzu, pričom sme amplifikovali 28S rDNA gén (primery 28S_rDNA_fwd: GGCAGGAACCAGCTACTAG a 28S_rDNA_rev: CCATTGGGACCCGAAAGATG). Ako referenčný gén na relatívnu kvantifikáciu slúžil *SPT6* gén z chromozómu B (primery fw: CGAAAAGGGCACAGTTCCAAG a rev: GAGTTCGACGCTTGACCATC). Kvantifikácia prebehla na prístroji Quant Studio 3 (ThermoFisher Scientific) použitím kitu PowerTrack SybrGreen Master Mix (ThermoFisher Scientific) podľa inštrukcií výrobcu.

Výsledky a diskusia

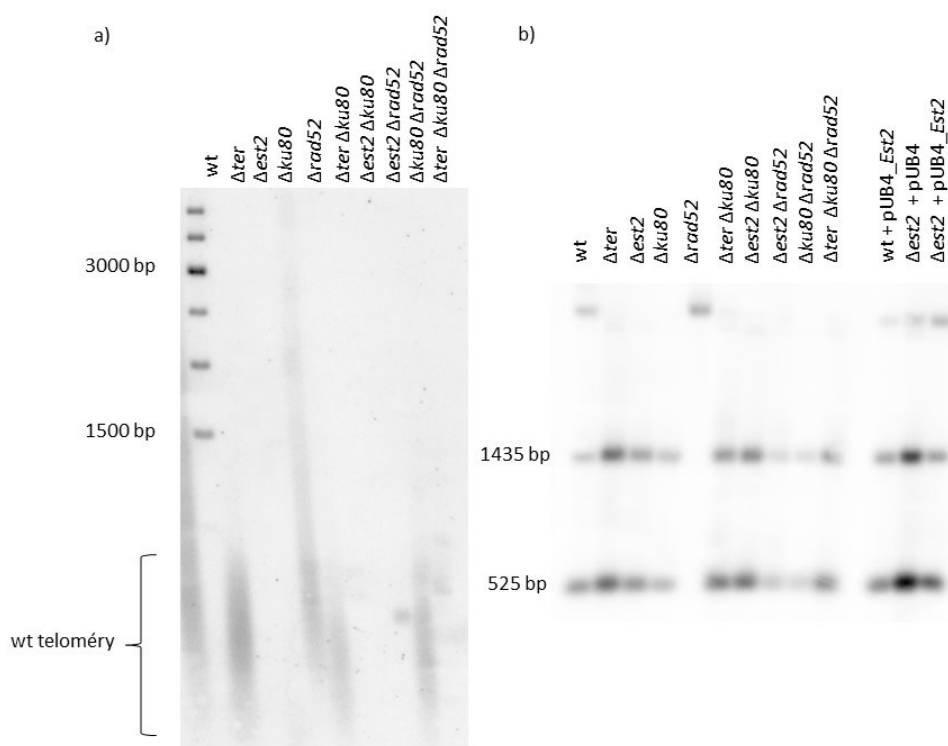
Sledovaním rýchlosti rastu wt kmeňa a použitých mutantných kmeňov sme zistili, že telomerázové mutanty (*Δter* a *Δest2*) v kombinácii s deléciou génu *KU80* zaostávali v raste, ale po 20. hodine kultivácie v raste dobehli wt kmeň. Delécia génu *RAD52* v kombinácii s deléciou jednej z jednotiek telomerázy však spôsobila výraznejšie zaostávanie v raste a tieto kmene nedokázali dorásť za 24 h do hustoty porovnateľnej s wt kmeňom. Keďže aj jednoduchý mutant *Δrad52* zaostával v raste, narušená homologická rekombinácia spôsobuje spomalenie rastu buniek *Y. lipolytica* (Obr. 1). Pomocou TRF analýzy sme zisťovali prítomnosť a dĺžku

telomerických sekvencií na koncoch chromozómov. Telomerázové mutanty strácajú telomerické repetície, a preto nepozorujeme signál v oblasti telomér. Mutant $\Delta ku80$ má predĺžené a heterogénne teloméry, zatiaľ čo u mutanta $\Delta rad52$ pozorujeme mierne skrátené teloméry (Obr. 2A), čo naznačuje úlohu týchto proteínov pri udržiavaní štandardnej dĺžky telomér.



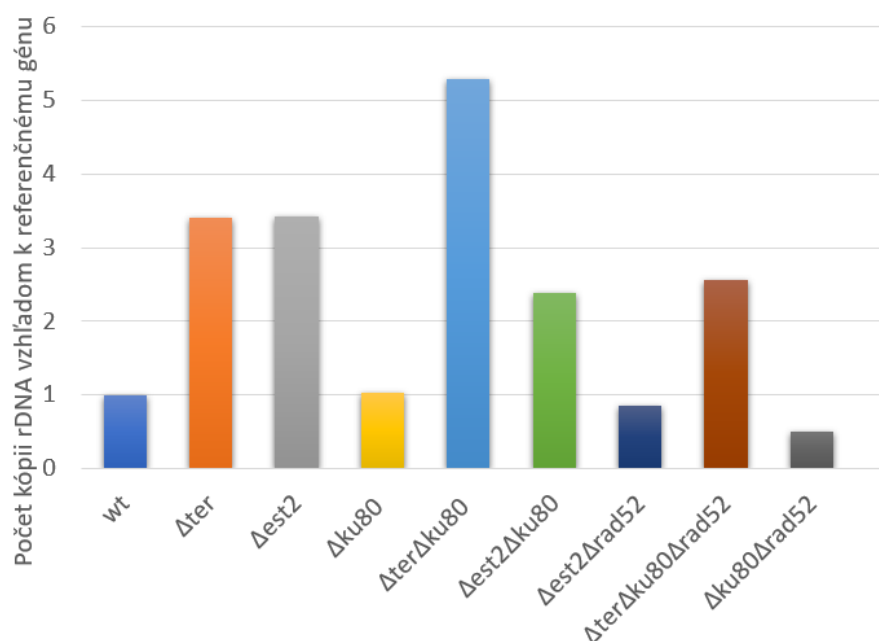
Obr. 1. Meranie rýchlosti rastu deľných kmeňov

Uvedené hodnoty predstavujú priemer a smerodajné odchýlky troch nezávislých meraní



Obr. 2. a) TRF analýza b) Hybridizáciu s 18SrDNA próbu

U kvasinky *Y. lipolytica* sa na väčšine chromozómov nachádzajú gény pre rRNA v subtelomerických oblastiach v blízkosti telomér. Vzhľadom na predpoklad, že HR zohráva úlohu v ALT mechanizme predlžovania telomér, testovali sme hypotézu, či nedochádza k zmnoženiu počtu kópií rDNA lokusov v oblasti telomér pomocou HR. Southern blot s próbou odvodenou od terminálnych 18S rDNA fragmentov ukázal, že u telomerázových mutantov pozorujeme intenzívnejší signál u fragmentov s dĺžkou 525 a 1435 bp. Signál zoslabne v prípade, že je delécia podjednotky telomerázy skombinovaná s deléciou génu *RAD52* (obr. 2B). Na presnejšiu kvantifikáciu relatívneho počtu rDNA voči referenčnému génu sme uskutočnili u mutantných kmeňov qPCR analýzu. Potvrdili sme, že telomerázové mutanty majú 3-5 krát vyššie hladiny 28S rDNA ako wt kmeň. Toto zvýšenie nepozorujeme u mutantu $\Delta est2\Delta rad52$, preto predpokladáme, že k amplifikácii rDNA lokusov dochádza prostredníctvom HR (Obr. 3).



Obr. 3. Počet kópií 28S rDNA vzhľadom k referenčnému génu

Záver

Kvasinka *Yarrowia lipolytica* sa pomerne rýchlo adaptuje na stratu telomerázy a disponuje efektívnym alternatívnym mechanizmom predlžovania telomér. Naše výsledky ukazujú, že pravdepodobne dochádza k amplifikácii rDNA lokusov pomocou mechanizmu homologickej rekombinácie za účasti génu *RAD52*. Hoci proteín Rad52 zohráva dôležitú úlohu v adaptácii na stratu telomerázy, životaschopnosť dvojitého mutantu $\Delta est2\Delta rad52$ a trojitého mutantu $\Delta ter\Delta ku80\Delta rad52$ naznačuje existenciu ďalšieho záložného mechanizmu

predlžovania telomér, nezávislého od homologickej rekombinácie a spájania nehomologických koncov chromozómov.

PodĎakovanie

Táto práca bola zrealizovaná vďaka podpore grantov APVV-19-0068 a VEGA (1/0061/20).

Zoznam použitej literatúry

- [1] de Lange T. (2005) *Genes Dev.* 19(18), p. 2100
- [2] Kramara J., Willcox S., Gunisova S., et al. (2010) *JBC* 285(49), p. 38078
- [3] Lue N. F. (2010) *Trends Biochem. Sci.* 35(1), p. 8
- [4] Altschuler S. E., Dickey T. H., Wuttke D. S., et al. (2011) *Biochem.* 50(35), p. 7503
- [5] Wellinger R. J., Zakian V. A. (2012) *Genetics* 191(4), p. 1073
- [6] Červenák F., Juríková K., Sepšiová R., et al. (2017) *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 16(17), p. 1568
- [7] Nakamura T. M., Morin G. B., Chapman K. B., et al. (1997) *Science* 277(5328), p. 955
- [8] Lundblad V., Blackburn E. H. (1993) *Cell* 73(2), p. 347
- [9] Leonardi J., Box J. A., Bunch J. T., et al. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15(1), p. 26
- [9] Jain D., Hebden A. K., Nakamura, et al. (2010) *Nature* 467(7312), p. 223
- [10] Červenák F., Juríková K., Devillers H., et al. (2019) *Sci. Rep.* 9(1), p. 13365
- [11] Nosek J., Tomáška L. (2013) *Laboratory Protocols in Molecular and Cell Biology of Yeasts*. CreateSpace Independent Publishing Platform, Charleston, SC, USA, p. 20
- [12] Mender I., Shay J. W. (2015) *Bio-protocol* 5(22), p. 5

Spoločenstvo mravcov (Hymenoptera, Formicidae) Chráneného územia Abov (južné Slovensko)

Šimon Marko, Samuel Krčmárik, Adrián Purkart, Petr Papežík, Milada Holecová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra zoológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; simonmarko08@gmail.com

Abstract

Ant assemblage (Hymenoptera, Formicidae) of Abov protected area (Southern Slovakia)

Ants are an integral part of all terrestrial ecosystems and fulfill the role of ecosystem engineers. Ants can be found everywhere except the polar regions and high mountains. They also inhabit habitats that look uninhabitable for their conditions. One of such habitats are blown sands which are one of the rarest and most endangered habitats in Slovakia. The protected area of Abov is among the localities enriched with blown sands. During a one-year study in 2021, we managed to collect 3,766 ant individuals categorized into 41 different species. The most numerous species were *Lasius niger* and *Tetramorium* cf. *caespitum*. In the assemblage there were also psammophilous taxa such as *Lasius* cf. *psammophilus* or *Tapinoma subboreale*. Among the detected species, there were also rare ones, such as *Anergates atratulus* and *Temnothorax clypeatus*. There was also one worker of the species *Monomorium pharaonis* in the trap.

Keywords: Abov protected area; ant assemblage; blown sands; Danubian lowland; southern Slovakia

Úvod a formulácia cieľa

Mravce jednoznačne dominujú terestrickým habitatom. Túto úspešnosť dosahujú vďaka eusociálnemu spôsobu života. Sú vhodnými bioindikátormi prostredia, pretože sú citlivé na jeho zmeny [1]. Medzi najohrozenejšie biotopy v európskom kontexte patria duny eolických viatych pieskov. Antropogénnym vplyvom býva často rozloha týchto plôch výrazne zredukovaná na nepatrné plôšky mozaikovito sa vyskytujúce v krajine. Na Slovensku tvoria eolické piesky približne 1,2 % z celkovej rozlohy štátu a zahŕňajú nie viac ako 600 km² [2]. V rámci fytogeografického členenia môžeme nájsť eolické piesky v troch veľkých nížinách na juhu Slovenska, a to na Záhorskej, Podunajskej a Východoslovenskej nížine. Výskyt viatych pieskov na Podunajskej nížine je primárne mozaikovitého charakteru, nachádzajú sa najmä v juhovýchodnej časti a to v susedstve vodných tokov ako sú Dunaj, Nitra alebo Hron [2]. Jednou z oblastí výskytu eolických pieskov v južnej časti Slovenska, je aj Chránené územie Abov (Obr. 1). Územie sa nachádza v katastri mesta Hurbanovo. Nadmorská výška tu nepresahuje viac ako 125 m. n. m. Lokalita pozostáva z dvoch častí, tzv. Abov-juh a Abov-sever. Dnes je po vstupe na lokalitu jasne viditeľný zásah človeka. Územie je z väčšej časti vyťažené a znehodnotené skládkami odpadu. Psamofytná vegetácia sa vplyvom takejto disturbancie zachovala len na malých plochách. Medzi primárne psamofyty môžeme zaradiť plošticosemá lesklé (*Corispermum nitidum*), horčičník konáristý (*Erysimum diffusum*) alebo

gypsomilku metlinatú (*Gypsophila paniculata*). Na dne pieskových jám sa uplatňujú vlhkomilné dreviny ako sú topole alebo vrbu [3].

Cieľom práce bolo zistiť druhové zastúpenie spoločenstva mravcov viatych pieskov lokality Abov. Vyhodnotiť zastúpenie zoogeografických elementov, ekologických a funkčných skupín. Poukázať na vzácne a ekosoziologicky významné druhy, ktoré boli v spoločenstve zistené.

Materiál a metódy

Materiál bol na skúmanom území získavaný dvomi metódami. Primárnou metódou boli zemné pasce, ktoré tvorili umelohmotné skúmavky v tvare valca, výšky 8,5 cm, priemeru 3 cm a objemu 40 ml. Skúmavky boli naplnené približne do dvoch tretín 10% roztokom formaldehydu s obsahom glycerínu a detergentu. Na lokalite bolo umiestnených 10 zemných pascí s rozstupom 10 metrov a tieto boli vymieňané v mesačných intervaloch. Doplnkovou metódou bol individuálny zber za pomoci exhaustora a pinzety, ktorým boli jedince mravcov zbierané z povrchu pôdy a kôry stromov a krov. Vytriedené jedince zo zemných pascí aj individuálneho zberu boli umiestnené do skúmaviek naplnených 70% etanolom. Determinácia jedincov bola uskutočňovaná v laboratóriu za pomoci stereomikroskopu Intracomicro WF10X/22. Materiál mravcov bol determinovaný podľa prác Czechowski *et al* (2012) [4] a Seifert (2018) [5]. Systém a nomenklatura sú uvedené v zmysle práce Seifert (2018) [5]. Zaradenie jednotlivých druhov mravcov do ekologických a zoogeografických skupín bolo uskutočnené na základe práce Czechowski *et al* (2012) [4] a zastúpenie funkčných skupín na základe práce Andersen (2000) [6]. Dominancia (D) v zmysle Tischlera (1949) [7] a Heydemanna (1955) [8] vychádza zo vzťahu: $D = N_i/n * 100$, kde N_i = počet jedincov daného druhu, n = celkový počet jedincov všetkých druhov cenózy.

Výsledky a diskusia

Počas entomologického výskumu eolických pieskov chráneného územia Abov, ktorý prebiehal od apríla 2021 do októbra 2021, sa podarilo celkovo nazbierať 3 766 mravcov zaradených do 41 druhov patriacich do troch podčeľádí (Dolichoderinae, Formicinae a Myrmicinae). Metódou zemných pascí sme získali 3 375 mravcov. Z tohto počtu bolo 3 303 robotníč determinovaných do 37 druhov. V pasci sa taktiež vyskytovalo 72 pohlavných jedincov. Tie však nemožno priradiť k druhovému spoločenstvu lokality z dôvodu vysokých migračných schopností okrídlených kást. Pomocou doplnkovej metódy ručného zberu sa podarilo nazbierať 391 mravcov (390 robotníč a jeden pohlavný jedinec).

Tab. 1. Prehľad všetkých zistených druhov na lokalite Abov. D – dominancia v percentách. FS – funkčná skupina: DD – dominantné Dolichoderinae; SC – podriadené Camponotini; CC – špecialisti chladnej klímy; CS – kryptické druhy; OP – oportunisti; GM – nešpecializované Myrmicinae; SP – špecializované predátory. ZE – zoogeografický element.: I. Zóna ihličnatých lesov: BM boreo-montánny element; M – montánny element; NE – severo-európsky element; NP – severo-palearktický element. II. Zóna zmiešaných listnatých lesov: E – európsky element; WE – západo-európsky element; EC – euro-kaukazský element; EWS – euro-západosibírsky element; ES – euro-sibírsky element; SP – juho-palearktický element. III. Semi-aridná a aridná zóna: SE – juho-európsky element; MD – mediteránny element; T – tetýdny element. EE – ekologický element: E – eurytopný druh; P – polytopný druh; O – oligotopný druh; S – stenotopný druh; Z – zastúpenie; • – druh zastúpený iba pohlavným jedincom. * – druh zachytený iba ručným zberom.

Podčeľad'	Druh	Z	D	FS	ZE	EE
Dolichoderinae	<i>Dolichoderus quadripunctatus</i> (Linnaeus, 1771)	+	0,15	CC	EWS	O
	<i>Tapinoma erraticum</i> (Latreille, 1798)	+	0,03	DD	MD	S
	<i>Tapinoma subboreale</i> Seifert, 2012	+	5,15	DD	SE	S
Formicinae	<i>Camponotus vagus</i> (Scopoli, 1763)	+	0,54	SC	EWS	O
	* <i>Colobopsis truncata</i> (Spinola, 1808)	+	-	SC	MD	S
	<i>Formica clara</i> Forel, 1886	+	0,51	OP	ES	O
	<i>Formica cunicularia</i> Latreille, 1798	+	2,57	OP	EC	P
	<i>Formica pratensis</i> Retzius, 1783	+	0,42	CC	SP	P
	<i>Formica rufibarbis</i> Fabricius, 1793	+	0,30	OP	EWS	O
	<i>Lasius alienus</i> (Foerster, 1850)	+	0,03	CC	SP	O
	<i>Lasius</i> cf. <i>bombycina</i> Seifert & Galkowski, 2016	+	0,09	CC	E	O
	* <i>Lasius</i> cf. <i>paralienus</i> Seifert, 1992	+	-	CC	E	O
	<i>Lasius</i> cf. <i>psammophilus</i> Seifert, 1992	+	7,39	CC	E	O
	<i>Lasius citrinus</i> Emery, 1922	•	-	CC	SP	O
	<i>Lasius distinguendus</i> (Emery, 1916)	+	0,03	CC	SP	O
	<i>Lasius jensi</i> Seifert, 1982	•	-	CC	EC	S
	<i>Lasius meridionalis</i> (Bondroit, 1920)	•	-	CC	SP	O
	<i>Lasius niger</i> (Linnaeus, 1758)	+	40,36	CC	NP	P
	<i>Lasius nitidigaster</i> Seifert, 1996	•	-	CC	SE	O
	<i>Polyergus rufescens</i> (Latreille, 1798)	+	0,03	SP	EWS	O
	* <i>Plagiolepis pygmaea</i> (Latreille, 1798)	+	-	CS	MD	S
	<i>Plagiolepis taurica</i> Santschi, 1920	+	0,03	CS	MD	S
Myrmicinae	<i>Monomorium pharaonis</i> (Linnaeus, 1758)	+	0,03	GM	-	E
	<i>Myrmica sabuleti</i> Meinert, 1861	+	1,57	OP	EC	O
	<i>Myrmica schencki</i> Viereck, 1903	+	0,63	OP	EWS	O
	<i>Myrmica specioides</i> Bondroit, 1918	+	4,18	OP	E	O
	<i>Solenopsis fugax</i> (Latreille, 1798)	+	1,75	CS	T	O
	<i>Temnothorax affinis</i> (Mayr, 1855)	+	0,06	CC	EC	S
	<i>Temnothorax albipennis</i> (Curtis, 1854)	+	0,42	CC	E	S
	<i>Temnothorax clypeatus</i> (Mayr, 1853)	+	0,03	CC	SE	S
	<i>Temnothorax corticalis</i> (Schenck, 1852)	+	0,06	CC	EC	S
	<i>Temnothorax crassispinus</i> (Karavaiev, 1926)	+	0,12	CC	EC	O
	<i>Temnothorax interruptus</i> (Schenck, 1852)	+	5,09	CC	E	S
	<i>Temnothorax nadigi</i> (Kutter, 1925)	•	-	CC	MD	S
	* <i>Temnothorax parvulus</i> (Schenck, 1852)	+	-	CC	MD	S
	<i>Temnothorax tuberum</i> (Fabricius, 1775)	+	0,60	CC	ES	P
	<i>Temnothorax turcicus</i> (Santschi, 1934)	+	0,03	CC	E	E
	<i>Temnothorax unifasciatus</i> (Latreille, 1798)	+	1,21	CC	EC	O
	<i>Tetramorium atratum</i> (Schenck, 1852)	•	-	CC	EWS	P
	<i>Tetramorium</i> cf. <i>caespitum</i> (Linnaeus, 1758)	+	25,61	OP	SP	P
	<i>Tetramorium</i> cf. <i>ferox</i> Ruzsky, 1903	+	0,94	OP	SP	P

Doplnenie štúdie o túto metódou bolo významné, nakoľko sa podarilo zachytiť aj druhy, ktoré sa v zemných pasciach nevyskytovali. Medzi takto získané druhy patrili *Colobopsis truncata*, *Lasius* cf. *paralienus*, *Plagiolepis pygmaea* a *Temnothorax parvulus*. Prehľad všetkých zistených druhov na lokalite Abov zobrazuje Tab. 1.

Na študovanom území boli zaznamenané druhy patriace do všetkých štyroch ekologických skupín. Takmer polovica druhov (46,34 %) prislúchala oligotopnému elementu, druhým najpočetnejším bol stenotopný element (31,7 %). Podobne bola zistená prítomnosť všetkých siedmich funkčných skupín. Najviac zastúpené boli druhy patriace do skupiny klimatických špecialistov (28 spp., 56,09 %). Druhou najpočetnejšou skupinou boli oportunisti (9 spp., 21,95 %). Zo zoogeografických elementov mali primárne zastúpenie európsky (E), euro-kaukazský (EC) a juho-palearktický (SP) element (po 7 spp.). Medzi eudominantne zastúpené druhy patrili *Lasius niger* (40,35 %) a *Tetramorium* cf. *caespitum* (25,61 %). Vysoká dominancia uvedených druhov môže poukazovať na značnú disturbanciu lokality. Ide o druhy vyznačujúce sa vysokou toleranciou, ktoré bývajú často aj ako jediné zaznamenané taxóny v prostredí silno zaťaženom antropogénnym vplyvom [9]. Dominantne zastúpené taxóny boli *Lasius* cf. *psammophilus* (7,39 %) a *Tapinoma subboreale* (5,15 %). Nakoľko *Lasius* cf. *psammophilus* dokáže na pieskových substrátoch konkurenčne vytlačiť menej prispôsobené taxóny ako napríklad *Lasius niger*, dalo by sa očakávať až eudominantné zastúpenie. Vysoká početnosť druhu *Temnothorax interruptus* (5,09 %) môže súvisieť so zarastaním lokality nepôvodnými drevinami. Ostatné zaznamenané druhy patrili na základe dominancie do kategórií recedentné a subrecedentné. V pasciach boli taktiež prítomné aj pohlavné jedince taxónov *Lasius citrinus*, *Lasius jensi*, *Lasius meridionalis*, *Lasius nitidigaster* a *Temnothorax nadigi*. Tieto druhy nemožno priradiť k spoločenstvu danej lokality z dôvodu vysokej disperznej schopnosti okrídlených kást. K významným nálezom patrí zachytenie druhu *Anergates atratulus* (Obr. 1). Z doterajších prác je len veľmi málo dát o jeho výskyte na Slovensku a z oblasti Podunajskej nížiny iba jeden záznam [10]. Ide o sociálneho parazita bez robotníckej kasty, ktorý sa zdržuje v hniezdach mravcov druhového komplexu *Tetramorium* cf. *caespitum*. Na lokalite bola zistená aj prítomnosť vzácného druhu *Temnothorax clypeatus*, konkrétne jednej robotnice, ktorý je zaradený do Červeného zoznamu blanokrídlavcov [11]. Ďalej možno spomenúť aj zastúpenie sociálneho parazita *Polyergus rufescens*. Medzi jeho hostiteľov zaradíme taxóny *Formica cunicularia*, *F. rufibarbis* alebo *F. clara*. V jednej z pascí nás prekvapil aj nález druhu *Monomorium pharaonis*. Ide o nepôvodný druh zavlečený do Európy z Afrických trópov, ktorý sa v oblasti mierneho pásma vyskytuje hlavne synantropne. Hniezda vo voľnej prírode sú vzácne a dokážu prežiť iba za

určitých okolností [5]. Prítomnosť tohto druhu v pasci mohla byť spôsobená antropogénnym vplyvom, nakoľko sa často pri lokalite objavujú skládky odpadu. Mohlo ísť taktiež aj o zavlečenie do pasce iným živočíchom či environmentálnym aspektom.



Obr. 1. A – Lokalita Abov. Foto: Šimon Marko. B – Kráľovná druhu *Anergates atratulus*. Foto: Samuel Krčmárik.

Záver

Počas jednoročného výskumu formikocenózy viatych pieskov lokality Abov sa za pomoci metód zemných pascí a ručného zberu podarilo odchytiť 3 766 mravcov. Jedince boli zaradené do 41 druhov, čo predstavuje 34,74 % známej myrmekofauny Slovenska. V spoločenstve boli eudominantne zastúpené taxóny *Lasius niger* a *Tetramorium* cf. *caespitum*. K dominantným patrili psamofilné druhy *Lasius* cf. *psammophilus* a *Tapinoma subboreale*. Na študovanom území bola zistená aj prítomnosť vzácných druhov ako *Tetramorium atratulum* a *Temnothorax clypeatus*. Spoločenstvo bolo obohatené aj o druh sociálneho parazita *Polyergus rufescens*. Zaujímavá bola v pasci zistená robotnica druhu *Monomorium pharaonis*. Výsledky práce poukazujú na významnosť habitatov, akými sú viate piesky, nakoľko tu môžeme nájsť vzácnu faunu a flóru prispôbenú životu v drsných podmienkach.

PodĎakovanie

Na tomto mieste by sme sa radi poďakovali RNDr. Petrovi Gajdošovi, CSc. z Ústavu krajinskej ekológie SAV v Nitre za poskytnutie niekoľkých vzoriek z pascí na lokalite Abov. Práca vznikla za podpory projektov VEGA č. 2/0032/19 a 2/0022/23.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Andersen A. N. (1997) J. Biogeogr. 24, p. 433
- [2] Bedrna Z. (2008) Rozšírenie viatych pieskov na Slovensku. In: Kalivodová E. (ed.) Flóra a fauna viatych pieskov Slovenska. VEDA Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, Bratislava, p. 9
- [3] Zaliberová M., Szabóová A., Kollár J., et al. (2008) Flóra. In: Kalivodová E. (ed.) Flóra a fauna viatych pieskov Slovenska. VEDA Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, Bratislava, p. 26
- [4] Czechowski W., Radchenko A., Czechowska W., et al. (2012) The ants of Poland with reference to the myrmecofauna of Europe. Museum and Institute of Zoology Polish Academy of Sciences, Natura optima dux Foundation, Warszawa, p. 496
- [5] Seifert B. (2018) The Ants of Central and North Europe. Lutra, Verlags und Vertiebsgesellschaft, Tauer, p. 408
- [6] Andersen A. N. (2000) Global ecology of rainforest ants. In: Agosti D., Majer J. D., Alonso L. E., et al. (ed.) Ants. Standard methods for measuring and monitoring biodiversity. Smithsonian institution press, Washington and London, p. 25
- [7] Tischler W. (1949) Grundzüge der Terrestrische Tierökologie. Friedrich Vieweg, Braunschweig, p. 219
- [8] Heydemann B. (1955) Die Frage der topographischen Übereinstimmung des Lebensraumes von Pflanzen und Tiergesellschaften. Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Erlangen, p. 444
- [9] Blinova S. V., Dobrydina T. I. (2019) IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 224, p. 1
- [10] Purkart A., Kollár J., Goffová K. (2019) Naturae Tutela 23(1), p. 101
- [11] Lukáš J. (2001) Červený (ekosozologický) zoznam blanokrídlovcov (Hymenoptera) Slovenska. In: Baláž D., Marhold K., Urban P. (ed.) Červený zoznam rastlín a živočíchov Slovenska. Ochrana Prírody 20, p. 129

Konstrukcia plazmidových vektorov s replikačným génom *repE* pod kontrolou arabinózového promótoru s divým typom RBS ako nástroje pre plynulú reguláciu génovej dózy

Bronislava Martinková, Adriána Dusíková, Lea Lukáčová, Kristína Mižáková, Timotej Šándor, Erik Mokroš, Sabina Houdeková, Berenika Tulipánová, Ján Krahulec

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
martinkova55@uniba.sk

Abstract

Construction of plasmid vectors with *repE* replication gene under the control of an arabinose-inducible promoter with wild-type RBS as tools for continuous regulation of gene dosage

A possible solution to express toxic genes in *E. coli* is to strictly control the copy number of the expression plasmid. In this work we focused on arabinose-inducible promoter with tight regulation. The aim is to prepare two plasmid systems- pFE30 and pFE31 with an arabinose-inducible promoter combined with wild-type ribosome binding site (RBS) for the *repE* gene. Previously formed plasmids pFE20 and pFE21 had high basal expression and strong translation caused a deficiency of the monomeric protein RepE. For that reason, in these systems, we did not achieve changes in the plasmid copy number at different concentrations of arabinose. Therefor, we decided to change the translation signal to a wild-type signal for RBS.

Keywords: *F* plasmid; copy number control; arabinose-inducible promoter

Úvod a formulácia cieľa

Escherichia coli je výhodným a všeobecne najčastejšie používaným systémom na produkciu rekombinantných proteínov. Je to najmä z dôvodu nenáročnej kultivácie, rýchleho rastu na lacných médiach, dobre preštudovanému genómu a dostupnosti veľkého množstva molekulárno-genetických nástrojov na genetické manipulácie. V niektorých prípadoch je možné v *E. coli* produkovať proteíny v množstvách, ktoré predstavujú až 30 % všetkých proteínov syntetizovaných bunkou [1].

Použitie expresného systému *E. coli* je obmedzené z dôvodu nedostatku sekrečných systémov na efektívne uvoľňovanie proteínov do média, obmedzenej schopnosti tvorby disulfidových väzieb a neschopnosti posttranslačných modifikácií. Problém predstavuje aj produkcia toxických génov, ktoré vážne zasahujú do fyziológie *E. coli* a spôsobujú dramatické zníženie výťažku. Preto sú potrebné nové alebo modifikované expresné vektory, ktoré by boli prínosom najmä pre biotechnologický a farmaceutický priemysel. Jedným z možných riešení je kontrola génovej dózy prostredníctvom regulácie počtu kópií expresného vektora. Pred indukciou sa bazálna expresia udržiava na minime vplyvom nízkeho počtu kópií vektora, ktoré sa blíži k jednej kópii na bunku. Počet kópií plazmidu sa zvyšuje počas indukcie expresie [2].

Pre replikáciu F plazmidu sú potrebné dva hlavné elementy – počiatok replikácie *oriS* a replikačný iniciačný proteín RepE, ktorý sa môže nachádzať v monomérnej a dimérnej forme. Monomérna forma je esenciálna pre iniciáciu replikácie a dimérna forma sa podieľa na autogénnej represii. Na základe dostupnej literatúry vieme, že substitúcia arginínu 118 za prolín vedie k zvýšenému výskytu monomérnej formy replikačného iniciačného proteínu RepE [3].

Cieľom tejto práce je konštrukcia plazmidových vektorov, ktorých počet kópii by bolo možné plynule regulovať zmenou expresie replikačného proteínu prostredníctvom zmeny podmienok kultivácie. Ako základ pre zmenu expresného profilu replikačného proteínu sme si zvolili arabinózový promótor so striktnou schopnosťou regulácie. Vytvorili sme plazmidy pFE30 a pFE31, ktoré nesú arabinózový promótor kombinovaný s divým typom RBS pre *repE* gén.

V práci sme vychádzali z plazmidov pFE20, pFE21 a pFO1, ktoré boli vytvorené v predchádzajúcej práci [4]. Plazmidy pFE20 a pFE21 nesú regulačnú oblasť z arabinóзовého promótoru namiesto *wild-type repE* promótoru a plazmid pFE21 nesie navyše špecifickú mutáciu R118P v *repE* géne. Tieto dva plazmidy nesú gén pre replikačný iniciačný proteín RepE, ktorý je nevyhnutný pre replikáciu plazmidu pFO1 nesúceho počiatok replikácie *oriS*. V dôsledku zvýšenej bazálnej expresie a silnej translácie v prípade plazmidu pFE20 nebolo možné zmenou koncentrácie arabinózy meniť počet kópii pFO1. Rovnako aj pri plazmide pFE21 sme nedosiahli zmenu kópiovosti zvyšovaním koncentrácie arabinózy. Navyše analýza ukázala, že plazmid pFO1 (2kbp) v prítomnosti pFE21 spadá z neznámych príčin do vyššej formy, kde sa vyseletoval plazmid väčší o približne 1,6 až 1,7 kb. Bazálna expresia a silná translácia pravdepodobne spôsobuje nedostatok proteínu RepE v monomérnych formách a ani zvyšovaním koncentrácie arabinózy nie je možné dosiahnuť zmenu kópiovosti. Preto sme sa rozhodli zmeniť signál pre transláciu za divý signál pre RBS, ktorý je slabší.

Materiál a metódy

Tab. 1. Kity použité pri práci.

Názov kitu	Použitie	Zdroj
<i>NucleoSpin® Gel and PCR Cleanup</i>	Prečistenie PCR a extrakcia z gélu	<i>Machery-Nagel</i>
<i>QIAprep Spin® Miniprep Kit</i>	Izolácia plazmidovej DNA	<i>Qiagene</i>

Tab. 2. Použité bakteriálne kmene a plazmidové vektory, ich charakteristika a zdroj.

Názov	Charakteristika	Zdroj
<i>Escherichia coli</i> DH5a	F- ϕ 80 <i>lacZ</i> ΔM15Δ <i>lacZYA</i> -argF U196 <i>endA</i> 1 <i>hsdR</i> 17(rk-mk+) <i>recA</i> 1 <i>supE</i> 44 <i>thi</i> -1 <i>gyrA</i> 96 <i>relA</i> 1 <i>phoA</i>	Invitrogen
pFE20	<i>araC</i> , <i>araBAD</i> promotór, <i>repE</i> , pBR ori, Cmr, <i>rrnB</i> T1 terminátor	KMB Prif UK, Bratislava, Slovensko
pFE21	<i>araC</i> , <i>araBAD</i> promotór, <i>repEmutR</i> 118P, pBR ori, Cmr, <i>rrnB</i> T1 terminátor	KMB Prif UK, Bratislava, Slovensko
pFE30	<i>araC</i> , hybridný <i>araBAD</i> promotór, <i>repE</i> , pBR ori, Cmr, <i>rrnB</i> T1 terminátor	Táto práca
pFE31	<i>araC</i> , hybridný <i>araBAD</i> promotór, <i>repEmutR</i> 118P, pBR ori, Cmr, <i>rrnB</i> T1 terminátor	Táto práca

Tab. 3. Zoznam použitých enzýmov – ich typ, názov enzýmov a zdroj.

Typ	Názov	Zdroj
Restričné endonukleázy	<i>Pst</i> I <i>Bam</i> HI <i>Ngo</i> MIV <i>Fsp</i> AI	New England Biolabs
DNA polymerázy	<i>Q5 Hot Start High-Fidelity DNA</i> <i>Polymerase</i>	New England Biolabs
Iné	T4 DNA ligáza <i>Shrimp</i> alkalická fosfatáza (rSAP)	New England Biolabs

Tab. 4. Primery použité pri práci + sekvencia.

Názov	Použitie	Sekvencia
repErrnB P	Amplifikácia <i>repE</i> úseku z plazmidu pFE20	GCCTTTCGTTTTATTTGCTATCCTGTCGTC ATGGAAGTGATATCGC
RBSaraBamHI	Predĺženie <i>repE</i> úseku o rozpoznávaciu sekvenciu pre restriktázu BamHI	CTGTCTAGGTACACTTCACACTGTTCTACC TCTTTGTCATCTCTCAACGCTATTTTTCGC AGTCCATCCTAGGCGAT
repERBS	Predĺženie <i>repE</i> úseku o zmenené RBS miesto	CACTAACTATTGGCGACAAAGGCGGTACT GTCTAGGTACACTTCACACTGTTC

Tab. 5. Amplifikačný program použitý pri PCR reakciách.

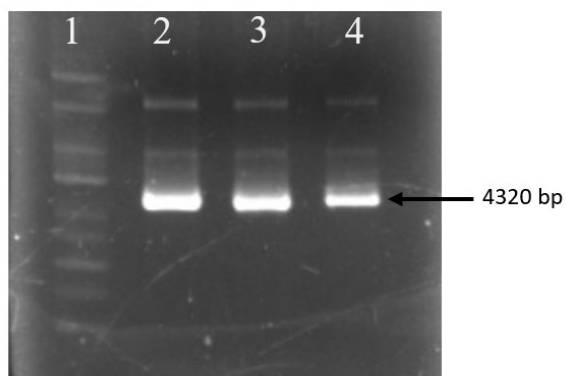
Krok	Počet opakovaní	Teplota	Čas
Počiatočná denaturácia	1x	98 °C	120 sekúnd
Denaturácia	30x	98 °C	30 sekúnd
Anelácia primerov	30x	V závislosti od primeru	30 sekúnd
Polymerizácia	30x	72 °C	30 sekúnd/kb
Záverečná polymerizácia	1x	72 °C	120 sekúnd
Chladienie	1x	4 °C	∞

Výsledky a diskusia

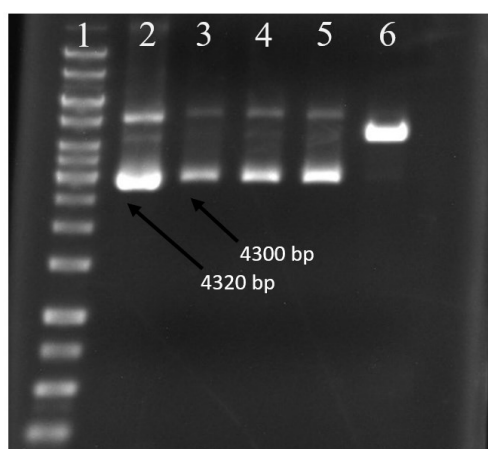
Konštrukcia plazmidov pFE30 a pFE31

Plazmid pFE30 nesie pBAD promótor s divou signálnou sekvenciou pre RBS s cieľom zníženia hladiny translácie v porovnaní s plazmidom pFE20. Najprv sme z plazmidu pFE20 amplifikovali fragment *repE*, ktorý sme predĺžili o sekvenciu obsahujúcu nové RBS miesto (ATGGA) prostredníctvom primerov repERBS a repErrnB P. Vznikol tak fragment repERBS, ktorý sme v druhej PCR reakcii predĺžili o sekvenciu obsahujúcu rozpoznávacie miesto pre BamHI restriktčnú endonukleázu. Výsledný fragment repERBSara (850 bp) sme klonovali do vektora pFE20 prostredníctvom restriktáz *Bam*HI a *Pst*I. Po ligácii inzertu repERBSara s vektorom pFE20 a následnej transformácii do buniek *E. coli* DH5α sme transformantov selektovali na LB agarových platniach s prídavkom chlórampfenikolu v koncentrácii 5 mg.dm⁻³ (LB/Cm5). Vyizolovali sme 3 klony cez kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagene, Nemecko) (Obr.1). Výsledný plazmid dosahuje veľkosť 4320 bp (Obr.3) a obsahuje pBAD promótor s divou RBS sekvenciou, gény *repE* a *araC*, pBR 322 ori a rezistenciu na chlórampfenikol.

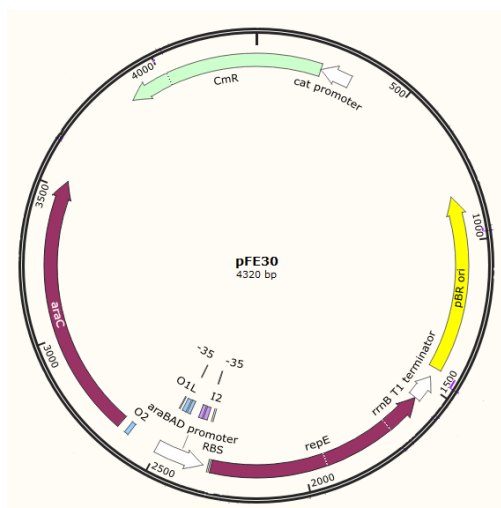
Pri konštrukcii plazmidu pFE31 nám ako vektor slúžil plazmid pFE30 a ako inzert sme použili fragment *repER118P*, vyštiepený z plazmidu pFE21 prostredníctvom restriktčných endonukleáz *Pst*I a *Ngo*MIV. Fragment *repER118P* nesie jednobodovú mutáciu v pozícii 118, ktorá spôsobila zmenu arginínu za prolín. Táto záměna jedného nukleotidu spôsobí navýšenie množstva monomérskej formy RepE proteínu. Inzert sme s vektorom ligovali pomocou T4 DNA ligázy, transformovali do buniek *E. coli* DH5α a selektovali na LB/Cm5. Správnosť transformantov sme overili kontrolným štiepením restriktázou *Fsp*AI (Obr. 2). Táto restriktčná endonukleáza štiepi iba plazmid pFE30, pretože špecifická mutácia spôsobila zrušenie rozpoznávacej sekvencie pre enzým *Fsp*AI v plazmide pFE31. Výsledný plazmid pFE31 má veľkosť 4320 bp.



Obr. 1. Izolácia plazmidu pFE30. 1. dráha Supercoiled DNA Ladder, 2. dráha klon 1, 3. dráha klon 3, 4. dráha klon 5.



Obr. 2. Overovacie štiepenie plazmidu pFE31 restričnou endonukleázou FspAI. 1. dráha GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 2. dráha neštiepený pFE30, 3. – 5. dráha štiepené klony pFE31, 6. dráha štiepený pFE30.



Obr. 3. Mapa plazmidu pFE30.

Záver

Podarilo sa nám vytvoriť plazmidy pFE30 a pFE31. Dané plazmidy budú slúžiť pre ďalšiu prácu s cieľom vytvoriť expresný plazmid s regulovateľným počtom kópií.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla vďaka projektu APVV-21-0076.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Kaur J., Kumar A., Kaur J. (2018) Int. J. Biol. Macromol., 106, p. 803
- [2] Saïda F. (2007) Curr. Protoc. Protein Sci ., 50(1), p. 5
- [3] Matsunaga F., Ishiai M., Kobayashi G., et al. (1997) J. M. B., 274(1), p. 27
- [4] Németh T. (2022) Štúdium replikačných elementov F plazmidu pre potenciálne využitie v riadení počtu kópií expresného vektora. (Diplomová práca) Univerzita Komenského v Bratislave

Skríning mladých jedincov s predispozíciou k hypertenzii na základe zmien tlaku krvi za bazálnych podmienok, v priebehu a po skončení ergometrického vyšetrenia

Adriana Martišková^{1,2}, Monika Bartošová³, Iveta Waczulíková⁴, Barbara Szeiffová Bačová²,
Narcisa Tribulová²

¹*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
adriana.martiskova@savba.sk*

²*Ústav pre výskum srdca Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Centrum experimentálnej medicíny, Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava, Slovenská republika*

³*Univerzitná nemocnica Bratislava, Nemocnica Staré Mesto, Oddelenie telovýchovného lekárstva, Mickiewiczova 13, 811 07 Bratislava, Slovenská republika*

⁴*Univerzita Komenského v Bratislave, Fakulta matematiky, fyziky a informatiky, Katedra jadrovej fyziky a biofyziky, Mlynská dolina F1, 842 48 Bratislava, Slovenská republika*

Abstract

Screening of young individuals with a predisposition to hypertension based on the blood pressure alterations under basal conditions, during and after ergometric test

Incidence of hypertension – the dominant risk factor of cardiovascular diseases increases worldwide, and because of unhealthy lifestyle, it moves to the younger age groups. One of the indicators of possible incidence of hypertension in the future is a slower decrease in blood pressure after the ergometric test. The aim of the study was to find out whether there are clinically relevant changes in blood pressure under basal conditions, during and after ergometric test in the monitored group of 18 – 30-year-old probands and to characterize their possible relation to gender, anthropometric parameters, and lifestyle. In the group of 67 probands, a clinically relevant increase in systolic blood pressure under basal conditions was found in 7 male probands. A slower decrease in systolic blood pressure during the post-exercise recovery phase was observed in 10 male probands. Male gender was the dominant risk factor in the study. Findings of the study suggest that it is relevant to screen young individuals with predisposition to hypertension.

Keywords: blood pressure monitoring; hypertension; risk factors; ergometry

Úvod a formulácia cieľa

Arteriálna hypertenzia, definovaná ako tlak krvi (TK) $\geq 140/90$ mmHg, postihuje približne tretinu dospelých svetovej populácie [1]. Skoro polovica z nej však nevie, že má hypertenziu a približne 50% diagnostikovaných pacientov nie je adekvátne liečených. Arteriálna hypertenzia je dominantným rizikovým faktorom cievnej mozgovej príhody, mnohých kardiovaskulárnych ochorení a aterosklerózy, spôsobujúcich zlyhanie funkcie srdca [2]. Okrem toho, hypertenziou vyvolané štrukturálne a molekulárne abnormality srdcového svalu podporujú vznik malígnych porúch rytmu a môžu viesť až k náhlej arytmickej srdcovej smrti [3 - 4].

Nakoľko sa incidencia hypertenzie najmä v dôsledku nezdravého životného štýlu posúva do mladšej vekovej kategórie [4], je potrebné venovať pozornosť odhaleniu jedincov

s predispozíciou k hypertenzii v tejto populácii. Jednou z možností skríningu jedincov je komplexné ergometrické vyšetrenie, pričom jedným z ukazovateľov možnej predispozície k hypertenzii je pomalší pokles tlaku krvi vo fáze zotavenia po ergometrickej záťaži [5].

Cieľom štúdie bolo zistiť, či sa v sledovanom súbore mladých probandov vo veku 18 – 30 rokov odhalia klinicky relevantné zmeny TK za bazálnych podmienok, v priebehu a po skončení ergometrického vyšetrenia, ako aj charakterizovať ich možný vzťah k pohlaviu, antropometrickým parametrom a životnému štýlu.

Materiál a metódy

Sledovaný súbor probandov bol tvorený uchádzačmi o štúdium na Fakulte telesnej výchovy a športu Univerzity Komenského v Bratislave (FTVŠ). Súbor pozostával z 37 mužov a 30 žien vo veku 18 – 30 rokov ($19,58 \pm \text{SD } 1,85$ rokov), ktorí absolvovali ergometrické vyšetrenie na Oddelení telovýchovného lekárstva Univerzitnej nemocnice v Bratislave. Zber dát bol realizovaný so súhlasom primárky oddelenia, MUDr. Moniky Bartošovej. Probandi svojím podpisom vyjadrili súhlas so zhotovením dokumentácie a jej následným použitím na vedecké účely a vzdelávaciu činnosť.

Pred samotným ergometrickým vyšetrením probandi absolvovali evidovanie anamnézy, meranie bazálneho TK a srdcovej frekvencie, pokojové elektrokardiografické (EKG) vyšetrenie v ľahu, meranie antropometrických parametrov - výšky, hmotnosti a obvodu pásu.

Na začiatku vyšetrenia sa proband posadil na bicyklový ergometer, na ľavú ruku sa mu nasadila manžeta na meranie TK a na hrudník sa mu umiestnili elektródy. 12-zvodový EKG záznam a meranie TK prebiehalo kontinuálne počas trvania záťažového testu, aby v prípade výskytu závažných abnormalít mohol byť test predčasne ukončený, ako aj vo fáze zotavenia (FZ). Prístroj automaticky zvyšoval záťaž podľa testovacieho protokolu zvoleného lekárom. Probandi vykonávali záťažový test do dosiahnutia subjektívneho maxima záťaže.

Z nameraných parametrov sme zaznamenávali a ďalej vyhodnocovali telesnú výšku a hmotnosť, z ktorých sme určili hodnotu indexu telesnej hmotnosti (BMI) ako hmotnosť v $\text{kg}/(\text{výška v m})^2$; obvod pásu v cm na zistenie prítomnosti abdominálnej obezity; hodnoty systolického a diastolického TK a srdcovej frekvencie namerané pri vstupnej prehliadke, v 0., 2. a 4. minúte bicyklovej ergometrie, pri maximálnej dosiahnutej záťaži, v 2. minúte fázy zotavenia a pri ukončení testu. Dôležitým zaznamenávaným parametrom, ktorý môže byť prediktorom hypertenzie aj u tých jedincov, ktorí majú pokojové hodnoty TK v norme, je dĺžka trvania fázy zotavenia po ergometrickej záťaži.

Faktory životného štýlu, ktoré by mohli prispievať k riziku vzniku hypertenzie sme sledovali dotazníkovou formou. Otázky sa týkali spánkových a stravovacích návykov, frekvencie vykonávania fyzickej aktivity, miery pociťovania stresu a prítomnosti niektorých ochorení u respondentov a ich blízkych rodinných príslušníkov.

Probandi boli na základe poklesu TK vo fáze zotavenia rozdelení do 2 skupín – s pomalším poklesom TK ($n = 10$) a s primeraným poklesom TK ($n = 57$). Za pomalší pokles sa považuje hodnota systolického TK ≥ 140 mmHg v 3. minúte fázy zotavenia. Na štatistické vyhodnotenie porovnania srdcovej frekvencie, systolického a diastolického TK v jednotlivých fázach testu, ako aj hodnoty BMI medzi týmito skupinami sme použili parametrický nepárový Student t-test a neparametrický Man-Whitney U-test. Normalita dát bola testovaná Shapiro-Wilkovým testom. Vzťah medzi pomalším poklesom TK a ostatnými sledovanými faktormi sme vyhodnotili pomocou Pearsonovej korelačnej analýzy. Na grafické zobrazenie dát sme použili krabicové grafy, ktoré zobrazujú minimálnu hodnotu, maximálnu hodnotu, dolný kvartil a horný kvartil dátového súboru. Horizontálna čiara predstavuje medián a bod v strede aritmetický priemer.

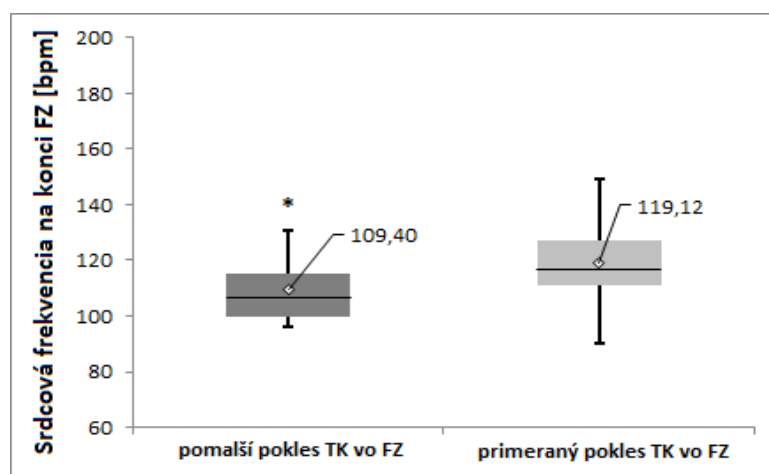
Výsledky a diskusia

V sledovanom súbore sa nachádzalo 7 probandov s bazálnou hodnotou systolického TK ≥ 130 mmHg, čo predstavuje 10,4% z celkového počtu probandov. Všetci boli mužského pohlavia. U troch z nich bol zaznamenaný pomalší pokles TK vo fáze zotavenia. Bazálne hodnoty diastolického TK boli u všetkých probandov v norme, t.j. ≤ 80 mmHg.

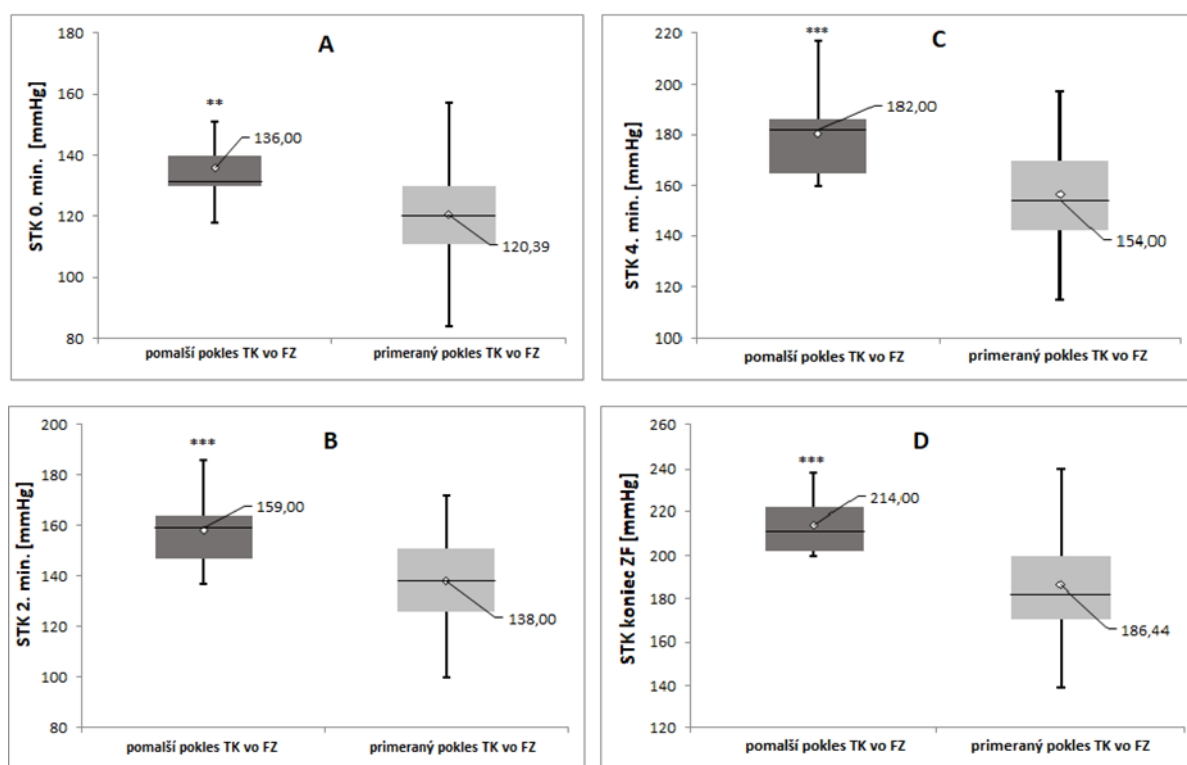
Medzi skupinou probandov s pomalším poklesom TK vo fáze zotavenia a skupinou s primeraným poklesom TK vo fáze zotavenia sme pozorovali signifikantné rozdiely v hodnotách srdcovej frekvencie na konci fázy zotavenia, ktoré boli ovplyvnené dĺžkou trvania tejto fázy ($p=0,041$) (Obr. 1.), systolického TK v 0. minúte záťažovej fázy (ZF) ($p=0,005$) (Obr. 2A.), systolického TK v 2. minúte ZF ($p=0,0007$) (Obr. 2B.), systolického TK v 4. minúte ZF ($p=0,0005$) (Obr. 2C.), systolického TK na konci ZF ($p=0,0002$) (Obr. 2D.) a bazálneho diastolického TK ($p=0,007$) (Obr. 3).

Korelačná analýza odhalila vzťah medzi pomalším poklesom TK a mužským pohlavím ($r=0,3772$; $p=0,002$), bazálnym systolickým TK ($r=0,2840$; $p=0,020$), systolickým TK v 0. minúte záťažovej fázy (ZF) ($r=0,3427$; $p=0,005$), systolickým TK v 2. minúte ZF ($r=0,4031$; $p=0,001$), systolickým TK v 4. minúte ZF ($r=0,4132$; $p=0,001$), systolickým TK na konci ZF ($r=0,4443$; $p=0,0001$), systolickým TK v 2. minúte fázy zotavenia ($r=0,6246$;

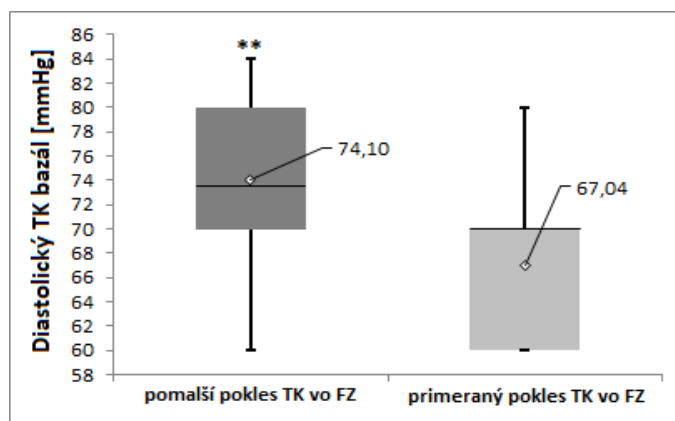
$p=0,0001$), systolickým TK na konci fázy zotavenia ($r=0,3972$; $p=0,001$) a bazálnym diastolickým TK ($r=0,3522$; $p=0,003$).



Obr. 1. Srdcová frekvencia na konci fázy zotavenia. Zaznamenali sme signifikantne nižšie hodnoty u skupiny s pomalším poklesom TK vo fáze zotavenia ($n=10$) ako u skupiny s primeraným poklesom TK vo fáze zotavenia ($n=57$) (FZ = fáza zotavenia, * = $p < 0,05$).



Obr. 2. Hodnoty systolického tlaku krvi (STK) v 0. minúte záťažovej fázy (ZF) (A), v 2. minúte ZF (B), v 4. minúte ZF (C) a na konci ZF (D). Pri všetkých parametroch sme zaznamenali signifikantne vyššie hodnoty u skupiny s pomalším poklesom TK vo fáze zotavenia ($n=10$) ako u skupiny s primeraným poklesom TK vo fáze zotavenia ($n=57$) (FZ = fáza zotavenia, ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).



Obr. 3. Hodnoty bazálneho diastolického TK. Zaznamenali sme signifikantne vyššie hodnoty u skupiny s pomalším poklesom TK vo fáze zotavenia (n=10) ako u skupiny s primeraným poklesom TK vo fáze zotavenia (n=57) (FZ = fáza zotavenia, ** = $p < 0,01$).

Nultá minúta záťažovej fázy býva niekedy označovaná ako „predštartový stav“. Hodnota TK v tejto fáze vyšetrenia je významným ukazovateľom, nakoľko môže existovať asociácia medzi väčším nárastom reaktivity TK v dôsledku očakávania záťažového testu a incidenciou hypertenzie u zatiaľ normotenzných jedincov [6]. V nami sledovanom súbore mladých probandov mala riziková skupina – t.j. skupina s pomalším poklesom TK vo fáze zotavenia, signifikantne vyššie hodnoty systolického TK v 0. minúte záťažovej fázy v porovnaní so skupinou s primeraným poklesom TK vo fáze zotavenia.

V práci sme ako najvýznamnejší rizikový faktor pomalšieho poklesu TK vo fáze zotavenia u mladých probandov vyhodnotili mužské pohlavie, nakoľko skupinu s pomalším poklesom tvorili iba muži, a rovnako len u mužov sme zaznamenali aj klinicky relevantné zmeny TK za bazálnych podmienok. Prvý nárast hodnôt TK u mužov nastáva vo veku 15 rokov, zatiaľ čo u žien je strmší nárast pozorovaný neskôr, až medzi 20. a 30. rokom života [7].

Napriek nášmu predpokladu asociácie nezdravého životného štýlu s predispozíciou k hypertenzii sme neodhalili v sledovanom súbore žiadnu koreláciu medzi pomalším poklesom TK a faktormi životného štýlu, ktoré boli sledované dotazníkovou formou. Pravdepodobne to bolo spôsobené tým, že probandi boli uchádzačmi o štúdium na FTVŠ, a preto mala väčšina z nich dostatok pohybu aj dobrú životosprávu.

V sledovanom súbore probandov sme odhalili pozitívnu koreláciu medzi dĺžkou spánku a systolickým TK na konci záťažovej fázy, ako aj na konci fázy zotavenia v skupine s pomalším poklesom TK vo fáze zotavenia. Spánkový status ovplyvňuje funkciu autonómneho nervového systému a ďalšie fyziologické reakcie, čo má vplyv aj na tlak krvi. Preto môže byť z dlhodobého hľadiska príliš dlhé trvanie spánku, najmä v kombinácii s jeho zlou kvalitou rizikovým faktorom vzniku hypertenzie, rovnako ako príliš krátke trvanie spánku

[8 - 9].

Záver

V súbore 67 probandov bolo zistené klinicky relevantné zvýšenie systolického tlaku krvi za bazálnych podmienok u 7 probandov mužského pohlavia. V sledovanom súbore sa nevyskytli klinicky relevantné zmeny diastolického tlaku krvi ani srdcovej frekvencie za bazálnych podmienok. U 10 probandov mužského pohlavia bol zistený pomalší pokles systolického tlaku krvi vo fáze zotavenia po záťaži. Takýto jav môže naznačovať predispozíciu k hypertenzii. Mužské pohlavie bolo v našej štúdii dominantným rizikovým faktorom.

Napriek nášmu predpokladu asociácie nezdravého životného štýlu s predispozíciou k hypertenzii sme neodhalili v sledovanom súbore žiadnu koreláciu medzi pomalším poklesom TK a faktormi životného štýlu, ktoré boli sledované dotazníkovou formou. Bolo to pravdepodobne spôsobené tým, že probandi boli uchádzačmi o štúdium na FTVŠ, a preto mala väčšina z nich dostatok pohybu aj dobrú životosprávu. Neodhalili sme tiež žiadnu koreláciu medzi pomalším poklesom TK a antropometrickými parametrami ani rodinnou anamnézou, ktorá bola sledovaná dotazníkovou formou.

PodĎakovanie

Práca bola podporená grantmi VEGA 2/0002/20 a APVV-21-0410. Realizácia štatistických analýz bola uskutočnená s podporou grantu KEGA: 041UK-4/2020.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Valenzuela P. L., Carrera-Bastos P., Gálvez B. G., et al. (2021) Nat. Rev. Cardiol. 18(4), p. 251
- [2] Harrison D. G., Coffman T. M., Wilcox C. S. (2021) Circ. Res. 128(7), p. 847
- [3] Egan Benova T., Szeiffova Bacova B., Viczenczova C., et al. (2016) Physiol. Res. 65(Suppl.1), p. 29
- [4] Sykora M., Andelova K., Szeiffova Bacova B., et al. (2023) Biomolecules 13(2), p. 330
- [5] Meško D., Komadel L. (2005) Telovýchovnolekárske vademecum. Slovenská spoločnosť telovýchovného lekárstva, Bratislava, p. 90
- [6] Jae S.Y., Kurl S. Laukkanen J. A., et al. (2014) Am. J. Cardiol. 114(8), p. 1238
- [7] Ji H., Kim A., Ebinger J. E., et al. (2020) JAMA Cardiol. 5(3), p. 19
- [8] Jike M., Itani O., Watanabe N., et al. (2018) Sleep Med. Rev. 39, p. 25
- [9] Han B., Chen W. Z., Li Y. C., et al. (2020) Sleep Breath. 24(1), p. 351

Hniezdna biológia muchárika bieločrkého (*Ficedula albicollis* (Temminck, 1815)) v dubovom lese v ZOO Bratislava

Martin Matejka, Natália Benovičová, Hana Tomanovičová, Jana Gát'ová, Kristína Abrahámovičová, Zlatica Országhová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra zoológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; c10matejka@gmail.com

Abstract

Breeding biology of the Collared Flycatcher (*Ficedula albicollis* (Temminck, 1815)) in the oakwood in the ZOO Bratislava

During the 6 breeding seasons, we observed breeding of Collared Flycatcher in 50 nest boxes in the island of oak forest in the ZOO Bratislava. In total 21 broods were found, except one all of them were in nest boxes. Flycatchers showed the tendency to increase their breeding densities throughout our study. Mean clutch size was 6.24 eggs. The most common were clutches with 7 eggs, clutch size varied from 3 to 8 eggs. Eggs (n=99) were on average 18.28 mm long and 15.86 mm wide. Mean egg volume was 1.71 mm³. Most of Collared Flycatchers started with egg laying during the first two decades of May. Daily nest survival probability, calculated using the Mayfield method was 99.41%, fledging probability was 82.36%. In one case we found Collared Flycatcher probably responsible for destruction of Blue Tit eggs. Eggs disappeared and during the subsequent week the complete nest of Collared Flycatcher was found. Broken Blue Tit eggs were later found in the bottom of nest box under the nest material.

Keywords: Collared Flycatcher; oakwood; breeding biology; city of Bratislava – W Slovakia

Úvod a formulácia cieľa

Muchárik bieločrký (*Ficedula albicollis* (Temminck, 1815)) je drobný hmyzožravý spevavec veľkosti vrabca, z čeľade muchárikovité (Muscicapidae). Typickým biotopom tohoto druhu sú najmä listnaté lesy, luhy, dúbravy a bučiny s množstvom bŕtlavých stromov. Hniezdia však aj v zmiešaných porastoch, ovocných sadoch, hájoch alebo parkoch [1, 2] až do nadmorskej výšky 1200 m n. m. [1]. V prípade poskytnutia umelých hniezdných možností sa usadzujú aj v biotopoch, ktoré sú pre ne neobvyklé, napríklad v mladých borovicových výsadbách [3, 4]. Muchárik bieločrký patrí k dutinovým hniezdičom [3], pričom okrem prirodzených dutín ochotne obsadzuje aj vtáčie búdky [5, 6, 7].

Po prilete zo zimovísk južnej a východnej Afriky v apríli až máji [5, 6] začínajú muchárikovia so stavbou hniezda. Najčastejším hniezdnym materiálom sú suché stebľa rôznych tráv, suché lístie, tenké koreňky, hrubšie lyko a úlomky listov [3, 5, 6, 7]. Do hniezda znáša samica najčastejšie 4 až 7 modrozelených vajícok. Zriedkavejšie sú znášky obsahujúce 3 a 8 až 9 vajícok [2, 3, 5, 6]. Vajíčka inkubuje samica 13 až 15 [5] resp. 12 až 13 dní [2]. O mláďatá na hniezde sa starajú obidvaja rodičia 16 až 17 dní. Muchárik bieločrký hniezdi iba raz ročne. Pri zničení znášky však spravidla nasleduje náhradná znáška [5]. Pri hniezdení boli zistené

významné medzisezónne rozdiely v načasovaní začiatku [8], veľkosti [4] znášky či úspešnosti hniezdenia [9]. Pričom sa medzi sebou líšia aj rozdielne habitaty [4, 6, 9].

Cieľom práce je prezentovať údaje o fenológii, produktivite a úspešnosti hniezdenia muchárika bielokrkého v enkláve dubového lesa v meste Bratislava, v ZOO Bratislava, počas 6 hniezdných sezón.

Materiál a metódy

Výskum hniezdnej biológie muchárika bielokrkého sa uskutočňoval na území zoologickej záhrady (ZOO) Bratislava (N 48° 9' 24.1" E 17° 4' 32.5") v rokoch 2016 –2019, 2021, 2022. Lokalita sa nachádza na úpätí Malých Karpát v nadmorskej výške 230 m n. m. v Mlynskej doline, v mestskej časti Karlova Ves. Územie ZOO sa nachádza v teplej klimatickej oblasti, v okrsku ktorý charakterizujeme ako teplý a mierne vlhký s miernou zimou [10, 11], s priemernou ročnou teplotou +10,3 °C a ročným úhrnom zrážok 642 mm [11]. Na lokalite, ktorej prevažnú väčšinu predstavuje približne 85 ročný dubový les s prímiesou agátu bieleho je umiestnených 50 vtáčích búdok pre sýkorky (29 búdok) a škorce (18 búdok).

Výskum sme realizovali pravidelnými týždennými kontrolami búdok v období od marca do júla v rokoch 2016 až 2019, 2021 a 2022. V roku 2021 neboli búdky ku koncu sezóny kontrolované pravidelne. Sledovali sme obsadenosť búdok, počet hniezdiacich párov, počet znesených vajec, dátum začatia znášky, počet vyliahnutých a vyletených mláďat a úspešnosť hniezdenia. Denné prežívanie a úspešnosť hniezdenia sme vypočítali pomocou Mayfieldovej metódy [12]. Pri vajciach sme merali ich dĺžku a šírku pomocou posuvného meradla s nóniom. Na základe šírky a dĺžky sme vypočítali objem podľa vzorca [I.], pričom K_v je objemový koeficient ($K_v = 0,51$), L je dĺžka a B je šírka vajčka a hmotnosť čerstvo zneseného vajčka podľa vzorca [II.], pričom K_w = hmotnostný koeficient = 0,548 [13]. Štatistické testy sme robili v programe PAST 2.17c.

$$V = K_v \times LB^2 \quad \text{[I.]}$$

$$m = K_w \times LB^2 \quad \text{[II.]}$$

Výsledky a diskusia

Celkovo sme zaznamenali počas 6 sezón 21 hniezdení muchárika bielokrkého. Početnosť muchárikov, ktoré obsadzovali vtáčie búdky postupne narastala. V roku 2016 sme zaznamenali jedno hniezdenie, v roku 2017 dve, v roku 2018 opäť jedno, v roku 2019 to boli štyri hniezdenia, v roku 2021 až sedem. V roku 2022 sme znášky muchárika bielokrkého

objavili v piatich búdkach, pričom ešte v dvoch začali mucháriky so stavbou hniezda, avšak vajíčka nezniesli. Jedno hniezdo sme v tomto roku našli aj v prirodzenej dutine agátu. Rastúci trend obsadenosti búdok bol pozorovaný podobne i v borovicovom a zmiešanom lese na Morave [4].

Aj v ZOO boli hniezda zložené zo suchej trávy a listov, podobne ako na iných lokalitách [6]. V prípade, že mucháriky zabrali hniezda sýkoriek, obsahovali ich hniezda aj mach či srst'. Hmotnosť 13 hniezd muchárika bieločrkého sa v ZOO pohybovala od 32,74 g (búdka č. 16 v roku 2022) do 64 g (búdka č. 26 v roku 2019). Priemerne vážili hniezda 46,32 g.

Priemerná veľkosť znášky muchárika bieločrkého za celé obdobie bola 6,24 vajec. Podobná priemerná veľkosť znášky bola zistená aj v teplých a mierne teplých oblastiach Moravy, kde dosahovala v prvom hniezdení priemerne 6,40 vajec [14]. V teplejších oblastiach bola veľkosť oproti mierne teplým, priemerne o 0,17 vajíčka väčšia [14]. Podobne to bolo aj na Slovensku. V regióne Hornej Nitry bola priemerná veľkosť znášky 6,3 vajíčok, pričom s rastúcou nadmorskou výškou a zmenou habitatu veľkosť znášky klesala na 5,9 vajíčok na dolnom Liptove [9]. Na južnej Morave bola priemerná veľkosť znášky najväčšia v listnatých lesoch a najmenšia v čistých borinách [4]. Veľkosť jednotlivých znášok sa v ZOO pohybovala od 3 po 8 vajíčok, pričom najpočetnejšie boli znášky obsahujúce 7 (9 znášok) a 6 vajíčok (7 znášok). Menej početné boli hniezda s 5 vajíčkami (3 znášky). V dvoch rokoch sme našli jednu znášku s 8 (v roku 2019) resp. 3 vajíčkami (rok 2022, hniezdo v prirodzenej dutine). Aj na Morave boli najpočetnejšie znášky obsahujúce 6 resp. 7 vajec, znášky so 6 vajcami však prevažovali [4, 14], podobne aj na troch lokalitách na Slovensku [9] či v Nemecku v okolí Stuttgartu, kde veľkosť znášky klesala s neskorším začiatkom znášky v sezóne [15].

Vajíčka ($n = 99$) boli dlhé priemerne 18,28 mm, pričom najmenšia dĺžka bola 15,86 mm a najväčšia 21,29 mm. Šírka vajíčok muchárika sa pohybovala od 12,1 do 14,16 mm, priemerne 13,52 mm. Priemerný objem vajíčok bol $1,71 \text{ mm}^3$ (min. $1,21 \text{ mm}^3$, max. $2,16 \text{ mm}^3$), priemerná hmotnosť bola 1,83 g (min. 1,30 g, max. 2,32 g). V Jurskom Šúri bola priemerná dĺžka 244 vajíčok 17,80 mm, o niečo menej než v ZOO, a priemerná šírka 13,47 mm. Priemerný objem vajíčok bol na tejto lokalite tiež menší než v ZOO, len $1,66 \text{ mm}^3$ [16]. Najväčšie vajíčko v Jurskom Šúri bolo 19,11 mm dlhé a 15,4 mm široké, najmenšie malo rozmery 14,6 x 12 mm [16]. Extrémne malé vajíčka s rozmermi 11,9 x 9,5 resp. 12,3 x 9,4 mm, aké boli zaznamenané napríklad v blízkosti Kremnice, či vajíčka extrémne dlhé (až 24,01 mm dlhé vajíčko z Liptova) [9] sme v ZOO nezaznamenali. Keď sme porovnali rozmery vajíčok v znáškach s 5, 6 a 7 vajíčkami, medzi týmito skupinami sme zistili signifikantné rozdiely v mediánoch (Kruskal-Wallisov test, $H=13,09$, $P=0,0014$) i v priemeroch (One-way ANOVA,

$F=3,12$, $P=0,049$, nesplnená normalita) dĺžky medzi skupinami. V priemernej šírke sa však skupiny medzi sebou nelíšili (One-way ANOVA, $F=2,13$, $P=0,12$).

So znáškou začínali mucháriky v ZOO najčastejšie v prvej až druhej dekáde mája. V roku 2016 bol začiatok znášky jediného hniezda 11.5., v roku 2017 to pri dvoch hniezdach bolo 3. resp. 5. mája a v roku 2018 začalo jediné hniezdenie 8. mája. V roku 2019 sme zaznamenali pri 3 hniezdeniach začiatok znášky 14. mája a 1 znáška začala až 31. mája. V roku 2021, kedy sa nám nepodarilo zaznamenať všetky začiatky znášky, začala jedna znáška 20. a dve 21. mája. V roku 2022 začala prvá znáška 29. 4., priemerný začiatok znášky bol v tomto roku 3. mája. Aj na iných lokalitách je začiatok znášky podobný [9, 15], pričom tento silno závisí od teploty v apríli danej sezóny [8, 14, 15].

Z 15 znášok, pri ktorých sa nám podarilo určiť úspešnosť boli len 2 znášky neúspešné, teda také, kde vyletelo len jedno mláďa. Neúspešné znášky predstavujú teda 13,33 % zo všetkých. V jednom prípade zmizli z hniezda všetky mláďatá, s najväčšou pravdepodobnosťou boli predované užovkou stromovou (*Zamenis longissimus* (Laurenti, 1768)). V druhom prípade sme našli uhynuté mláďatá v búde, pričom hniezdo bolo zamorené parazitickými roztočmi z roku klieštikovec (*Dermanyssus* Dugès, 1834). Denná pravdepodobnosť prežívania hniezd muchárikov bieločrých v ZOO Bratislava bola vysoká, až 99,41 %, podobne ako na Hornej Nitre v Kamenci pod Vtáčnikom (99,03 %), v okolí Kremnice (98,89 %) či na Liptove (97,82 %) [9]. Pravdepodobnosť, že z hniezda vyletí aspoň 1 mláďa je v ZOO 82,36 %. Na iných lokalitách Slovenska bola táto pravdepodobnosť nižšia, predovšetkým vďaka negatívnemu vplyvu predátorov [9].

Úspešnosť vyletenia (percentuálny podiel počtu vyletených a vyliahnutých mláďat) pri tých hniezdach, kde poznáme počet vyliahnutých i vyletených mláďat ($n=14$) bola 75 % v ZOO. Priemerne vyletelo 4,23 mláďat muchárika bieločrého z 5,71 vyliahnutých. Na Morave bola úspešnosť vyletenia pri 110 hniezdach o niečo vyššia, 84,76 % [4]. Podobne tomu bolo aj v Nemecku (Štuttgart, 85,42 %), kde bol priemerný počet vyliahnutých mláďat 5,26 a priemerný počet vyletených 4,5 mláďat/ hniezdo [15].

Keďže mucháriky patria medzi dutinové hniezdiče, je limitujúcim faktorom hniezdnej hustoty na danej lokalite aj počet dostupných dutín. Ich dostupnosť je v čase priletu muchárikov už značne obmedzená, pretože väčšina stálych dutinových hniezdičov už budú obsadila [8]. Pri pokuse obsadiť vtáčiu búdku padnú často mucháriky za obeť silnejším a agresívnejším druhom, napríklad vrabcom či sýkorke veľkej (*Parus major* Linnaeus, 1758) [8, 17, 18]. V inom prípade mucháriky na už jestvujúcom hniezde aj s vajíčkami postavila v priebehu pár málo hodín svoje hniezdo [8,17]. Bol zaznamenaný aj prípad, kedy muchárik

usmrtil 4 mláďatá sýkorky veľkej, ktoré z búbky následne vyhodil [19]. Pravdepodobné zničenie znášky sýkorky belasej (*Cyanistes caeruleus* (Linnaeus, 1758)) muchárikom sme pozorovali v roku 2022 v búbke číslo 1. Začiatkom apríla zniesla sýkorka belasá do búbky prvé vajíčko. Dvadsiateho apríla bolo v búbke 8 studený vajíčok, pričom jedno z nich bolo prasknuté. O 9 dní vajíčka zmizli bez poškodenia hniezda a 4. mája bolo v búbke už hniezdo muchárika. Po vyletení muchárikov sme zistili, že na dne búbky sa nachádzali rozďobané vajíčka sýkorky belasej (Obr. 1.), pričom ich obsah vypitý nebol. Podobný prípad pravdepodobného zničenia znášky vodnára potočného (*Cinclus cinclus* (Linnaeus, 1758)) orieškom hnedým (*Troglodytes troglodytes* (Linnaeus, 1758)), kedy boli vajíčka nadobnuté bol zaznamenaný na severnom Slovensku [20].



Obr. 1. Rozďobané vajíčka sýkorky belasej nájdené pod hniezdom muchárika bieločrkého v búbke č. 1
ZOO Bratislava 22. 6. 2022, foto: Jana Gátová

Záver

Počas 6 hniezdných sezón sme sledovali hniezdenie muchárika bieločrkého vo vtáčích búdkach v enkláve dubového lesa v meste, v ZOO Bratislava. Na lokalite sme zaznamenali spolu 21 hniezdení muchárika, pričom počet zaznamenaných hniezd v roku mal rastúci trend. Priemerná hmotnosť hniezda muchárikov zo suchej trávy a listia bola 46,32 g. Priemerná veľkosť znášky bola 6,24 vajíčok. Počet vajec v hniezde sa pohyboval od 3 po 8, najpočetnejšie boli znášky obsahujúce 7 vajec. Vajcia ($n=99$) mali priemernú dĺžku 18,28 mm, šírku 13,52 mm, objem 1,71 mm³ a hmotnosť 1,83 g. Začiatok znášky pripadal vo väčšine prípadov na prvé dve dekády mája. Najskorší začiatok znášky bol v roku 2022, 29. apríla. Denná pravdepodobnosť prežitia hniezda bola pomerne vysoká, 99,41 %, podobne i pravdepodobnosť vyletenia 82,36 %. V jednom prípade sme zaznamenali pravdepodobné zničenie vajíčok sýkorky belasej muchárikom.

Podakovanie

Podakovať by sme sa chceli vedeniu ZOO Bratislava, ktoré nám umožnilo vykonávať

výskum dutinových hniezdičov vo verejnosti neprístupnej časti ZOO. Za pomoc v teréne a zber údajov by sme sa chceli poďakovať Mgr. Tímei Horváthovej, Mgr. Martinovi Dolinskému a Mgr. Barbore Slovákovej a všetkým ktorí akýmkoľvek spôsobom prispeli k výskumu.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Krištín A., Kropil R. (2002) Muchárik bieločrý (Ficedula albicollis). In: Danko Š., Darolová A., Krištín A. (ed.) Rozšírenie vtákov na Slovensku. Veda, Bratislava, p. 531
- [2] Ferianc O. (1979) Vtáky Slovenska 2. Veda, Bratislava, p. 287
- [3] Dementiev G. P., Gladkov N. A. (ed.) (1954) Pticy Sovetskogo sojuza Tom. 6. Sovetskaja nauka, Moskva, p. 99
- [4] Balát F. (1971) Zool. Listy 20, p. 161
- [5] Hudec K., Černý W. (ed.) (1983) Fauna ČSSR Ptáci III/2. Academia, Praha, p. 725
- [6] Glutz von Blotzheim U. N., Bauer K. M. (ed.) (1993) Handbuch der Vögel Mitteleuropas Band 13/1, Passeriformes. Aula –Verlag, Weisbaden, p. 144
- [7] Benovičová N. (2022) Priebeh hniezdenia muchárika bieločrého (*Ficedula albicollis*) a jeho úspešnosť. (Bakalárska práca), Univerzita Komenského v Bratislave
- [8] Baláž M. (2022) Tichodroma 34, p. 1
- [9] Baláž M. (2020) Vplyv enviromentálnych faktorov na biológiu hniezdenia muchárika bieločrého (*Ficedula albicollis*) na troch rôznych lokalitách. (Habilitačná práca) Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre
- [10] Atlas SSR (1980) Slovenská akadémia vied, Slovenský úrad geodézie a kartografie, Bratislava
- [11] Petrovič Š., Kurpelová M., Biedroň V., et al. (1968) Klimatické a fenologické pomery Západoslovenského kraja. Hydrometeorologický ústav, Praha, p. 10
- [12] Mayfield, H. F. (1975) Wilson Bull., 87, p. 456
- [13] Hoyt D. F. (1979) The Auk 96, p. 73
- [14] Král M., Adamík P., Krause F., et al. (2011) Sylvia 47, p. 17
- [15] Löhrl H. (1957) Bonn. Zool. Beitr. 8, p. 130
- [16] Paliesková K., Janiga M., Kocian L. (1990) Acta Fac. Rer. Nat. Univ. Comeniae 33, p. 49
- [17] Löhrl H. (1990) Mitt. von Birdlife Österreich 5, p. 39
- [18] Merilä J., Wiggins D. A. (1995) Condor 97, p. 445
- [19] Heschl A., Heschl P. (2021) Academia letters, preprint, p. 1
- [20] Hrčková L., Balážová M., Országhová Z., et al. (2019) Biológia 74(6), p. 691

Asociácia prítomnosti laktózovej intolerancie a zdravia kostí u mladých slovenských žien

Barbara Matzenauerová, Darina Falbová, Viktória Kovalčíková, Frederika Hanuliaková,
Dominika Lechmanová, Lenka Vorobeľová

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra antropológie,
Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
matzenauerova2@uniba.sk*

Abstract

Association of the presence of lactose intolerance and bone health in young Slovak women

The aim of this study was to determine the relationship between lactose intolerance (LI) and bone health in young Slovak women. The studied sample consisted of 348 women aged 18 to 30 years. The women were divided into two subgroups according to their LI status: 49 women with LI and 299 women without LI. The Sunlight MiniOmni was used to determine the Z-score, T-score and SOS. The InBody 770 analyzer was used to determine the bone mineral content. We found that women with LI had statistically significantly lower mean values for T-score ($p = 0.029$), and SOS ($p = 0.040$). We observed negative correlation between the presence of LI and T-score ($r = -0.118$, $p = 0.028$) and between the presence of LI and SOS ($r = -0.110$, $p = 0.039$).

Keywords: *lactose intolerance; T-score; Z-score, SOS; bone health*

Úvod a formulácia cieľa

Laktózová intolerancia (LI) je spôsobená nedostatočnou aktivitou enzýmu laktáza-phlorizin hydroláza, ktorý je zodpovedný za metabolizmus disacharidu laktózy. V európskej populácii je jej prevalencia približne než 30 % [1 – 2].

Polymorfické variácie v géne pre laktázu zabezpečujú pretrvávajúce jej funkcie až do dospelosti. Hovoríme tak o laktózovej perzistencii (LP). Laktázovú nedostatočnosť delíme na štyri typy:

- primárna – laktázová nedostatočnosť nastáva v období odstavenia od materského mlieka a je recesívne dedičná,
- sekundárna – nastáva ako následok poškodenia kefového lemu sliznice tenkého čreva sekundárne po virálnej alebo nevirálnej infekcii,
- kongenitálna – veľmi vzácny typ, ktorý sa prejavuje krátko po narodení a začatí dojčenia,
- vývinová – vyskytuje sa u predčasne narodených detí a dochádza k jej náprave počas maturácie črevnej sliznice [3 – 4].

Po identifikácii konkrétneho typu laktózovej intolerancie, ktorým pacient trpí je nevyhnutné nastavenie správnej liečby na zmiernenie jej symptómov. Základom je obmedzenie

príjmu potravín s jej obsahom, čo môže mať za následok nedostatočný príjem vápnika. Z tohto dôvodu je u pacientov s LI dôležité zabezpečiť príjem vápnika a vitamínu D z iných zdrojov, aby sa tak predchádzalo vzniku ochorení, ako napr. osteoporóza [5 – 6].

Spolu s úpravou stravovania je dôležité aj podávanie náhrad ľudskej laktázy vo forme kapsúl, tabliet alebo tekutín, ktoré môže pomôcť u pacientov s občasnými prejavmi intolerancie [7].

Cieľom tejto práce je objasniť vzťah medzi zdravím kostí a prítomnosťou LI u mladých slovenských žien.

Materiál a metódy

Sledovaný súbor tvorilo 348 mladých dospelých žien vo veku 18 – 30 rokov pochádzajúcich z územia Slovenska s priemerným vekom 21,44 rokov $\pm$ 2,28 SD. Celkový súbor bol rozdelený na základe prítomnosti LI na dve podskupiny: ženy s prítomnosťou LI predstavovali klinický súbor (N = 49 žien) a ženy bez prítomnosti LI tvorili porovnávací súbor (N = 299 žien). LI bola probandkám diagnostikovaná lekárom. Dáta boli zbierané od februára 2019 do novembra 2022 a do výskumu boli zapojené len tie ženy, ktoré podpísali informovaný súhlas a súhlasili s účasťou na výskume. Výskum bol schválený etickou komisiou (ECH19021). Samotnému zberu dát predchádzalo vyplnenie upraveného dotazníka podľa Svetovej zdravotníckej organizácie WHO STEPwise approach to surveillance – Instrument v.3.2 [8], pre zistenie informácií o zdravotnom stave, životnom štýle a stravovacích návykoch. Z porovnávacieho súboru následne boli vyradené probandky trpiace inými potravinovými alergiami či intoleranciami, poruchami príjmu potravy, anémiou, ochoreniami tráviaceho traktu, onkologickými ochoreniami, ochoreniami vaječníkov, roztrúsenou sklerózou, ochorením štítnej žľazy, diabetes I. a II. typu, osteoporózou, epilepsiou, boreliózou a hypercholesterolémiou. Po vyplnení dotazníka bola probandkám antropometrom zmeraná telesná výška (TV), aby bolo následne možné probandkám zmerať parametre zloženia tela pomocou prístroja InBody 770, ktorý vykonáva priamu multifrekvenčnú segmentačnú bioelektrickú impedančnú analýzu pomocou DMS – BIA technológie. Z tejto analýzy boli pre účely tohto výskumu využité hodnoty obsahu minerálov v kostiach. Na meranie kostnej denzity bol využitý ultrazvukový prístroj Sunlight MiniOmni. Meranie bolo vykonávané na ľavej vretennej kosti. Predchádzalo mu zmeranie dĺžky predlaktia a ruky, v polovici ktorej bolo zaznačené presné miesto merania. Predlaktie mali probandky počas merania vodorovne položené na stole s vyvýšením v mieste zápästia. Ultrazvuková hlavica bola po nanesení gélu priložená kolmo na vyznačené miesto a počas merania bola pre potreby snímania vretennej

kosti z viacerých uhlov polohovaná. Sledované boli parametre Z-skóre, T-skóre a rýchlosť šírenia ultrazvukovej vlny (speed of sound, SOS). Z-skóre vyjadruje počet smerodajných odchýlok (standard deviation, SD) od ideálnej hodnoty kostnej denzity zdravých jedincov rovnakého pohlavia a veku. T-skóre popisuje kostnú minerálnu denzitu z hľadiska počtu smerodajných odchýlok od ideálnej hodnoty denzity zdravých mladých jedincov vo veku 20 – 29 rokov rovnakého pohlavia. Hodnoty Z-skóre delíme na normálne hodnoty (Z-skóre > -2,0 SD) a zníženú kostnú denzitu (Z-skóre < -2,0 SD). Hodnoty T-skóre delíme na kategórie normálne hodnoty (T-skóre > -1 SD), znížená kostná denzita (T-skóre -1 až -2,5 SD) a osteoporóza (T-skóre ≤ -2,5 SD)[9].

Štatistická analýza bola vykonaná v programe IBM SPSS Statistics 20.0. Na otestovanie normality dát bol použitý Kolmogorov-Smirnovov test. Pre premenné s nie normálnou distribúciou dát bol použitý Mann-Whitneyov U-test. Na korelačnú analýzu asociácie prítomnosti LI u žien a zdravia kostí bol využitý Spearmanov korelačný test pre premenné s asymetrickou distribúciou. Hodnoty na hladine významnosti $\alpha = 0,05$ s hodnotou významnosti $p < 0,05$ sme považovali za štatisticky významné.

Výsledky a diskusia

Pri porovnaní priemerných hodnôt Z-skóre, T-skóre, obsahu minerálov v kostiach a SOS medzi klinickým súborom a porovnávacím súborom žien (tab. 1) sme pozorovali štatisticky významné rozdiely v hodnotách T-skóre ($p = 0,029$) a SOS ($p = 0,040$). Ženy trpiace laktózovou intoleranciou majú nižšie hodnoty T-skóre a SOS, ako ženy porovnávacieho súboru.

Tab. 1. Porovnanie kostných parametrov medzi klinickým súborom trpiacim LI a porovnávacím súborom žien

N – počet jedincov, SD – smerodajná odchýlka, p – hodnota významnosti,
SOS – rýchlosť šírenia ultrazvukovej vlny kosťou

Kostná denzita	Klinický súbor N = 49		Porovnávací súbor N = 299		p
	Priemer	SD	Priemer	SD	
Z-skóre	-0,52	0,92	-0,25	1,05	0,066
T-skóre	-1,23	0,88	-0,82	1,07	0,029
Obsah minerálov v kostiach	2,65	0,37	2,64	0,31	0,943
SOS	4046,61	88,71	4082,76	116,52	0,040

Korelačná analýza medzi prítomnosťou LI a zdravím kostí u žien preukázala štatisticky významnú asociáciu (tab. 2) medzi prítomnosťou LI u žien a hodnotami T-skóre ($p = 0,015$) a SOS ($p = 0,039$) s korelačným koeficientom dosahujúcim negatívne hodnoty. Priemerné hodnoty týchto parametrov môžeme považovať za štatisticky významne nižšie u žien s prítomnosťou LI ako u porovnávacieho zdravého súboru žien.

Tab. 2. Korelačná analýza medzi parametrami kostnej denzity a prítomnosťou LI u žien
r – korelačný koeficient, p – hodnota významnosti, SOS – rýchlosť šírenia ultrazvukovej vlny kosťou

Kostná denzita	r	p
Z-skóre	-0,099	0,065
T-skóre	-0,118	0,028
Obsah minerálov v kostiach	-0,004	0,943
SOS	-0,110	0,039

K podobným záverom prišli aj v štúdií od Baldan et al. [10], v ktorej sledovali kostnú denzitu adolescentov zo severovýchodného Talianska. Meranie kostnej denzity prebiehalo v oblasti diafýzy proximálneho falangu štyroch prstov nedominantnej ruky. Nebol pozorovaný štatisticky signifikantný rozdiel medzi hodnotami Z-skóre pri porovnaní klinického LI súboru a porovnávacieho súboru, aj keď bol príjem vápnika a vitamínu D signifikantne nižší práve v klinickom súbore. Na rozdiel od nášho výskumu však nepozorovali štatisticky signifikantný rozdiel ani medzi hodnotami SOS.

Tereszkowski et al. [11] sledovali vzťah medzi rôznymi faktormi a kostnou minerálnou denzitou celého tela u mladých kanadských študentiek. V prípade študentiek trpiacich LI bola pozorovaná signifikantne nižšia kostná minerálna denzita podobne ako v našom výskume. Zároveň podobne ako v štúdií Baldan et al. [10] predpokladali, že príčinou môže byť nedostatočná substitúcia zdrojov vápnika a vitamínu D, ktoré sú nevyhnutné pre udržanie zdravia kostí.

Záver

Zistili sme štatisticky signifikantné rozdiely v hodnotách kostnej denzity medzi ženami trpiacimi laktózovou intoleranciou a zdravými ženami. V klinickom súbore žien boli pozorované štatisticky významne nižšie priemerné hodnoty T-skóre a SOS, čo indikuje negatívny vplyv laktózovej intolerancie a z nej vyplývajúcich diétnych obmedzení na zdravie kostí mladých slovenských žien, čoho následkom môže byť zvýšené riziko vzniku osteoporózy.

PodĎakovanie

Tento príspevok vznikol vĎaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre dopytovo-orientovaný projekt: Univerzitný vedecký park Univerzity Komenského v Bratislave, ITMS 26240220086 spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Sahi T. (1994) Scand. J. Gastroenterol. 29(Suppl 202), p. 7
- [2] Vandenplas Y. (2015) Asia Pac. J. Clin. Nutr. 24(Suppl 1), p. 9
- [3] Baldan A., Tagliati S., Saccomandi D., et al. (2018) Nutrients. 10(5), p. 558
- [4] Bhatnagar S., Aggarwal R. (2007) BMJ. 334(7608), p. 1331
- [5] Shaukat A., Levitt M. D., Taylor B. C., et al. (2010) Ann. Intern. Med. 152(12), p. 797
- [6] Ratajczak A. E., Rychter A. M., Zawada A., et al. (2021) Nutrition. 82:111043
- [7] Deng Y., Misselwitz B., Dai N., et al. (2015) Nutrients. 7(9), p. 8020
- [8] World health organisation [Citované: 20. marec 2023] https://www.who.int/ncds/surveillance/steps/STEPS_Manual.pdf?ua=1
- [9] Kuřma M., Jackuliak P., Killinger T., et al. (2018) Vyřetrovacie metódy v osteológii. Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, Slovensko, p. 46
- [10] Baldan A., Tagliati S., Saccomandi D., et al. (2018) Nutrients. 10(5), p. 558
- [11] Tereszkowski C. M., Simpson J. A. R., Whiting, S. J., et al. (2012) J. Am. Coll. Nutr. 31(1), p. 24

Analýza črevného mikrobiómu u pacientov so spánkovým apnoe

¹Martina Melicherčíková, ¹Sára Šardzíková, ²Pavol Šiarnik, ²Branislav Kollár, ¹Katarína Šoltys

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 841 04 Bratislava, Slovenská republika;
martinamelichercikova1@gmail.com

²Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, I. neurologická klinika Lekárskej Fakulty Univerzity Komenského a Univerzitnej nemocnice v Bratislave, Mickiewiczova 13, 813 69 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Gut microbiome analysis in patients with sleep apnea

Sleep apnea belongs to the most common sleep disorders. It is related to repeated upper airway collapse, intermittent hypoxia, hypercapnia and fragmented sleep, resulting in intestinal barrier dysfunction. Translocation of bacteria, including their metabolites, leads to the development of many diseases and inflammatory processes. Even though, connection between sleep apnea and microbiome has a great potential, more researches need to be done. In our research, we analysed samples from patients from the 1st Department of Neurology, Comenius University and University Hospital Bratislava. We focused on the identification of microorganisms, mainly bacteria, in the gut microbiome of patients and controls using massively parallel sequencing techniques.

Keywords: gut microbiome; obstructive sleep apnea; dysbiosis; next-gen sequencing

Úvod a formulácia cieľa

Črevný mikrobióm tvoria rozmanité a komplexné spoločenstvá mikroorganizmov vrátane baktérií, vírusov, archeónov, prvokov a mikroskopických húb [1]. Mikroorganizmy za priaznivých podmienok žijú v symbióze s hostiteľom. Prevalencia patogénov v porovnaní s komenzálnymi mikroorganizmami má za následok dysbiózu, ktorá je sprevádzaná zmenami diverzity a relatívnej početnosti v mikrobiálnom zložení [2]. S uvedenými zmenami koreluje aj syndróm spánkového apnoe (SA). Medzi mikrobiómom a SA existuje obojsmerná interakcia – následkom hypoxie v dôsledku príhody SA dochádza k výraznému poklesu gradientu parciálneho kyslíka v lúmene čriev. Tento pokles gradientu vedie k porušovaniu membrány črevného epitelu, čo vedie k translokáciám mikroorganizmov do krvného riečiska a k nárastu relatívnej početnosti fakultatívne a obligátne anaeróbných baktérií [3]. Mikrobiálna flóra môže mať potenciál aj pri terapii SA, nakoľko by zmena zloženia črevnej mikrofóry indukovaná probiotikami, prebiotikami, prípadne fekálnou transplantáciou mohla byť kľúčová pri liečbe SA [3].

Cieľom práce bola charakteristika a identifikácia zmien v zložení črevného mikrobiómu pacientov so spánkovým apnoe z neurologického oddelenia I. Neurologickej

kliniky LF UK a UNB v Bratislave v porovnaní so zdravými jedincami a asociácia zmien s ich potenciálnym vplyvom na zdravotné problémy, vrátane spánkového apnoe.

Materiál a metódy

Izolácia nukleovej kyseliny DNA – DNA sme vyizolovali zo vzoriek biologického materiálu (stolice) kolonkovou izoláciou izolačným kitom od výrobcu ZYMO RESEARCH. Koncentráciu izolovanej DNA sme stanovili spektrofotometricky.

Polymerázová reťazová reakcia – Amplifikovali sme bakteriálny gén *16S rRNA*. Úspešnosť amplifikácie sme stanovili elektroforézou v agarózovom géli. PCR produkty sme purifikovali prostredníctvom magnetických guľičiek a koncentráciu purifikovaných PCR produktov sme stanovili pomocou fluorometra.

Príprava DNA sekvenčných knižníc – DNA sme poštiepili pomocou transpozónu. Pripravené knižnice sme purifikovali magnetickými guľičkami AMPure XP a fluorometricky sme stanovili ich koncentráciu. Priemernú veľkosť knižníc sme stanovili čipovou elektroforézou a vzorky sme sekvenovali na platforme Illumina MiSeq (2 x 300 bp).

Analýza dát – Sekvenčné dáta sme spracovali pomocou bioinformatického nástroja Kraken. Namapované sekvencie prítomné v jednotlivých vzorkách sme porovnávali so sekvenciami uloženými v databáze Standard plus protozoa & fungi (2021), na základe čoho sme sekvencie taxonomicky zaradili.

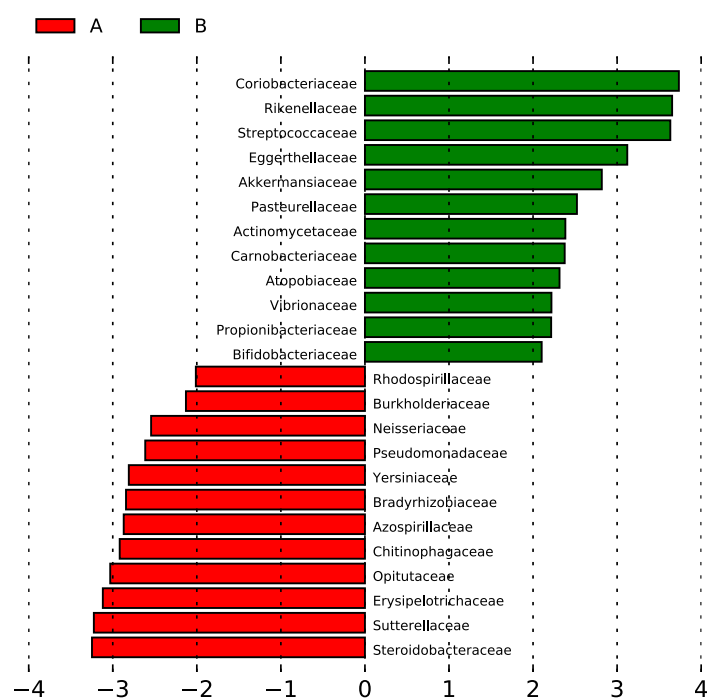
Výsledky a diskusia

Na analýzu črevného mikrobiálneho zloženia sme použili vzorky pochádzajúce od 29 pacientov so spánkovým apnoe a 30 zdravých ľudí, ktorí predstavovali kontrolnú skupinu. Vekový priemer pacientov bol 43,21 rokov, pričom priemerné BMI bolo 30,75 kg/m². Priemerný vek kontrolných jednotlivcov bol 28,65 rokov a priemerná hodnota BMI dosahovala 22,12 kg/m².

Bakteriálne komunity sme identifikovali na 6 taxonomických úrovniach – kmeň, trieda, rad, čeľaď, rod a druh. Najvyšší rozdiel v zistenom počte taxónov sme klasifikovali na rodovej a druhovej úrovni. Vyšší počet jednotlivých taxónov (413 druhov a 254 rodov) sme klasifikovali v kontrolných vzorkách. Vo vzorkách pacientov sme zaznamenali 196 jednotlivých rodov a 286 druhov, z čoho vyplýva, že u pacientov došlo k výraznému poklesu mikrobiálnej diverzity. Na taxonomickej úrovni kmeňa sme identifikovali 25 rôznych bakteriálnych kmeňov. Najpočetnejšie zastúpené v oboch skupinách boli *Firmicutes* a *Bacteroidota*, ktoré predstavovali viac ako 90 % z celkového identifikovaného zastúpenia

črevnej mikrobioty. V kontrolnej skupine sme navyše identifikovali 2 signifikantne odlišné ($p \leq 0,05$) kmene: *Actinobacteria* a *Verrucomicrobia*. V patientskych vzorkách sme klasifikovali 1 signifikantne odlišný kmeň *Planctomycetes*.

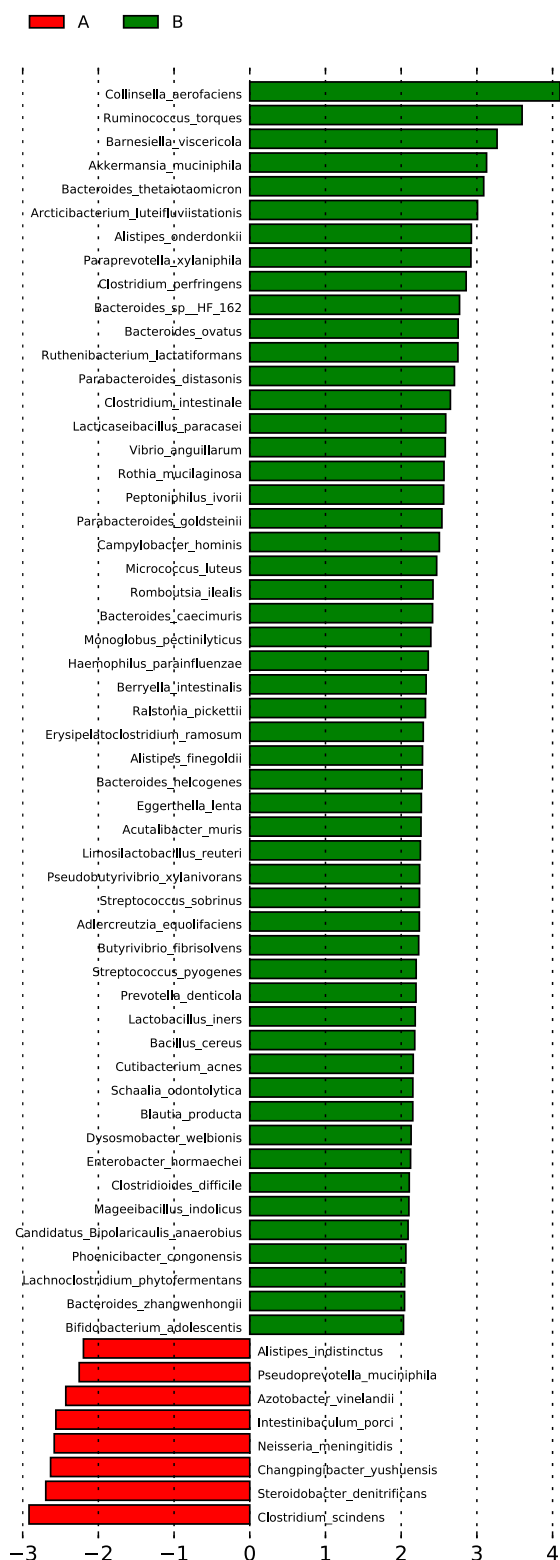
V rámci nižších taxonomických úrovní sme sa podrobnejšie zamerali na čeľaď a druh. Na úrovni čeľade sme u kontrolnej skupiny zaznamenali 126 čeľadí, na rozdiel od pacientov, u ktorých sme ich klasifikovali 105. Medzi najpočetnejšie čeľade v oboch porovnávaných skupinách patrili *Lachnospiraceae* (SA 39,66 % / CTRL 42,63 %), *Oscillospiraceae* (SA 26,26 % / CTRL 24,97 %) a *Bacteroidaceae* (SA 13,13 % / 12,25 %). Zástupcovia čeľade *Lachnospiraceae* produkujú mastné kyseliny s krátkym reťazcom, najmä butyrát, ktorý je hlavným zdrojom energie pre črevné epitelové bunky, avšak ich výskyt zvyšuje riziko vzniku obezity [3]. Identifikovali sme 24 signifikantne odlišných čeľadí. V patientskych vzorkách došlo v výraznom náraste početnosti bakteriálnych čeľadí *Erysipelotrichaceae*, *Neisseriaceae* a poklesu *Coriobacteriaceae*, *Eggerthellaceae* a *Lactobacillaceae*.



Obr. 1. Signifikantné zmeny zloženia črevného mikrobiómu u pacientov s SA (A) v porovnaní so zdravými kontrolnými jedincami (B). Vizualizácia bakteriálneho zloženia na úrovni čeľade ($p \leq 0,05$).

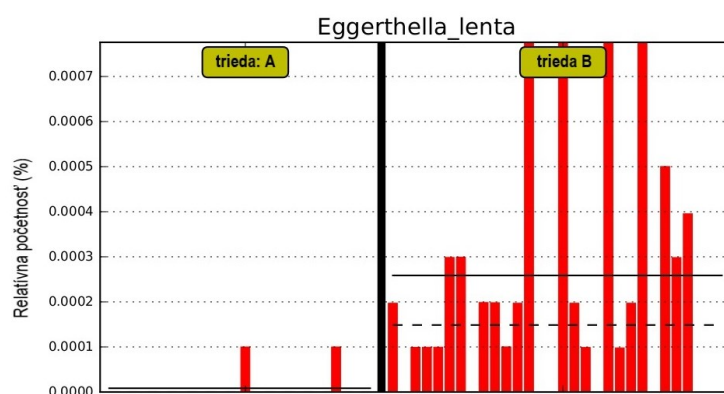
Na druhovej úrovni sme celkovo identifikovali 466 jednotlivých druhov, z ktorých bolo 413 druhov zahrnutých v kontrolných vzorkách a 286 v patientskych vzorkách. V oboch skupinách bol v najväčšej miere zastúpený *Faecalibacterium prausnitzii*. Ďalšími najviac abundantnými zástupcami boli *Prevotella copri*, prípadne *Blautia* sp. Na druhovej úrovni

sme klasifikovali 61 signifikantne odlišných druhov, medzi ktoré patria komenzálne, ale aj patogénne baktérie.



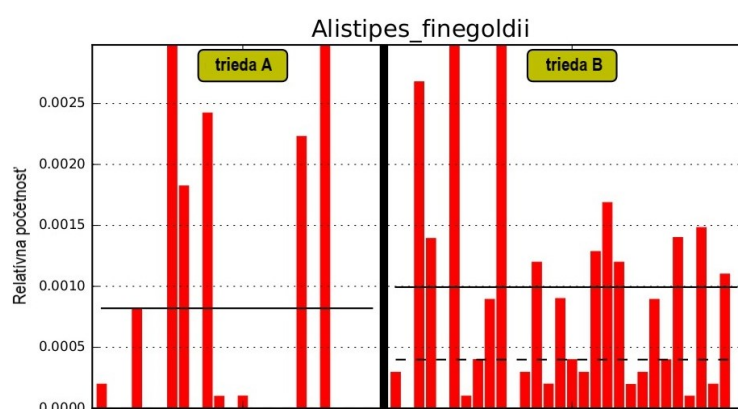
Obr. 2. Signifikantné rozdiely v zložení črevného mikrobiómu u pacientov s SA (A) v porovnaní so zdravými kontrolnými jedincami (B). Vizualizácia bakteriálneho zloženia na druhovej úrovni ($p \leq 0,05$).

Z hľadiska významných patogénov sme na druhovej úrovni identifikovali *Eggerthella lenta*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterobacter hormaechei* a takisto aj *Clostridioides difficile*, ktoré asociujú s mnohými ochoreniami. Relatívne zastúpenie uvedených baktérií bolo výrazne vyššie v kontrolných vzorkách. *C. difficile* je súčasťou normálnej črevnej mikrobioty, avšak jeho rast je potláčaný anaeróbnymi baktériami [4].



Obr. 3. Grafická vizualizácia relatívnej početnosti vybraných patogénnych bakteriálnych zástupcov. Znáznornenie zastúpenia *Eggerthella lenta* v rámci jednotlivých vzoriek. ($p \leq 0,05$; Trieda A – pacienti s SA, trieda B – kontrolné vzorky).

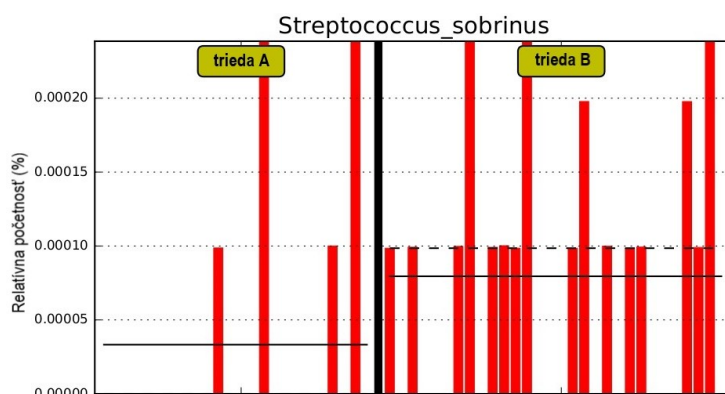
V rámci druhov, ktoré sa vyznačujú prospešným účinkom na hostiteľa sme klasifikovali *Dysosmobacter welbionis*, *Parabacteroides distasonis*, *Alistipes finegoldii* a *Ruminococcus torques*, ktorých abundancia bola v patientských vzorkách výrazne nižšia v porovnaní s kontrolnými jedincami.



Obr. 4. Grafická vizualizácia relatívnej početnosti vybraných prospešných bakteriálnych zástupcov. Znáznornenie zastúpenia *Alistipes finegoldii* v rámci jednotlivých vzoriek. ($p \leq 0,05$; Trieda A – pacienti s SA, trieda B – kontrolné vzorky).

V črevnom mikrobióme sme zaznamenali aj prítomnosť baktérií, ktoré sú súčasťou

normálnej orálnej mikroflóry - *Streptococcus sobrinus*, ktorý je častým pôvodcami zubného kazu. Zvýšené zastúpenie *S. sobrinus* sme pozorovali u kontrolnej skupiny.



Obr. 5. Vizualizácia relatívnej početnosti *S. sobrinus*. Znáznomenie zastúpenia *S. sobrinus* v porovnávaných skupinách ($p \leq 0,05$; Trieda A – pacienti s SA, trieda B – kontrolné vzorky).

Záver

V práci sme analyzovali zloženie črevného mikrobiómu pacientov so spánkovým apnoe z neurologického oddelenia I. Neurologickej kliniky LF UK a UNB v Bratislave. Zamerali sme sa na stanovenie odlišností v porovnaní s črevným mikrobiómom zdravých jedincov s cieľom asociácie daných zmien so spánkovým apnoe a s patogenézou rôznych ochorení. Črevný mikrobióm pacientov s SA sa vyznačuje celkovým poklesom mikrobiálnej flóry z hľadiska početnosti, aj diverzity. To naznačuje stav črevnej dysbiózy, asociovaný s SA. V dôsledku dysbiózy dochádza k poškodeniu črevnej epitelovej bariéry a k translokáciám baktérií spolu s ich metabolitmi, čo môže byť príčinou vzniku niektorých ochorení.

PodĎakovanie

Predložená práca vznikla aj vďaka finančnej dotácii projektu VEGA 1/0022/23.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Hodkinson B. P. Giece E. A. (2015) Adv. Wound Care. 4(1), p. 50
- [2] Blum H. E. (2017) Adv. Med. Sci. 62(2), p. 414
- [3] Mashaqi S., Gozsl D. (2019) J. Clin. Sleep Med. 15(10), p. 1517
- [4] Bien J., Palagani V., Bozko P. (2013) Advances in Gastroenterology. 6(1), p. 54

Účinnok fotodynamickéj terapie na kvasinkovú infekciu vyvolanú na modeli prepeličej chorioalantoickej membrány

Majlinda Meta, Boris Bilčík, Ivan Čavarga, Ivana Ďurišová, Mária Balážová, Mariana Máčajová

Ústav biochémie a genetiky živočíchov Slovenskej akadémie vied, v.v.i., Centrum biovied,
Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovenská republika; majlinda.meta@savba.sk

Abstract

Effect of photodynamic therapy on yeast infection induced in quail chorioallantoic membrane model
Yeasts belong to a group of heterogeneous eukaryotic organisms capable of causing infectious diseases. *Saccharomyces cerevisiae* has been shown to act as an opportunistic pathogen. A suitable model for testing the pathogenicity of microorganisms is the chorioallantoic membrane (CAM). One of the alternative options for suppressing yeast infections is photodynamic therapy (PDT). The aim of this work was to create infection on CAM surface by inoculating different concentrations of *S. cerevisiae* in YPD medium and with Cultrex® medium. We evaluated histological changes in CAM tissue after hematoxylin and eosin staining and gene expression of inflammatory cytokines using qPCR. Cultrex® appears to be unsuitable for use in yeast inoculation on CAM, as it caused tissue changes, absorbed the used photosensitizer, and prevented the yeasts from passing to deeper layers of the CAM. Conversely, YPD medium seems to be sufficient for inoculation of *S. cerevisiae* on CAM. 48 h after inoculation of *S. cerevisiae* in YPD medium, *IL-6* and *IL-8* genes were upregulated, while *IFN-α* levels decreased.

Keywords: Japanese quail CAM, *S. cerevisiae*, PDT, inflammation

Úvod a formulácia cieľa

Kvasinky patria do skupiny pomerne heterogénnych eukaryotických organizmov, ktoré sú príčinou rôznych infekčných ochorení. Kvasinky z rodu *Saccharomyces* sú známe pre svoje využitie v potravinárskom a farmaceutickom priemysle. Hoci sú v prírode široko rozšírené a vykazujú nízku virulenciu, infekcie *S. cerevisiae* sú čoraz bežnejšie a boli identifikované v 4% pozitívnych mykotických hemokultúr, najmä u imunokompromitovaných jedincov [1].

Na testovanie mechanizmov patogenity mikróbov sa ukazuje byť vhodný *in vivo* model vtácej chorioalantoickej membrány (CAM). CAM je relatívne jednoduchý, rýchly a nízko nákladový model, ktorý umožňuje skrining veľkého množstva vzoriek v krátkom čase. Jeho najväčšou výhodou je viditeľnosť, dostupnosť a rýchly rast počas vývinu embrya [2]. CAM model sa používa na skúmanie základov inváznej kapacity a penetrácie patogénov cez membránu, na predbežný skrining patogenity mikróbov, genetickej regulácie infekcie a ochranných účinkov antimikrobiálnych látok [3].

V oblasti diagnostiky a liečby infekčných ochorení sa stáva čoraz atraktívnejšou fotodynamická reakcia. Na jej spustenie sú potrebné 3 zložky: fotosenzibilizátor (PS), svetlo a kyslík. Jej princíp spočíva v systémovom alebo lokálnom podaní fotosenzitívnych látok,

známych ako fotosenzibilizátory, po ktorých nasleduje ožarovanie látok vhodnou vlnovou dĺžkou svetla [4].

Cieľom práce bolo vytvoriť model infikovaného tkaniva chorioalantoickej membrány prepelice japonskej inokuláciou kolónií *S. cerevisiae* a pomocou fotodynamickej diagnostiky určiť rozsah infekcie a pomocou fotodynamickej terapie eliminovať kvasinkovú infekciu.

Materiál a metódy

Príprava ex ovo modelu CAM: Oplodnené vajcia prepelice japonskej (*Coturnix japonica*) sme vložili do inkubátora s vypnutým otáčaním vajec (Bios Midi, Sedlčany, ČR). Na 3. embryonálny deň (ED3) sme vajíčka povrchovo dezinfikovali 70% EtOH a ich obsah sterilne preniesli do 6-jamkových kultivačných platničiek (Sarstedt, Germany) v laminárnom boxe. Po príprave ex ovo kultúry sme embryá vložili do inkubátora (Memmert, Nemecko) (37 °C a relatívna vlhkosť 50-60%) až do dňa experimentu.

Príprava inokula *S. cerevisiae*: Do tekutého YPD média (2% peptón, 1% kvasničný autolýzát, 2% glukóza) sme naočkovali kolónie *S. cerevisiae* (BY4741) a inkubovali cez noc pri 30 °C za stáleho trepania. Suspenziu sme centrifugovali 5 min pri 4400 rpm. Sediment sme rozsuspendovali v 1 ml YPD média. Bunky sme zráтали pod mikroskopom (Kvant, Slovakia). Zásobný roztok buniek sme centrifugovali 5 min pri 4400 rpm. Sediment sme rozsuspendovali s YPD médiom alebo s médiom Cultrex® (Bio-technie, USA) (1:1 s YPD médiom).

Experiment 1: Na prvú časť experimentu (vytvorenie infikovaného tkaniva CAM) sme použili 82 embryí, ktoré sme na ED8 rozdelili do 7 skupín (Tab. 1):

Tab. 1. Rozdelenie skupín v experimente 1. A – koncentrácia: $3,6 \times 10^7$ buniek/CAM, resp. 80 µl do krúžku; B – koncentrácia $6,2 \times 10^6$ buniek/CAM, resp. 80 µl do krúžku. n = 10-14.

Skupina	Spôsob inkubácie pred aplikáciou	Počet (n) embryí
Kontrola 1 – YPD médium	pri laboratórnej teplote	11
Kontrola 2 – Cultrex® (1:1 s YPD médiom)	na ľade v chladničke 2-8 °C	12
Kontrola 3 - PBS	pri laboratórnej teplote	11
YPD médium + <i>S. cerevisiae</i> (A)	2 hodiny v inkubátore pri 37 °C	12
Cultrex® + <i>S. cerevisiae</i> (A)	na ľade v chladničke 2-8 °C	12
YPD médium + <i>S. cerevisiae</i> (B)	2 hodiny v inkubátore pri 37 °C	14
Cultrex® + <i>S. cerevisiae</i> (B)	na ľade v chladničke 2-8 °C	10

Inokulácia *S. cerevisiae* na CAM a príprava vzoriek: Roztoky sme na ED8 aplikovali na povrch CAM do silikónových krúžkov (Ø10 mm) v objeme 80 µl a ďalších 48 h (do ED10)

sme embryá kultivovali. Na ED10 sme CAM fotografovali (Canon 6D II, objektív MP-E 65 mm f/2.8 Macro, Japan) v bielom svetle. Vzorky sme odobrali na histologické a molekulárne spracovanie.

Experiment 2: Na druhú časť experimentu (PDT) sme použili 68 embryí, ktoré sme na ED8 rozdelili do 4 skupín (Tab. 2):

Tab. 2. Rozdelenie skupín v experimente 2. *koncentrácia: $1,6 \times 10^7$ buniek/CAM, resp. 80 μ l do krúžku. n = 9-25.

Skupina	Spôsob inkubácie pred aplikáciou	Počet (n) embryí
Kontrola 1 – YPD médium	pri laboratórnej teplote	14
Kontrola 2 – Cultrex® (1:1 s YPD médiom)	na ľade v chladničke 2-8 °C	9
YPD médium + <i>S. cerevisiae</i> *	2 hodiny v inkubátore pri 37 °C	25
Cultrex® + <i>S. cerevisiae</i> *	na ľade v chladničke 2-8 °C	20

Inokulácia *S. cerevisiae* na CAM: Pri inokulácii kolónií *S. cerevisiae* na CAM sme postupovali rovnako, ako v predchádzajúcom experimente. Na ED10 sme CAM odfotografovali v bielom svetle a následne sme do silikónových krúžkov podali roztok hypericínu (Sigma-Aldrich, SR) v koncentrácii 2 μ g/g hmotnosti embrya (79 μ M roztok v PBS, obsah rozpúšťadla DMSO bol 0,17%) v objeme 80 μ l. Hypericín sme ako PS zvolili, pretože má výborné fotosenzibilizačné vlastnosti a pôsobí antivírusovo, antibakteriálne a protinádorovo [5]. Ako kontrolu sme podali PBS v objeme 80 μ l. Následne sme CAM fotografovali po 1 h, 3 h, 5 h a 24 h od podania hypericínu vo fluorescenčnom svetle. Hypericín sme nechali pôsobiť ďalších 24 h.

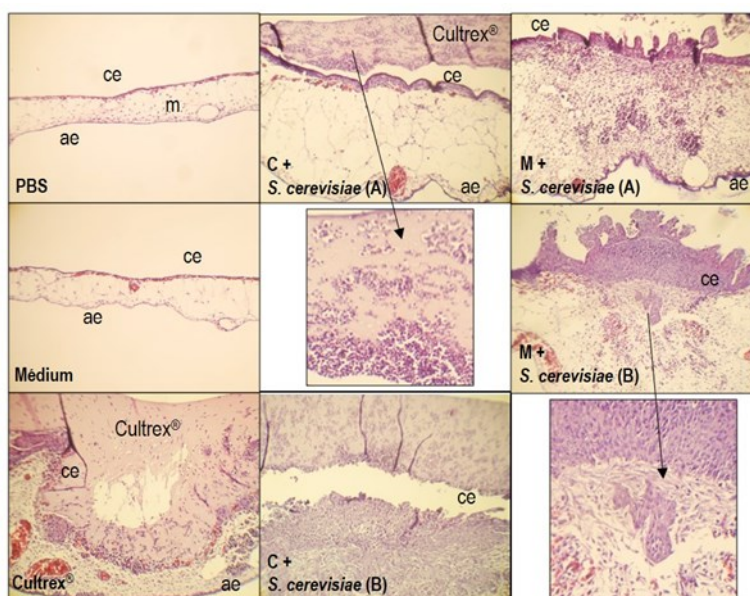
Fotodynamická diagnostika a terapia: Na ED11 (24 h od podania hypericínu) sme ošetrili oblasť vo vnútri krúžku PDT pomocou diódového lasera v trvaní 2 min (405 nm, 280 mW/cm², 4 J/cm²). Embryá sme nechali inkubovať ďalšie 2 h. Následne sme CAM v oblasti krúžku opäť fotografovali vo fluorescenčnom svetle (LED svetlo, 405 nm). Vzorky sme odobrali na histologické a molekulárne spracovanie.

Príprava vzoriek: Na histologické spracovanie sme tkanivo fixovali 4% paraformaldehydom a spracovali na 5 μ m parafrínové priečne rezy farbené hematoxylínom a eozínom. Zo zmrazených vzoriek sme vyizolovali celkovú RNA a z cDNA sme stanovili relatívnu expresiu génov *IFN- α* , *IL-6* a *IL-8* a *β -actin* (referenčný gén) pomocou qPCR. Výsledky boli štatisticky vyhodnotené v programe SigmaPlot 13 (Systat Software, CA, USA).

Výsledky a diskusia

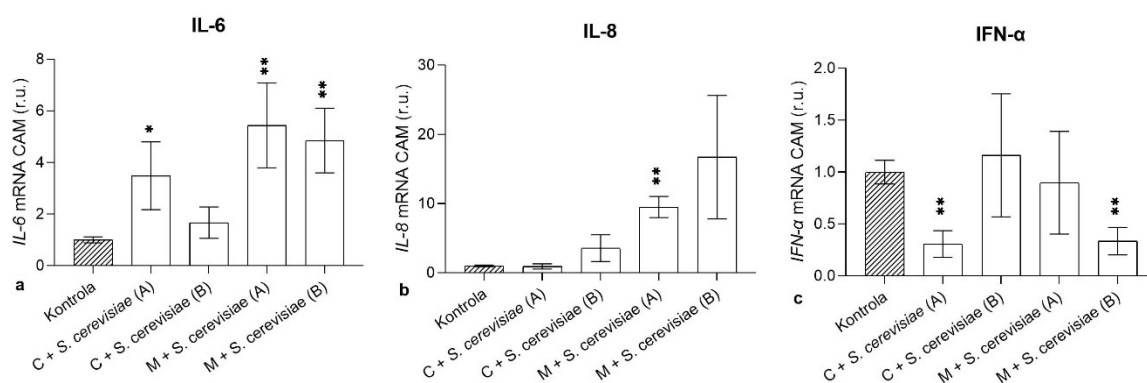
Z histologických preparátov farbených hematoxylínom (jadro) a eozínom (cytoplazma) sme po podaní Cultrex® pozorovali tvorbu amorfnej hmoty na povrchu CAM, ktorá výrazne narúšala choriónový ektoderm (Obr. 1). Pozorovali sme v nej zhluky buniek, pravdepodobne imunitné bunky CAM. Ak boli spolu s Cultrex® na CAM inokulované aj *S. cerevisiae* (v oboch koncentráciách), kvasinky zostávali v amorfnej hmote Cultrex® bez prenikania do ďalších vrstiev CAM. Cultrex® je extrakt bazálnej membrány z Engelbreth-Holm-Swarm tumoru myši (EHS), ktorý pri 37 °C gélovatí a rekonštruje bazálnu membránu. Podobne ako Matrigel, obsahuje zložky extracelulárnej matrix, hlavne proteíny ako laminín, kolagén IV, entaktín a heparín sulfát proteoglykán a plazminogénový aktivátor. Okrem toho obsahuje aj ďalšie rastové faktory, ktoré sa prirodzene vyskytujú v matrix EHS sarkómu a preto s veľkou pravdepodobnosťou ovplyvňuje aj samotné tkanivo CAM [6].

Na druhej strane, zaujímavé výsledky sme dosiahli inokuláciou *S. cerevisiae* v samotnom YPD médiu, vedúcou k výraznej proliferácii kvasiniek na povrchu CAM a ich inváznej penetrácii cez alantois až do strómy CAM 48 h po inokulácii. To viedlo k infiltrácii imunitných buniek a ich zvýšenej koncentrácii v blízkosti infekčnej lézie. Aj napriek nízkej virulencii *S. cerevisiae* bolo dokázané, že dokáže vyvolať infekciu membrány a reakciu tkaniva [7]. Avšak táto kvasinka netvorí hýfy, ktoré by boli pozorovateľné na histologických preparátoch CAM.



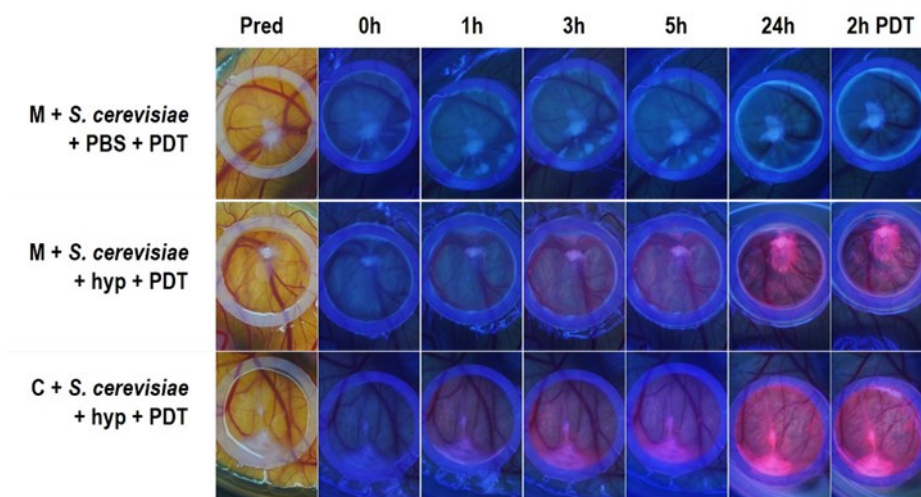
Obr. 1. Histologické preparáty CAM farbené hematoxylínom a eozínom. Zväčšenie 40x. ce – choriónový ektoderm, ae – alantoický endoderm, m – mezoderm (stróma), C – Cultrex®, M – YPD médium, *S. cerevisiae* (A) – $3,6 \times 10^7$ buniek/CAM, *S. cerevisiae* (B) – $6,2 \times 10^6$ buniek/CAM.

Pomocou qPCR sme stanovovali relatívnu génovú expresiu prozápalových cytokínov *IFN- α* , *IL-6* a *IL-8*. Analýza ukázala signifikantne vyššie hladiny expzie *IL-6* pri oboch koncentráciách kvasinkových buniek riedených v YPD médiu a vyššej koncentrácii (A) v Cultrex® (Obr. 2a). *IL-8* bol významne upregulovaný v skupine s vyššou koncentráciou (A) *S. cerevisiae* riedených v YPD médiu (Obr. 2b). Naopak hladiny *IFN- α* signifikantne poklesli pri inokulácii vyššej koncentrácie (A) v Cultrex® a nižšej (B) v YPD médiu (Obr. 2c). *S. cerevisiae* sa svojimi vlastnosťami podobá kvasinke *Candida glabrata* [8]. Pri nej bolo dokázané, že po 24 a 48 h inokulácia týchto kvasiniek na CAM významne nevlýva na expresiu *IL-8*, zatiaľ čo pri *IL-6* 24 h od inokulácie je tento gén nadexprimovaný, avšak jeho expresia klesá na minimálne hodnoty po 48 h [9].



Obr. 2. Hladiny relatívnej expzie génov a) *IL-6*, b) *IL-8* a c) *INF- α* kódujúcich zápalové cytokíny 48 h od podania látok, resp. *S. cerevisiae*. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer $\pm$ SEM; n = 5. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. C – Cultrex®, M – YPD médium, *S. cerevisiae* (A) – $3,6 \times 10^7$ buniek/CAM, *S. cerevisiae* (B) – $6,2 \times 10^6$ buniek/CAM.

Po aplikácii PS hypericínu na bunky *S. cerevisiae* a vykonaní PDT (24 h po podaní hypericínu) vo vnútri silikónového krúžku sme pozorovali, že *S. cerevisiae* úspešne naviazali hypericín, čo je pozorovateľné najmä po 24 h (Obr. 3). Podobne však aj skupina, v ktorej boli kvasinky inokulované v Cultrex®, vykazuje vysokú intenzitu fluorescencie. Preto sa zdá, že aj Cultrex® má schopnosť vychytávať tento PS. Kontrolná skupina (PBS bez hypericínu) nevykazovala žiadnu fluorescenčnú aktivitu. Na vyhodnotenie účinnosti PDT by bolo pravdepodobne vhodné zvoliť dlhší časový interval, nakoľko sme nepozorovali zmeny v počte kvasiniek a rozsahu infekcie (M + *S. cerevisiae* + hyp + PDT a C + *S. cerevisiae* + hyp + PDT).



Obr. 3. Fotografie CAM vo fluorescenčnom svetle po podaní hypericínu a vykonaní fotodynamickéj terapie (PDT) v čase poukazujú na intenzitu fluorescence hypericínu (hyp). C – Cultrex®, M – YPD médium, *S. cerevisiae* – $1,6 \times 10^7$ buniek/CAM.

Záver

Chorioalantoická membrána prepelice japonskej sa zdá byť vhodným modelom kvasinkovej infekcie. Pre potvrdenie účinnosti PDT na kvasinkovú infekciu je potrebná ďalšia analýza na molekulárnej úrovni.

PodĎakovanie

Práca bola podporená grantami VEGA 2/0042/21, VEGA 2/0030/22 a APVV 20-0129.

Zoznam použitej literatúry

- [1] da Silva F. H. A., Paco F. R., Reis E., et al. (2011) Rev. Bras. Ter. Intensiva. 23(1), p. 108
- [2] Ribatti D. (2016) Mech. Dev. 141, p. 70
- [3] Nnadi E. N., Enweani I. B., Ayanbimpe G. M. (2018) Med. Mycol. J. 59, p. 25
- [4] Kwiatkowski S., Knap B., Przystupski D., et al. (2018) Biomed. Pharmacother. 106, p. 1098
- [5] Xiao Q., Wu J., Pang X., et al. (2017) Curr. Med. Chem. 25, p. 839
- [6] Aisenbrey E. A., Murphy W. L. (2020) Nat. Rev. Mater. 5(7), p. 539
- [7] Partridge B. M., Athar M. A., Winner H. I. (1971) J. Clin. Path. 24, p. 645
- [8] Roetzer A., Gabaldón T., Schüller C. (2011) FEMS Microbiol. Lett. 314(1), p. 1
- [9] Jacobsen <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21603634/> I. D., Grosse K., Berndt A., et al. (2011) PLoS ONE 6(5), e19741

Distribúcia skóre polygénového rizika v rodinách so zápalovými črevnými ochoreniami

Jaroslav Minárik^{1,2}, Zuzana Pös^{1,3}, Mário Hlavačka⁴, Adam Hurtuk⁵, Oliver Kubička⁵, Ingrid Lojová^{1,2,3}, Natália Forgáčová^{1,2,3}, Andrea Zatlková¹, Ľudevít Kádaši^{1,2}, Juraj Gazdarica^{3,6}, Jaroslav Budiš^{3,6}, Tomáš Szemeš^{1,3}, Ján Radvánszky^{1,2,3}

¹Ústav klinického a translačného výskumu Slovenskej akadémie vied, v. v. i, Biomedicínske centrum, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika;
uktvjmin@savba.sk

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

³Univerzita Komenského v Bratislave, Vedecký park, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava, Slovenská republika

⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Fakulta matematiky, fyziky a informatiky, Mlynská dolina F1, 842 48 Bratislava, Slovenská republika

⁵Slovenská technická univerzita, Fakulta informatiky a informačných technológií, Ilkovičova 6276/2, 842 16 Bratislava, Slovenská republika

⁶Centrum vedecko technických informácií, Lamačská cesta 8/A, 840 05 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Distribution of polygenic risk scores in families with inflammatory bowel disease
We examined the distribution of PRSs among control individuals, ulcerative colitis (UC a subtype of inflammatory bowel disease, IBD) patients, and unaffected family members to assess their utility in identifying individuals at higher genomic risk for IBD/UC and selecting patients for screening of monogenic/oligogenic causes of UC. Our preliminary results demonstrate the effectiveness of PRS calculations in identifying individuals at high risk for UC, including family members who may also have increased genomic risk. Furthermore, we report a potentially novel variant (gene-phenotype association) that may contribute to familial UC in a mono-/oligogenic manner.

Keywords: polygenic risk scores, inflammatory bowel disease, family history

Úvod a formulácia cieľa

Zápalové črevné ochorenia (angl. *inflammatory bowel diseases*, IBD), zahŕňajú ulceróznou kolitídu (angl. *ulcerative colitis*, UC) a Crohnovu chorobu (angl. *Crohn's disease*, CD). Sú skupina chronických autoimunitných ochorení s komplexnou determináciou fenotypu. Etiológia IBD nie je úplne objasnená, pravdepodobne zahŕňa interakcie medzi genetickými, imunologickými, environmentálnymi a mikrobiologickými faktormi [1]. Je známe, že rodinná anamnéza zvyšuje riziko IBD, pričom sa ukázalo, že veľmi silná pozitívna rodinná anamnéza sa spája s mladším vekom pri nástupe, závažnejším fenotypom IBD, častejšie vyžadujúcim steroidnú, biologickú aj chirurgickú liečbu, v porovnaní so sporadickými prípadmi IBD [2].

Predispozícia na IBD je veľmi komplexná s komplikovanou genomickou variabilitou. Genotyp ochorenia zahŕňa prípady s monogénnymi, oligogénnymi a tiež vysoko polygénnymi formami. Segregačné a väzbové analýzy v rodinách umožnili presne určiť najčastejšie monogénne, mendelistické formy ochorenia, ktoré sú najľahšie identifikovateľné aj pomocou sekvenovania celého exómu [3]. Na druhej strane, po zahrnutí stále sa zväčšujúcich údajov z celogenómových asociačných štúdií pre komplexné fenotypy, sa začali rýchlo objavovať štúdie opisujúce výpočty skóre polygénového rizika (angl. *polygenic risk scores*, PRS) pre rôzne ochorenia, vrátane IBD [4 – 5]. Tie sľubujú nielen identifikáciu inak ešte klinicky nerozpoznaných jedincov, ktorí majú vysoké genomické riziko vzniku určitých komplexných ochorení, ale aj stratifikáciu pacientov, ktorí už majú ochorenie, s ohľadom na predpokladanú klinickú závažnosť a pravdepodobnú odpoveď na rôzne nastavenia liečby [6]. Okrem toho sa PRS môže používať ako nástroj na identifikáciu rodinných monogénnych príčin komplexných ochorení [7]. V tomto príspevku uvádzame naše zistenia o vzoroch distribúcie PRS v troch rodinách.

Materiál a metódy

Do štúdie sme zaradili 51 účastníkov stredoeurópskeho pôvodu, z toho 37 jedincov patriacich do kontrolnej skupiny, 7 pacientov trpiacich ulceróznou kolitídou a 7 prvostupňových rodinných príslušníkov troch UC pacientov, ale bez príznakov IBD. Prvá rodina pozostáva z troch členov, vrátane dvoch pacientov s UC (matka a jej syn) a jedného nepostihnutého jedinca (otec/manžel pacientov, v uvedenom poradí). Druhá rodina pozostáva zo štyroch členov vrátane jednej pacientky s UC, jej rodičov a jej sestry. Tretia rodina zahŕňa tiež štyroch členov, pacienta s UC, jeho rodičov a jeho sestru. Zaradení pacienti podpísali informovaný súhlas v súlade s Helsinskou deklaráciou.

Izolovaná DNA zo vzoriek krvi bola laboratórne spracovaná a pripravená pre sekvenovanie celého genómu službou na platforme BGI (Beijing Genomics Institute, Čína), a získané údaje boli bioinformaticky spracované podľa publikácie [8]. Vytvorené gVCF sa potom použili na výpočet PRS (cieľové údaje). Varianty súvisiace s vybranými fenotypmi (IBD a UC) boli vybrané z katalógu GWAS [9]. Parametre filtrovania boli nasledovné: 1) všetky štúdie GWAS zaznamenané v katalógu GWAS a súvisiace buď s IBD (vrátane podochorení UC a CD) alebo UC (vrátane podochorení distálnej kolitídy a pankolitídy), alebo CD (vrátane podochorení Crohnova choroba tenkého čreva, Crohnova choroba, orálna Crohnova choroba a perianálna Crohnova choroba), resp; 2) odstránenie všetkých štúdií/pozícií, pri ktorých sa zistilo, že súvisia s vybranými fenotypmi, ale v mimoeurópskych

populáciách; 3) odstránenie duplicitných záznamov, ak výber obsahoval tú istú pozíciu viac ako raz (t. j. rovnaká riziková pozícia pochádzajúca z rôznych asociačných štúdií). Na výpočet PRS sme použili lineárny váhový model.

Na vyhodnotenie rozdielov medzi skúmanými skupinami sme použili Kruskal-Wallis test (P_{K-W}) (testovanie štatistického rozdielu medzi tromi skupinami) a Mann-Whitney test (P_{M-W}) (testovanie štatistického rozdielu medzi dvojicami skupín). Pri oboch testoch sme použili umelú hranicu štatistickej významnosti 0,05. Na účely hodnotenia PRS jednotlivých pacientov a rodinných príslušníkov sme porovnali ich individuálne hodnoty PRS s rozdelením PRS v kontrolnej skupine. Distribúcia v kontrolnej skupine bola rozdelená do kvartilov (Q), pričom Q1 predstavoval najnižšie hodnoty PRS a Q4 najvyššie hodnoty PRS v populácii. Pre skrining variantov s veľkým účinkom sme použili nástroj *QLAGEN Clinical Insight* (QCI).

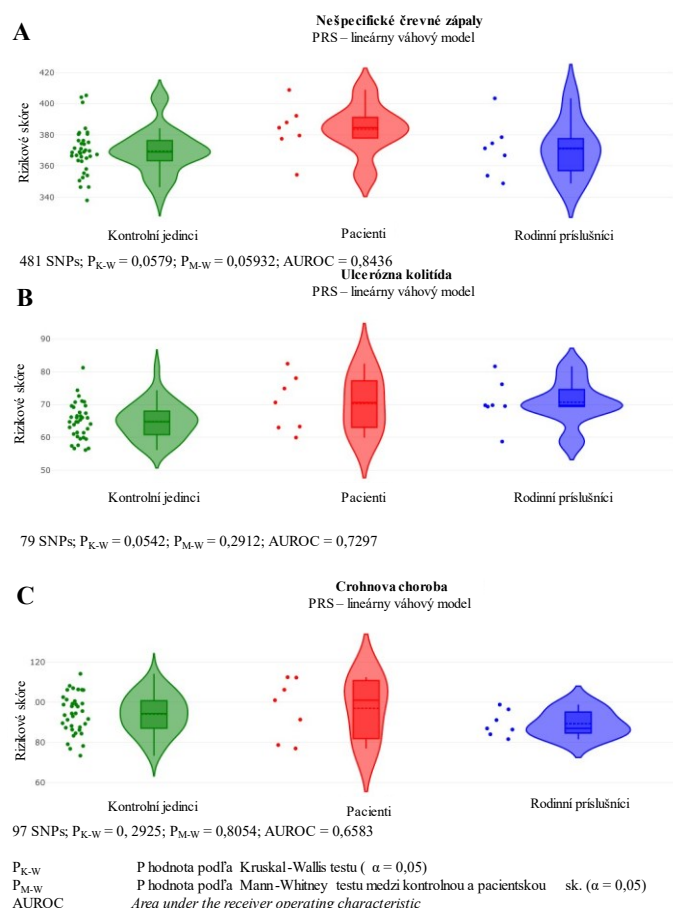
Výsledky a diskusia

Porovnali sme PRS vytvorené pomocou troch súborov genomických pozícií uvedených v databáze *GWAS Catalog*, t. j. pozícií asociovaných s IBD (vrátane IBD, UC aj CD), pozícií asociovaných len s UC a pozícií asociovaných len s CD. Tieto distribúcie PRS sme porovnali medzi jednotlivcami patriacimi do troch skupín vzoriek, t. j. kontrolnej skupiny bez hlásenej IBD, pacientov s UC a rodinných príslušníkov niektorých pacientov s UC.

Pri filtrovaní SNPs, v databáze *GWAS Catalog*, súvisiacich s IBD, sme získali súbor 481 SNPs (Obr. 1A). Pri filtrovaní pre UC, sme identifikovali 79 SNPs (Obr. 1 B) a pri filtrovaní pre CD sme získali 97 SNPs (Obr. 1C). V porovnaní s kontrolnou skupinou sa zistilo, že rozloženie PRS pacientov s UC sa líši, pri zohľadnení lokusov súvisiacich s IBD (Obr. 1A) aj lokusov súvisiacich s UC (Obr. 1B). Pri použití SNPs špecifických pre CD neboli rozdiely také výrazné, avšak niektorí pacienti dosiahli relatívne vysoké skóre PRS_{CD} (obr. 1C). Hoci ani jeden z rozdielov nebol štatisticky významný, bol viditeľný jasný a silný trend vyšších PRS u pacientov s UC. Pri hodnotení distribúcií PRS medzi kontrolnou a patientskou skupinou dosiahlo 481 lokusov asociovaných s IBD najväčšiu rozlišovaciu schopnosť ($P_{M-W} = 0,05932$; AUROC = 0,8436) V tomto prípade každý pacient s UC, okrem jedného, mal PRS_{IBD} spadajúce do Q4 distribúcie PRS kontrolnej skupiny.

Rodinní príslušníci vykazovali podobnú distribúciu PRS_{IBD} ako kontrolná skupina (Obr. 1A), zatiaľ čo PRS_{UC} rodinných príslušníkov malo skôr podobnú distribúciu ako u pacientov s UC (Obr. 1B). Naopak, pri posudzovaní PRS_{CD} sa zistilo, že rodinní príslušníci boli v porovnaní s kontrolnou skupinou posunutí k nižším hodnotám PRS, aj keď tento posun nebol štatisticky významný ($P_{M-W} = 0,9946$) (Obr. 1C).

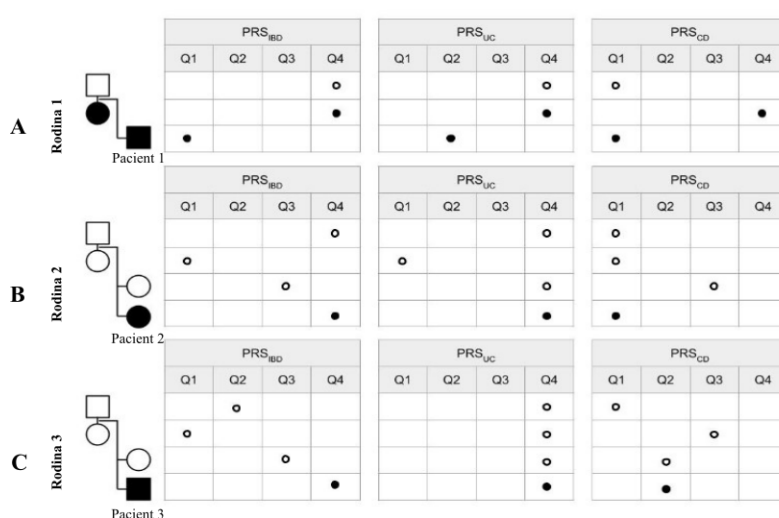
Pri hodnotení PRS medzi rodinnými príslušníkmi, v prvej rodine sú dve osoby postihnuté UC, matka a jej syn (pacient 1). Zatiaľ čo u matky je PRS spojené s IBD relatívne vysoké ($PRS_{IBD} = 387,92$; Q4), jej syn vykazuje veľmi nízke PRS ($PRS_{IBD}=354,34$; Q1). Na druhej strane, otec, ktorý údajne nemá IBD, patrí k najvyšším PRS ($PRS_{IBD}=403,40$; Q4). Pri hodnotení PRS_{UC} sa zistilo, že PRS u matky je Q4, u jej syna Q2 a opäť u otca Q4. Pri hodnotení PRS_{CD} sa zistilo, že matka spadá do Q4 a syn a otec do Q1 (Obr. 2A).



Obr. 1 Výsledky výpočtov PRS s použitím 3 súborov genomických pozícií asociovaných s IBD, UC a CD

Kvôli veľmi nízkym PRS hodnotám u pacienta 1 sme sa rozhodli uskutočniť skríning klinicky signifikantných SNPs s veľkým účinkom, ktoré môžu indikovať monogénnu (oligogénnu) formu UC v rodine 1. Pomocou nástroja QCI sa nám podarilo odhaliť niekoľko SNPs s neurčitou klinickou významnosťou (pri filtračnom nastavení “nešpecifické črevné zápaly”, ucerózna kolitída” a “Crohnova choroba”). Okrem toho sme identifikovali jeden SNP ako potenciálne klinicky relevantný. Ide o sekvenčný variant, *ZBPI*(NM_030776.3):c.3G>A (p.M1I; rs45521631), v géne *ZBPI* (angl. *Z-DNA Binding Protein 1*), ktorý sa našiel v heterozygotnom stave v genóme postihnutej matky aj syna, ale nie v genóme otca.

V druhej rodine pacientka s UC má vysokú hodnotu $PRS_{IBD} = 379,53$, Q4 a $PRS_{UC} = 78,08$, Q4. Otec má veľmi podobné $PRS_{IBD} = 378,47$, Q4 a $PRS_{UC} = 76,21$, Q4. Matka má nízke $PRS_{IBD} = 353,75$, Q1 a $PRS_{UC} = 58,71$, Q1. Sestra pacientky má o niečo menšie $PRS_{IBD} = 374,54$, Q3, avšak vysoké $PRS_{UC} = 69,71$, Q4. PRS_{CD} u rodičov a pacientky spadá do Q1, zatiaľ čo sestra pacientky má $PRS_{CD} = Q3$ (Obr. 2B). V tretej rodine má pacient s UC vysokú hodnotu $PRS_{IBD} = 384,55$, Q4 a $PRS_{UC} = 74,91$, Q4. Otec má nízke $PRS_{IBD} = 366,78$, Q2 a najnižšie $PRS_{CD} = Q1$. Matka má najnižšie $PRS_{IBD} = 348,79$, Q1, ale najvyššie $PRS_{CD} = Q3$. Sestra pacienta má relatívne vysoké $PRS_{IBD} = 371,32$, Q3, avšak podobné $PRS_{CD} = Q2$ s pacientom. Členovia rodiny 3 majú $PRS_{UC} = Q4$ podobne ako pacient 3 (Obr. 2C).



Obr. 2 Zaradenie rodinných členov 3 rodín do kvartilov (Q1-Q4) podľa distribúcie PRS kontrolnej skupiny

Počet asociovaných SNPs pri PRS_{IBD} je najvyšší spomedzi troch testovaných nastavení, pretože PRS_{IBD} sa vypočíta z pozícií identifikovaných pre IBD ako celok, ale aj pre UC a CD jednotlivo. PRS_{UC} používa genomické pozície, ktoré sú asociované len s UC, a preto je počet pozícií výrazne nižší (481 oproti 79). Zároveň sa zistilo, že pri porovnávaní rozdielov distribúcií PRS medzi patientskou a kontrolnou skupinou, je PRS_{IBD} pri rozlišovaní týchto dvoch skupín účinnejšie ako PRS_{UC} ($P_{M-W} = 0,05932$ oproti $P_{M-W} = 0,2912$). Okrem toho sme testovali aj genomické pozície asociované s CD. PRS_{CD} sa počíta z 97 SNPs a nevykazuje dostatočnú rozlišovaciu schopnosť medzi patientskou a kontrolnou skupinou ($P_{M-W} = 0,8054$). To potvrdzuje selektívny charakter PRS_{CD} , keďže naši pacienti trpia UC.

Pacienti dosiahli vysoké PRS hodnoty (Q4), s výnimkou pacienta 1, ktorý mal veľmi nízke PRS hodnoty. U pacientov s nízkymi PRSs a s rodičovskou históriou komplexných ochorení, je väčšia pravdepodobnosť výskytu monogénnej (oligogénnej) formy ochorenia [7].

Objavený variant v rodine 1, vykazuje klinickú relevantnosť hoci nie je uvedená v žiadnej z databáz. c.3G>A je *loss of function* variant, pretože postihuje iniciačný kodón *ZBPI* génu. To sa vo všeobecnosti považuje za veľmi silný dôkaz patogenity podľa ACMG klasifikácie [10], hoci monogénové ochorenia spojené s týmto génom zatiaľ neboli opísané (OMIM). Produkt génu *ZBPI* rozpoznáva vírusové nukleové kyseliny, čím sa aktivuje a interaguje s ďalšími proteín kinázami. Táto kaskáda vedie k nekrotóze, a tým sa eliminujú infikované somatické bunky [11]. Keďže klinická klasifikácia nášho variantu nie je potvrdená, navrhli sme hypotézu, kedy variant c.3G>A by mohol spôsobiť znížené množstvo produktu génu *ZBPI*, a tak ovplyvniť aktiváciu dráhy nekrotózy. Tým by mohla byť ovplyvnená reakcia organizmu na vybrané vírusové infekcie, čo teoreticky môže byť jednou z kľúčových príčin nástupu IBD.

Záver

Výsledky naznačujú, že PRS s konvenčným genetickým skríningom, určujúcim priority pre varianty s vyšším účinkom a rodinnými štúdiami, predstavuje účinnú aplikáciu. Na druhej strane, rutinná implementácia PRS stále predstavuje výzvy, ktoré vyžadujú ďalšiu štandardizáciu a automatizáciu metód pre výpočet PRS.

PodĎakovanie

Práca vznikla s podporou grantov Operačný program Integrovaná Infraštruktúra - ITMS:313011W428 a VEGA_2/0146/23.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Jarmakiewicz-Czaja S., et al. (2022) Genes (Basel). 13(12), p. 2388
- [2] Boat E., et al. (2023) Scand J Gastroenterol. 58(1), p. 20
- [3] Cardinale Ch. J., et al. (2013) World J Gastroenterol. 19(40), p. 6721
- [4] Price N. D., et al. (2017) Nat Biotechnol. 35(8), p. 747
- [5] Chen GB., et al. (2017) BMC Med Genet. 18(1), p. 1
- [6] Moustafa A., et al. (2018) Clin Transl Gastroenterol. 9(1), p. 132
- [7] Lu T., et al. (2022) Genet Med. 24(7), p. 1545
- [8] Minárik J., et al. (2022) ŠVK PRIF UK 2022. Vplyv výberu setov rizikových pozícií na výsledok skóre polygénového rizika, Bratislava, SR, p. 432
- [9] Buniello A., et al. (2019) Nucleic Acids Res. 47(D1), p. D1005
- [10] Richards S., et al. (2015) Genet Med. 17(5), p. 405
- [11] Kuriakose T., Kanneganti T. D. (2018) Trends Immunol. 39(2), p. 123

Proteome Profiling of *Phragmites australis*

Shubhi Mishra¹, Peter Baráth², Maksym Danchenko¹

¹*Plant Science and Biodiversity Center of Slovak Academy of Sciences, v. v. i., Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Akademická 2, Nitra 950 07, Slovak republic;*

shubhi.mishra@savba.sk

²*Institute of Chemistry of Slovak Academy of Sciences, v. v. i., Department of Glycobiology, Dúbravská cesta 9, Bratislava 845 38, Slovak republic*

Abstract

Common reed (*Phragmites australis*) is an emergent aquatic plant. It is widely distributed in Europe and can be used for agricultural and industrial applications in different parts of the world. Adaptability to environmental stresses and phytoremediation potential motivates further research. In this study, we showed the feasibility and optimized the method for the proteomic analysis of reed tissues. After the phenol-based isolation of proteins, digestion was done on filter columns. Next, we profiled peptides by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Around 1500 proteins were reproducibly identified among biological replicates. This study lays a foundation for deeper functional exploration of reed growing in a challenging environment.

Keywords: *common reed; ultrahigh-performance liquid chromatography; mass spectrometry*

Introduction and Objectives

Phragmites australis, known as common reed, is a robust perennial halophytic wetland grass that belongs to the *Poaceae* family. It is among the most widely distributed angiosperms. Both seeds and rhizomes make propagation possible; however, vegetative propagation is much more frequent. The plant shows high variability on the genetic and morphological levels as its ploidy ranges from 3X to 12X [1, 2]. Humans were using reed for roofing, fencing, insulation, and manufacturing cardboard and printing paper in Europe for centuries. It is recognized as cosmopolitan species due to high productivity, rapid stand-scale expansion, and the ability to evolve quickly in new ecological conditions. During the last few years, the reed was established as a potent phytoremediation plant.

The potential of practical use of the reed drew attention to the effects of different environmental stress conditions on its growth and productivity. This aquatic plant has adaptation mechanisms involving C4-like photosynthesis and membrane lipid composition adjustment [3]. The physiological and proteomic study of the reed subjected to copper stress showed that a large amount of copper was fixed in the roots, restricting metal translocation to other parts of the plant [4]. The ploidy level of reed also contributes to plasticity in different environmental conditions, including stressful ones. Tetraploid plants have more genes related to seed germination and defense against UV-B light and fungi, whereas octoploids have a

higher prevalence of thermotolerance genes [1]. In the Chernobyl region, chronic ionizing radiation significantly affects the morphology and physiology of the reed. The gradient of absorbed radiation dose rates in plants was directly proportional to the seedling abnormalities and inversely proportional to the viability rate and seedling growth rate [5]. Reed grown in Chernobyl ponds produced seeds of abnormal size and shape with a high rate of infertility [6].

Several transcriptomic studies of reed released raw data for free public access. However, transcription is not directly coupled to protein synthesis and function. Therefore, it is crucial to study the behavior of the reed in changing environment on the proteomic level. In recent years, ultrahigh-performance liquid chromatography (UHPLC) coupled with the tandem mass spectrometry (MS/MS) technique were widely used for proteome profiling due to their high depth and speed [7]. This study established a reliable and reproducible protocol for protein quantification and identification in reed leaves using UHPLC-MS.

Materials and methods

Experimental material

Reed leaves, collected from the botanical garden at Nitra, Slovakia, were used as experimental material. We used four biological replicates to test the reproducibility.

Isolation of proteins and quality control

The isolation of proteins was done by the phenol-based method with minor modifications [8]. The 500 μ L of extraction buffer (0.7 M sucrose; 0.1 M KCl; 0.2 M Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM EDTA; 1% β -mercaptoethanol; and protease inhibitors) were added to the frozen ground leaf tissue. Then, 500 μ L of Tris-buffered phenol (pH 8.0) was mixed. After centrifugation, the upper phenol phase was collected. For protein precipitation, five volumes of 0.1 M ammonium acetate in methanol were added to the phenol phase, incubated overnight at -20°C , and collected by centrifugation. The protein pellet was washed thoroughly with cold 0.1 M ammonium acetate in methanol, 80% acetone, and 70% ethanol, followed by resuspension in protein solubilizing buffer (4% SDS; 0.1 M Tris, pH 7.6; and 0.1 M dithiothreitol). The protein quantification was done by BCA assay. Then, the quality of protein extracts was controlled by 12% SDS-PAGE gel electrophoresis.

Protein digestion and purification

The proteins were digested using filter spin columns according to the described protocol with some modifications [9]. The 100 μ g aliquots of protein samples were reduced with 200 μ L of 10 mM dithiothreitol on the filter unit. After that, alkylation was done with 200 μ L of 50 mM iodoacetamide in the dark at room temperature. For protein digestion, a freshly prepared

trypsin (Promega) working solution (keeping the enzyme-to-protein ratio of 1:50) was added on the filter and incubated overnight at 37 °C in a wet chamber. After overnight digestion, the flowthroughs were acidified with 3 µL of 10% trifluoroacetic acid. The peptide purification was done using SEP-PAK C18 light cartridge (Waters). The final digested protein samples were loaded on the cartridge, and the contaminating components were washed with 0.2% trifluoroacetic acid. The samples were eluted with 80% acetonitrile and concentrated in the vacuum centrifuge. The concentration of purified peptides was measured using the droplet spectrophotometer.

Proteome profiling

Proteome profiling was done according to the published protocol [10]. The 500 ng of peptide mixtures were loaded onto a trap column (PepMap100 C18, 300 µm × 5 mm, 5-µm particle size; Dionex) and separated with an EASY-Spray C18 analytical column having integrated nanospray emitter (75 µm × 500 mm, 5-µm particle size; Thermo Fisher Scientific) on Ultimate 3000 RSLCnano system (Dionex) in a 120-min gradient (2–34% acetonitrile with 0.1% formic acid), at a flow rate 250 nL/min. Eluted peptides were sprayed directly into Orbitrap Elite mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific), equipped with EASY-Spray ion source. Spectral datasets were collected in the data-dependent mode. Precursors were measured in the mass range 300–1700 m/z with a resolution 120,000, and fragments were obtained by the high-energy collision dissociation mechanism with normalized collision energy 25 and resolution 15,000.

Preparation of reference sequences

The transcriptomic sequences of reed were downloaded from the dataset accompanying published article [11]. These sequences were translated into protein sequences using the TransDecoder program available at Galaxy Platform (<https://usegalaxy.eu/>), version 5.5.0+galaxy2 [12]. The translation was done using default settings, except the minimum protein length was adjusted to 50 amino acids. Variants with the longest open reading frames were used for the database search.

Processing of mass spectrometry data

MaxQuant v1.6.17.0 with an integrated Andromeda engine was used for processing the generated dataset [13] using the standard parameters. Based on the reverse decoy database search, the false discovery rate for peptides and proteins was 1%. Post-processing of search results was done in Perseus v1.6.15.0.

Results and discussion

Gel electrophoresis showed a reproducible pattern of well-separated protein bands

The quality of isolated proteins was checked using denaturing gel electrophoresis. We detected the complex, clear, and reproducible protein profile for all biological replicates (Fig. 1). This result indicated that the protein isolation method is suitable for reed leaves.

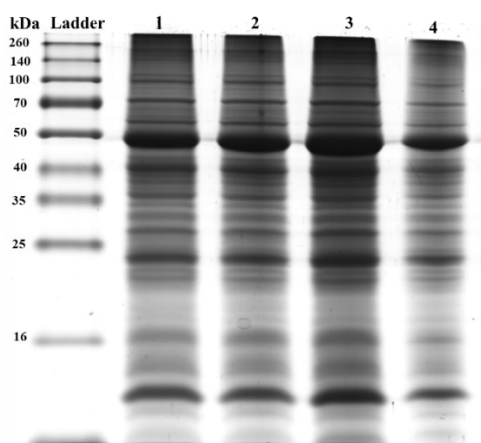


Fig. 1. Gel image of isolated proteins. A clear protein profile is visible for all four replicates (1-4) of reed leaf extracts.

Bioinformatic processing created a reference file with protein sequences

The protein sequences of the reed were not available in freely available databases. Therefore the transcriptomic sequences supporting published article [11] were translated to prepare the reference file. There were roughly 260,000 assembled cDNA sequences in the database that were translated into protein sequences by TransDecoder. Around 185,000 putative proteins had more than 50 amino acids. These translated protein sequences were used as the reference database for the protein identification search.

Numerous proteins involved in various biological processes were identified in reed leaves

The digested and purified peptides were separated through liquid chromatography, measured by tandem mass spectrophotometry, and identified by bioinformatic database search. While processing the data, an ion intensity map was generated (Fig. 2). It is a two-dimensional representation of ion signals in the LC/MS run that indicates whether there were issues during sample measurement. The ion intensity map of the reed sample run shows an absence of substantial artifacts either related to the chromatographic separation of peptides or spectra of corresponding parent ions. The darker areas that have higher intensities of the MS signals indicate higher peptide abundances. Further processing of raw data in MaxQuant paired with post-processing in Perseus allowed us to reliably and reproducibly identify roughly 1500

proteins.

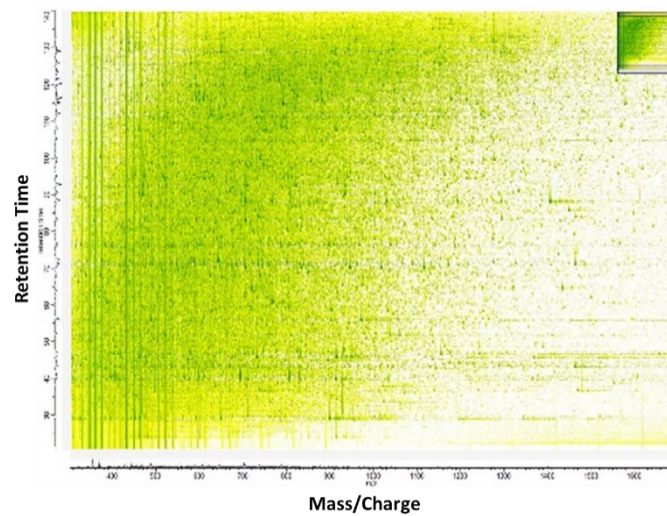


Fig. 2. Ion intensity map visualizing LC-MS run of reed proteomic sample. Retention time increases from bottom to top while the mass/charge ratio grows from left to right.

The functional annotation of the identified proteins was retrieved from the available annotation of the transcriptomic sequences [11]. The major share of identified proteins was related to the oxidation-reduction process (Fig. 3). Besides, plenty of detected proteins were related to metabolic processes, transcriptional and translation processes, and proteolysis. We were excited to see a considerable number of signaling and DNA repair-related proteins, having remarkable biological functions yet usually not so easily detectable because of their low abundance. Genome characterization of the reed revealed a high proportion of metabolic processes and transcriptional/translational regulation-related genes [14].

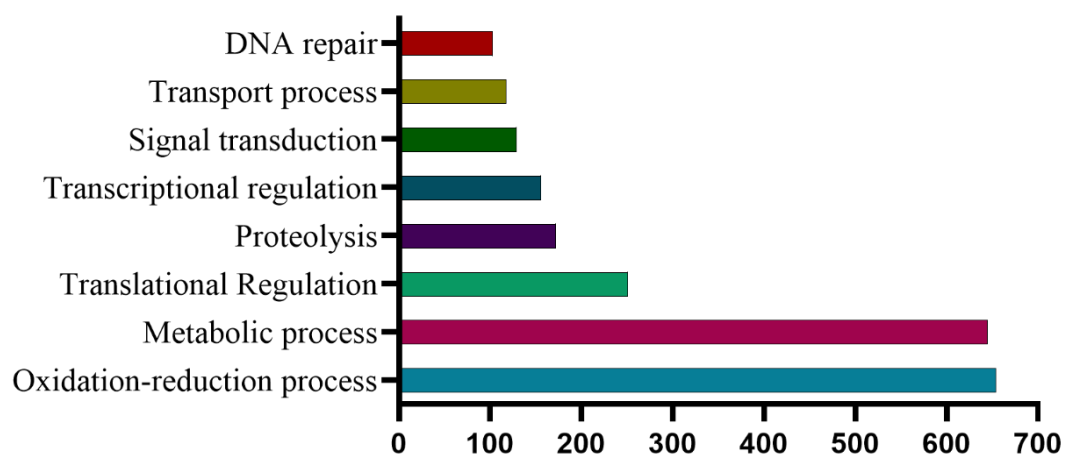


Fig. 3. The number of identified proteins, which belonged to specific biological processes.

Conclusion

The proteins were isolated from leaves of common reed, and the quality of extracts was confirmed by SDS gel electrophoresis. Subsequently, we reliably and reproducibly identified roughly 1500 proteins. The majority of these proteins were related to the oxidation-reduction processes, metabolic processes, and transcriptional-translational regulation. The optimized method will be further used to study the proteomic changes in the reed after exposure to chronic ionizing radiation.

Acknowledgement

This research was supported by projects APVV-20-0545 and VEGA 2/0106/22.

References

- [1] Wang C., Wang T., Yin M., et al. (2021) *Front. Plant Sci.* 12, p. 653183
- [2] Packer J. G., Meyerson L. A., Skálová H., et al. (2017) *J. Ecol.* 105(4), p. 1123
- [3] Li H., Lin W. F., Shen Z. J., et al. (2021) *Front Plant Sci.* 12, p. 720593
- [4] Wu J, Hu J., Wang L., et al. (2021) *Plant Biol.* 23(2), p. 351
- [5] Iavniuk A. A., Shevtsova N. L., Gudkov D. I. (2020) *J. Environ. Radioact.* 218, p. 106256
- [6] Nurgudin M. A., Shevtsova N. L., et al. (2009) *Radioprotection* 44(5), p. 941
- [7] Kuo P. C., Li Y. C., Yang M. L., et al. (2020) *Phytochem. Anal.* 31(5), p. 583
- [8] Isaacson T., Damasceno C. M., Saravanan R. S., et al. (2006) *Nat. Protoc.* 1, p. 769
- [9] Nováková S., Šubr Z., Kováč A., et al. (2020) *J. Proteomics.* 214, p. 103626
- [10] Škodová-Sveráková I., Záhonová K., Juricová V., et al. (2021) *BMC Biol.* 251
- [11] Zhang L., Chen L., Lu F., et al. (2020) *PeerJ.* 8, p. e10024
- [12] Afgan E., Baker D., Batut B., et al. (2018) *Nucleic Acids Res.* 46(W1), p. W537
- [13] Tyanova S., Temu T., Cox J. (2016) *Nat. Protoc.* 11, p. 2301
- [14] Oh D. H., Kowalski K. P., Quach Q. N., et al. (2022) *Mol. Ecol.* 31(4), p. 1142

Ovplyvňuje kremík metabolické procesy zapojené do fenylpropanoidnej dráhy v kukurici (*Zea mays* L.), ktorá je vystavená stresu z arzénu?

Adriana Mišúthová¹, Zuzana Lukačová¹, Marek Vaculík^{1,2}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyziológie rastlín, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; misuthova3@uniba.sk

²Centrum biológie rastlín a biodiverzity Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 845 23 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Does silicon affect the metabolic processes involved in the phenylpropanoid pathway in maize (*Zea mays* L.) under arsenic stress?

In recent decades, when investigating various biotic or abiotic stresses, it has been shown that the exogenous application of silicon (Si) can mitigate the impact of the given stress on globally important economic crops. To be able to effectively apply it in practice facing the problem of environmental pollution with heavy metals or semi-metals, a thorough understanding of its effects at the metabolic level is necessary. One of the most important pathways that helps the plant with various types of stress is the phenylpropanoid pathway. It serves as a rich source of metabolites in plants, is required for the biosynthesis of lignin, and serves as a starting point for the production of many other important compounds. The aim of our study is to monitor how arsenic and silicon affect processes related to root lignification, and also to monitor the activity of important enzymes such as peroxidases (G-POX) and polyphenol oxidases (PPO), which are associated with lignin polymerization.

Keywords: *abiotic stress; arsenic; lignin; maize; polyphenol oxidase; peroxidase; silicon*

Úvod a formulácia cieľa

Kukuricu siatu (*Zea mays* L.) zaraďujeme po ryži a pšenici medzi najviac pestované a konzumované obilniny [1]. Ako ostatné rastliny, aj tento druh čelí mnohým výzvam spojeným s jej sesilným spôsobom života. Jedným z významných kontaminantov pôd je polokov arzén (As). Jeho toxicita je problém, ktorý je potrebné riešiť či už z hľadiska ľudského zdravia, alebo aj z pohľadu poľnohospodárskej výroby v mnohých oblastiach sveta. Vo viacerých výskumoch sa dokázal negatívny vplyv As na kukuricu na anatomickej, morfologickej, molekulárnej či biochemickej úrovni [2, 3]. Okrem toho je rizikom pre človeka, a to z hľadiska jeho zapojenia do potravinového reťazca. Je potrebné objasniť mechanizmus jeho toxicity a tiež nájsť možnosti aktivácie obranných mechanizmov bez zníženia poľnohospodárskej produkcie, od ktorej sme závislí. Kukurica je známa svojou schopnosťou prijať do podzemných aj nadzemných pletív kremík (Si). Ten sa vo viacerých štúdiách ukázal ako vhodný prvok na zmiernenie viacerých druhov stresu [2, 4].

Lignín je dôležitou súčasťou sekundárnych bunkových stien v rastlinných bunkách, pričom pomáha udržiavať integritu celulózo-pektínovej matrix, ktorá dodáva rastline pevnosť. Jeho výskyt v bunkových stenách je kľúčovým aspektom ich vlastností a evolúcie

suchozemských rastlín [5]. Množstvo a zloženie lignínu sa líši medzi taxónmi, typmi buniek a jednotlivými vrstvami bunkovej steny a ovplyvňujú ho tiež vývinové a environmentálne podnety. Lignín je fyzikálne a chemicky heterogénny materiál a jeho štruktúrna rozmanitosť vyplýva hlavne z kombinácie troch derivátov fenypropánu, známych ako monolignoly/monoméry (H, G a S podjednotky), ktoré vznikajú v cytoplazmatickom priestore. Akonáhle sú lignínové monoméry transportované do apoplazmatického priestoru, podliehajú oxidácii, ktorá je sprostredkovaná lakázami a/alebo peroxidázami za vzniku voľných radikálov, ktoré sa následne spontánne polymerizujú na lignín [6]. Peroxidázy sa okrem oxidácie lignínových monomérov podieľajú aj na antioxidačnej obrane rastliny tým, že ako oxidant využívajú peroxid vodíka, ktorý tak súčasne redukuje na vodu [7, 8]. Metabolizmus bunkových stien, podobne ako peroxidázy, ovplyvňujú aj ďalšie enzýmy, napr. polyfenol oxidázy (PPO), ktoré prispievajú k polymerizácii fenolických látok v tomto priestore.

Pretože lignín, podobne ako Si, dodáva bunkovým stenám tuhosť, mechanickú pevnosť a pomáha rastline odolávať voči rôznym druhom stresov, môžeme predpokladať, že ukladanie Si a lignínu môžu byť v rastlinách koordinovane regulované. Cieľom našej štúdie je preto sledovať ako As a Si pôsobia na procesy späté s lignifikáciou a rovnako sledovať aktivitu dôležitých enzýmov, ako sú peroxidázy (guajakol peroxidáza, G-POX) a polyfenol oxidázy (PPO), ktoré sú spojené s polymerizáciou lignínu, resp. fenolických látok, a to v rôznych typoch koreňov mladých rastlín kukurice. Hlavným modelovým organizmom budú dva hybridy kukurice siatej, Luciana a Tweeter, ktoré sa od seba odlišujú v tolerancii voči suchu (Tweeter ako odolný a Luciana ako senzitívny hybrid).

Materiál a metódy

V našich experimentoch sme použili 3-dňové klíčence kukurice siatej (hybridy Luciana a Tweeter) pestované v hydroponickom Hoaglandovom živnom roztoku [9] 10 dní v kontrolovaných podmienkach kultivačnej miestnosti pri teplote 25/23 °C deň/noc, 60 % vlhkosti vzduchu, pri 16 h fotoperióde a intenzite žiarenia $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, kde na 1 liter roztoku prislúchali 4 rastliny. V rámci experimentu sme pracovali s nasledovnými 6 variantmi: kontrola (C), kremíkový variant (Si 2,5 mM), arzénové varianty s 2 rôznymi koncentráciami (As75 μM a As150 μM) a arzénovo-kremíkové varianty (As75 μM + Si 2,5 mM a As150 μM + Si 2,5 mM). Arzén sa do roztoku pridával vo forme anorganickej soli $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma) a Si vo forme roztoku kremičitanu sodného Na_2SiO_3 (Sigma). Pomocou zriedenej HCl (1 : 1) alebo KOH sme upravovali pH v roztokoch na hodnotu 6,2. Z rastlinného materiálu sme 10. deň kultivácie odoberali koreňovú sústavu, ktorú sme následne

rozdělili na hlavný koreň, primárne adventívne korene a nodálne korene, ktoré sme použili v nasledujúcich analýzach.

Na stanovenie aktivít polyfenol oxidázy (PPO) a guajakol peroxidázy (G-POX) sme si najprv určili celkový obsah rozpustných proteínov, kde sme postupovali podľa protokolu Bradford [10]. Proteíny boli vyizolované z približne 15-tich rastlín pre každý variant. Aktivitu PPO sme stanovili spektrofotometricky podľa Kar a Mishra [11] a aktivitu G-POX podľa Frič a Fuchs [12].

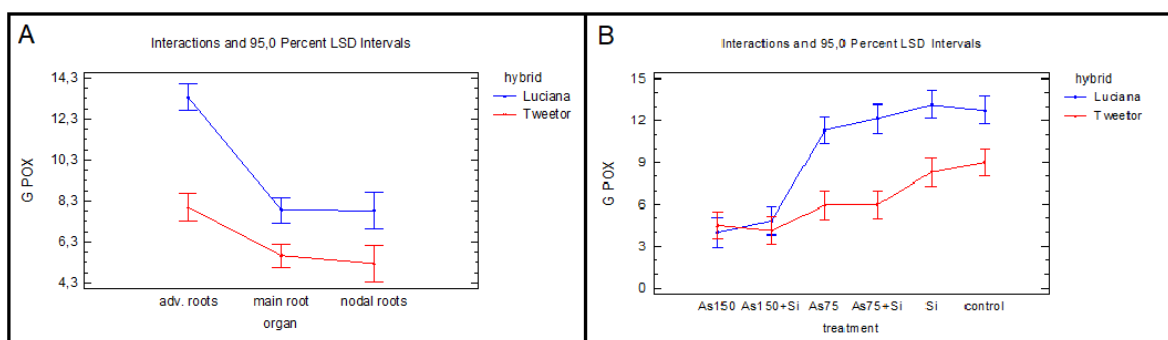
Na spektrofotometrickú kvantifikáciu lignínu sme použili acetyl bromidovú metódu, kde sme postupovali podľa protokolu Barnes a Anderson [13]. Na celkovú analýzu sa použilo od 100 do 150 rastlín v závislosti od variantu.

Výsledky sme štatisticky spracovali a vyhodnotili v programoch Microsoft Excel (Office 365) a STATGRAPHICS Centurion XV (Statgraphics Technologies, verzia 15.2.05). Všetky pokusy a analýzy sme opakovali minimálne trikrát. Na základe štatistických analýz (multifaktorová Anova, LSD test) sme vyhodnotili preukaznosť rozdielov vo výsledkoch medzi jednotlivými variantmi na hladine preukaznosti 5 %.

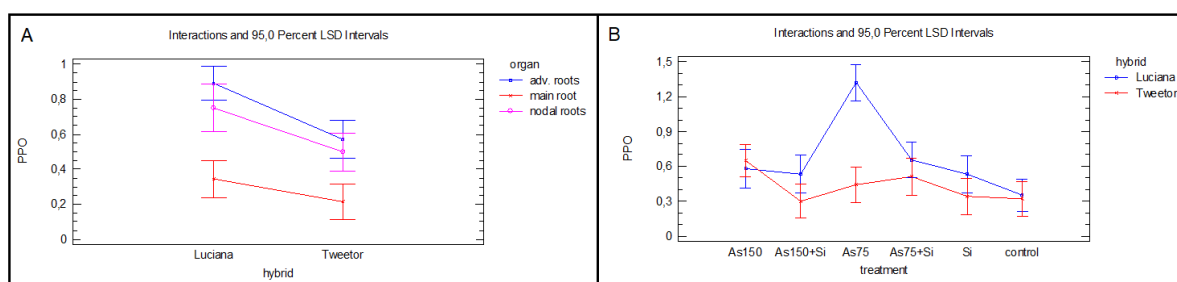
Výsledky a diskusia

Peroxidázy (G-POX) a polyfenol oxidázy (PPO) sa podieľajú na oxidácii a polymerizácii fenolových zlúčenín, ktoré ďalej vytvárajú komplexné polyméry lignínu [14, 15] v sekundárnych bunkových stenách. Výsledky sledovania aktivity G-POX (Obr. 1.) v jednotlivých koreňoch v dvoch hybridoch kukurice poukazovali na vyššiu aktivitu v primárnych adventívnych koreňoch. Zároveň vidíme, že na sucho citlivejší hybrid Luciana, reagoval pri miernom strese (As75) zvýšením aktivity G-POX signifikantne viac, v porovnaní s tolerantnejším hybridom Tweektor (Obr. 1B).

Podobné výsledky vidíme aj pri sledovaní aktivity PPO (Obr. 2.), kde opäť hybrid Luciana vykazuje signifikantne vyššiu aktivitu oproti hybridu Tweektor. Zároveň aj tu vidíme, že v rámci architektúry koreňov, najvyššia aktivita bola práve v primárnych adventívnych koreňoch. V prípade najvyššieho stresu, As150, vidíme, že Si signifikantne vplýval na zvýšenie aktivity enzýmu PPO (Obr. 2B).

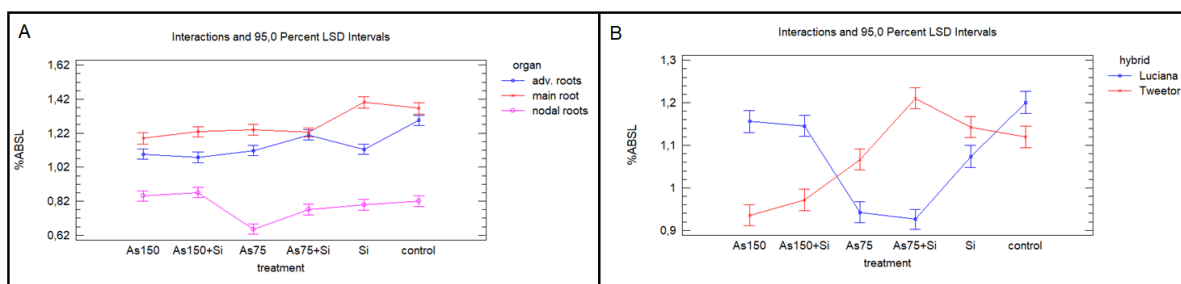


Obr. 1. Interakčný plot multifaktorovej Anovy s LSD intervalmi predstavujúci aktivitu G-POX v hlavnom, primárnom adventívnom a nodálnom koreni kukurice satej (hybridy Luciana a Tweektor) po 10 dňovej kultivácii.



Obr. 2. Interakčný plot multifaktorovej Anovy s LSD intervalmi predstavujúci aktivitu PPO v hlavnom, primárnom adventívnom a nodálnom koreni kukurice satej (hybridy Luciana a Tweektor) po 10 dňovej kultivácii.

Poslednou analýzou bolo kvantitatívne stanovenie lignínu pomocou acetyl bromidovej metódy, ktorá je v rámci metód stanovovania lignínu najpresnejšia a s najvyšším výťažkom lignínu [16]. Na obrázku 3A vidíme, že najviac lignínu sa vyskytovalo v hlavnom koreni a najmenej v nodálnych koreňoch. To môže byť spôsobené vekom koreňa, keďže nodálne korene sú najmladšie a naopak, hlavný koreň sa vyvíja ako prvý a tým pádom je v ňom aj najviac diferencovaný. Čo sa hybridu týka, pri miernejšom strese (As75) bol vyšší stupeň lignifikácie pri tolerantnom hybride Tweektor (Obr. 3B), naopak pri vysokom strese (As150) vidíme pri hybride Luciana signifikantné zvýšenie. Kremík nabudil lignifikáciu len pri miernejšom strese (As75) v tolerantnom hybride.



Obr. 3. Interakčný plot multifaktorovej Anovy s LSD intervalmi predstavujúci kvantitívne stanovenie obsahu lignínu vyjadrené v % v hlavnom, primárnom adventívnom a nodálnom koreni kukurice sietej (hybridy Luciana a Tweeter) po 10 dňovej kultivácii.

Záver

Cieľom našej práce bolo sledovať dva hybridy kukurice, ktoré sa odlišovali vo zvýšenej tolerancii na sucho a ako ich korene reagujú na exogénnu aplikáciu kremíka pri arzénovom strese. Zamerali sme sa na kvantifikáciu lignínu a s ním späté aj dôležité enzýmy ako sú G-POX a PPO. Z výsledkov je zrejmé, že v 10. dni kultivácie vykazoval vyššiu aktivitu obidvoch sledovaných enzýmov citlivý hybrid Luciana, a to v primárnych adventívnych koreňoch v miernom strese z As, zatiaľ čo v hybride Tweeter boli v tomto prípade aktivity enzýmov nižšie. Na sucho citlivejší hybrid Luciana má oproti tolerantnejšiemu hybridu Tweeter zvýšené aktivity enzýmov vedúcich k obrannej reakcii. Fenotyp a prežívanie hybridu Tweeter však v našom pokuse jasne poukazoval na lepšiu rast tohto tolerantného hybridu. V hybride Tweeter vidíme vyšší obsah lignínu, teda produktu fenypropanoidnej dráhy, na 10. deň kultivácie. K zvýšeniu aktivít enzýmov teda pravdepodobne uňho došlo skôr ako v hybride Luciana.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla aj vďaka podpore Grantu Univerzity Komenského č. UK/190/2022 a rovnako aj bola súčasťou riešenia grantov podporených Agentúrou pre podporu výskumu a vývoja č. APVV-17-0164 a APVV SK-CN-21-0034, ako aj grantu podporeného grantovou agentúrou MŠVVaŠ č. VEGA 1/0472/22 a tiež súčasťou riešenia medzinárodného projektu COST CA19116.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Arika B., Ozfidan-Konakci C., Yildiztugay E. et al. (2022) Environ. Pollut. 292, p. 118389
- [2] Mišúthová A., Slováková Ľ., Kollárová K., et al. (2021) Plant. Physiol. Bioch. 168,

p. 155

- [3] Stoeva N., Berova M., Zlatev Z. (2004) *Biologia Plantarum*. 47, p. 449
- [4] Bathoova M., Bokor B., Soukup M. et al. (2018) *Plant. Pathol.* 67, p 1891
- [5] Weng J. K., CHapple C. (2010) *New. Phytol.* 197, p. 273
- [6] Meents M. J., Watanabe Y., Samuels A. L. (2018) *Ann. Bot.* 121, p. 1107
- [7] Maciel M. J. M., Castro E Silva A., Ribeiro, H. C. T. (2010) *Electron. J. Biotechn.* 13, p. 14
- [8] Awan I. Z., Tanchoux N., Quignard, F. et al. (2019) Heterogeneous catalysis as a tool for production of aromatic compounds from lignin. In: Albonetti S., Perathoner S., Quadrelli E. A. ed(s.) *Horizons in Sustainable Industrial Chemistry and Catalysis*, Elsevier, Netherlands, p. 257
- [9] Hoagland D. R., Aarmon D. I. (1950) *Calif. Agric. Exper. Stat.* 347, p. 1
- [10] Bradford M. M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, p. 248e
- [11] Kar M., Mishra D. (1976) *Plant. Physiol.* 57, p. 315
- [12] Frič F., Fuchs W. H. (1970) *Phytopathology* 67, p. 161
- [13] Barnes W. J., Anderson C. T. (2017) *Bio-protoc.* 7, p. e2149
- [14] Fleck A. T., Nye T., Repenning C. et al. (2011) *J. Exp. Bot.* 62, p. 2001
- [15] Vogt T. (2010) *Mol. Plant.* 3, p. 2
- [16] Moreira-Vilar F. C., Siqueira-Soares Rde. C., Finger-Teixeira A. et al. (2014) *PloS One* 9, p. 10

Príprava expresného systému na báze kvasinky *Candida utilis* s vylepšeným procesovaním sekrečného signálu

Kristína Mižáková, Adriána Dusíková, Sabína Houdeková, Lea Lukáčová, Bronislava Martinková, Erik Mokroš, Timotej Šándor, Berenika Tulipánová, Ján Krahulec

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
mizakovak@icloud.com

Abstract

Construction of yeast *Candida utilis* expression system with improved secretory signal processing
Secretory signals are routinely used in heterologous protein production, but for some applications, they have to be precisely removed. This removal is usually done *in vitro* after isolation from the medium. The goal of our study is to construct *Candida utilis* expression system in which the secretory signal will be removed in the cells *in vivo*. This can be achieved by integrating the human enterokinase light chain into the yeast Golgi apparatus using the transmembrane domain on the C-terminus. We created plasmid pGE114 containing enterokinase with a transmembrane domain and we integrated it into the yeast genome. We also tested the activity and localization of enterokinase.

Keywords: yeast; *Candida utilis*; enterokinase; heterologous expression; secretion

Úvod a formulácia cieľa

Kvasinky ako eukaryotické organizmy sú schopné post-translačných úprav a poskytujú aj „folding“ proteínov. Zároveň však prinášajú aj výhody typické pre prokaryoty (rýchly rast, jednoduchá kultivácia, prosté genetické manipulácie). Z pohľadu získavania proteínov je prínosom schopnosť kvasiniek produkovať proteíny do média [1].

Kvasinka *Candida utilis* okrem spomínaných výhod prináša aj ďalšie. Na rozdiel od iných zástupcov rodu *Candida* prekladá kodón CUG v súlade so štandardným genetickým kódom ako leucín [2-3]. Ďalej patrí do skupiny „crabtree negative,“ a teda z cukrov netvorí etanol [4]. Pre prácu s akýmkoľvek organizmom je prínosné vedieť jeho ploidiu a pre túto kvasinku bola objasnená jej tetraploidia [5].

Enterokináza (EK) je serínová proteáza, ktorá štiepi peptidovú väzbu na C-konci lyzínu v rozpoznávacej sekvencii štyroch kyselín asparágových a lyzínu (DDDDK). Toto štiepenie je veľmi špecifické a nezanecháva na cieľovom proteíne žiadne nadbytočné aminokyseliny. Jedná sa o heterodimérnu molekulu pozostávajúcu z ťažkého (82 – 140 kDa) a ľahkého (35 – 62 kDa) reťazca. Katalytickú jednotku enterokinázy predstavuje práve jej ľahký reťazec [6-7].

Cieľom našej práce je skombinovať vyššie uvedené výhodné vlastnosti kvasinky a enterokinázy vo vytvorení expresného systému. V tomto systéme bude ľahký reťazec ľudskej enterokinázy ukotvený do membrány Golgiho aparátu kvasinky prostredníctvom

transmembránovej domény na jej C-konci, tak aby jej N-koniec kritický pre aktivitu zostal voľný. V prípade produkcie heterológneho proteínu do média v tomto expresnom systéme bude dochádzať k exaktnému odštepovaniu sekrečného signálu už pred samotnou sekréciou do média. Zabezpečené to bude pridaním rozpoznávacej sekvencie pre enterokinázu medzi sekrečný signál a cieľový proteín. Vytvorením takéhoto expresného systému predídeme nákladnému odstraňovaniu sekrečných sekvencií *in vitro*, ktoré v mnohých prípadoch nie je úplne presné a na proteíny sú ponechané nadbytočné aminokyseliny.

Materiál a metódy

Tabuľka 1 sumarizuje použité kmene spolu s plazmidovými vektormi, tabuľka 2 predstavuje prehľad použitých enzýmov a tabuľka 3 zas použitých primerov.

Kmene a plazmidové vektory

Tab. 1. Použité bakteriálne a kvasinkové kmene, plazmidové vektory, ich charakteristika a zdroj.

Názov	Charakteristika	Zdroj
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F ⁻ ϕ80lacZZ ΔlacZYA-argF) U196 endA1 recA1 hsdR17 (rk ⁻ , mk ⁺) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 phoA	Invitrogen
<i>Candida utilis</i> CuF	Δ _{aglc} loxP	[8]
pGE123	18SrDNA, pGAP, P EM7, Inv, Kex2, Ste13, EK, 6x His, TD, GLC TT, ori, loxP, CYC1 TT, Zeo, P EM7, P TEF1	KMB
pGE124	18SrDNA, pGAP, Inv, Kex2, Ste13, EK, 6x His, TD, GLC TT, ori, loxP, CYC1 TT, Zeo, P EM7, P TEF1	KMB
pGE114	18SrDNA, pGAP, Inv, EK, 6x His, TD, GLC TT, loxP, P TEF1, P EM7, Zeo, CYC1 TT, loxP, ori	Táto práca

Enzýmy

Tab. 2. Použité enzýmy, ich typ, názov a zdroj.

Typ	Názov	Zdroj
Restrikčné endonukleázy	<i>SalI</i> -HF, <i>SnaBI</i> , <i>RsrII</i>	New England Biolabs
DNA polymerázy	<i>Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase</i> , <i>KAPA2G Fast Ready Mix with Dye</i>	New England Biolabs, Kapa Biosystems
DNA ligáza	T4 DNA ligáza	New England Biolabs
Iné	<i>Shrimp</i> alkalická fosfatáza, Enterokináza (EKMax [™])	New England Biolabs, Invitrogen

Primery

Tab. 3. Primery použité na PCR reakcie.

Názov	Použitie	Sekvencia
SnaBI-TC-TD-E	Amplifikácia inzertu pre vytvorenie plazmidu pGE114	GGGGTACGTATCTTACAAGACTAACGTGTAGACACCA GC
InvKexEk		cAGcTTgGTTGATagCAGCTTGGAGAAGAGAATCGTCGG TGGTAGCAACGCTAAGGAAG
InvKex		GATCAAGAgGATATCAAGAGctTgACcATGAACACcAGcTT gGTTGATagCAGCTTGGAGAAGAGA
SalIInv		GCCAGTCGACATGaGCTTGACcAAgGATGTGtagcGAGGAtC AAGAgGATATCAAGAGctTg
18S F5	Overenie integrácie plazmidu pGE114 do chromozómu kvasinky	CCCTAACCAAAGGATAGTTATCTGG
18S R2		TAAGCCATTCAATCGGTAGTAGCG
OvInt pGAP R		GTTGTCTTTGATGTCGCTTTGTGGG
OvInt TEF F		GCTATGGTGTGTGGGATAACTTCG

Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

V práci sme používali 2 typy PCR reakcií. Prvý typ sme používali na vytvorenie inzertu pre konštrukciu plazmidu pGE114. Na reakciu sme použili *Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase* a prebiehala v objeme 50 µl. Druhý typ reakcie slúžil na overenie integrácie enterokinázového génu do chromozómu kvasinky. V tomto prípade reakcia prebiehala v analytickom objeme 10 µl a použili sme *KAPA2G Fast Ready Mix with Dye*.

Konštrukcia plazmidu pGE114

Ako vektor sme použili plazmid pGE124 štiepený restriktčnými endonukleázami *SalI*-HF a *SnaBI*. Po overení štiepenia agarózovou elektroforézou sme ho defosforylovali alkalickou fosfatázou. Inzert sme pripravili PCR reakciami. Najprv sme ako templát použili plazmid pGE123 a primery SnaBI-TC-TD-E. Následne sme tento fragment predlžovali a teda sme ho použili ako templát do druhej PCR reakcie s primermi SnaBI-TC-TD-E a InvKex. Aj druhý fragment sme opäť predĺžili pomocou tretej PCR reakcie a primerov SnaBI-TC-TD-E a SalIInv. Po prečistení vektora a inzertu sme ich ligovali v molárnom pomere 1:5 cez noc pri laboratórnej teplote. Následne sme ligačnou reakciou transformovali bakteriálne bunky DH5α.

Transformácia

Na transformáciu sme používali elektroporátor *GenePulser (BioRad)*. Elektroporácia bakteriálnych buniek prebiehala pri parametroch: 25 µF kapacitancia, 2,5 kV napätie a 200 Ω odpor. Pre bakteriálne bunky sme používali 50 – 100 ng DNA. Parametre pre transformáciu kvasinkových buniek sme použili nasledovné: 25 µF kapacitancia, 1,5 kV napätie a 600 Ω

odpor. Pre účely elektroporácie kvasinkových buniek sme používali 5 µg linearizovanej plazmidovej DNA restriktčnou endonukleázou *RsrII*.

Dot-blot analýza

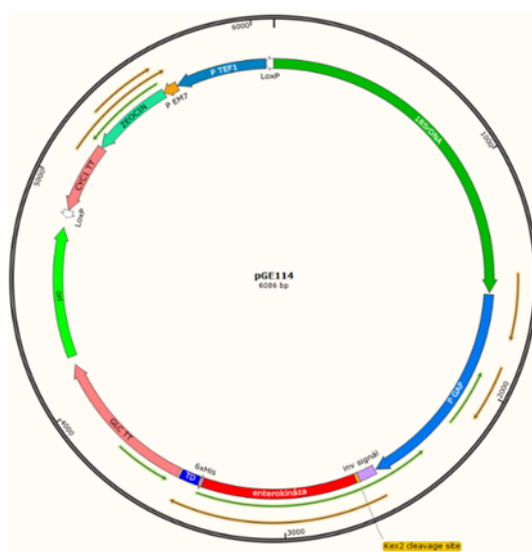
Vzorky z média, cytoplazmy, bunkových kompartmentov spolu s pozitívnu a negatívnu kontrolou sme naniesli v objeme 2 µl na polyvinylidéndifluorodovú membránu a nechali vsiaknuť. Potom sme ju inkubovali v roztoku primárnej (*Mouse anti-His*, *Invitrogen*) a následne aj značenej sekundárnej protilátky (*Goat anti-Mouse*, *Sigma*).

SDS-PAGE elektroforéza

Vzorky sme zmiešali so substrátom, ktorým bol fúzny proteín tioredoxín-dermcidín (Trx-DCD) so štiepnym miestom pre enterokinázu v pomere 1:4 a inkubovali 1 hodinu pri teplote 37°C. Následne sme ich separovali v 16% géli pri parametroch: 40 mA a 300 V. Ako štandard molekulových hmotností sme použili *NovexTM Sharp Pre-Stained Protein Standard* (*Invitrogen*).

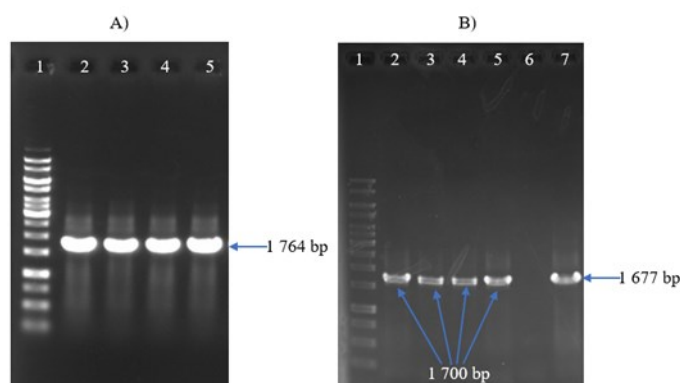
Výsledky a diskusia

Skonstruovali sme plazmid pGE114, ktorý slúžil na ukotvenie EK do chromozómu kvasinky, nakoľko obsahuje gén pre ľahký reťazec ľudskej EK spolu s transmembránovou doménou odvodenou od transmembránovej domény Kex2 proteázy. Jeho správnosť sme overili štiepením restriktčnými endonukleázami *SalI*-HF a *SnaBI* a taktiež sekvenovaním. Mapa vytvoreného plazmidu je znázornená na obrázku 1.



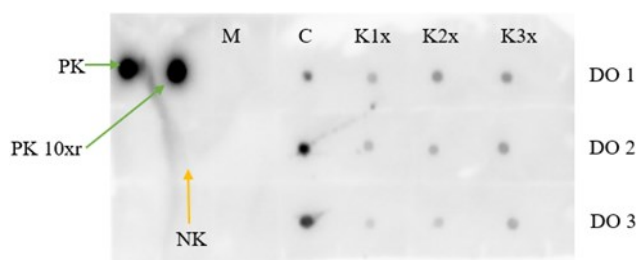
Obr. 1. *In silico* mapa plazmidu pGE114.

Po jeho linearizácii restriktčnou endonukleázou *RsrII* sme ním transformovali kvasinkové bunky CuF. Následne sme izolovali chromozomálnu DNA a tú sme použili ako templát pre overovaciu PCR. Podarilo sa nám overenie integrácie plazmidu do chromozómu kvasinky vo všetkých 4 vybraných klonoch (Obr. 2).



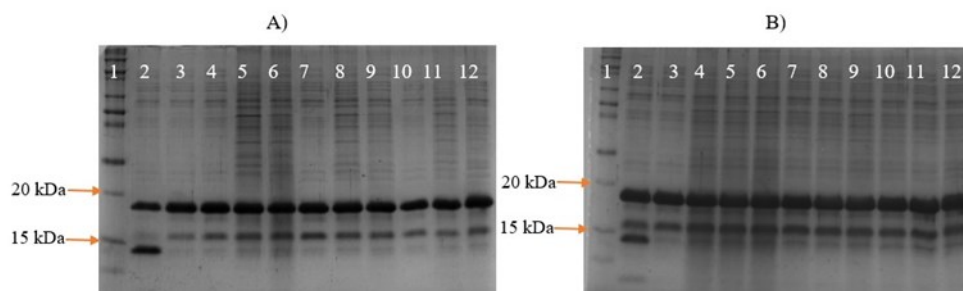
Obr. 2. Overenie integrácie. A) Overenie integrácie primermi 18S F5 a OvInt pGAP R. 1. dráha: *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, 2.-5. dráha: PCR z klonov 1-4. B) Overenie integrácie primermi 18S R2 a OvInt TEF F. 1. dráha: *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, 2.-5. dráha: PCR z klonov 1-4, 6. dráha: negatívna kontrola, 7. dráha: pozitívna kontrola.

Klon 1 sme po overení použili na baničkovú expresiu, z ktorej sme si pripravili vzorky média, cytoplazmy a bunkových kompartmentov pre dot-blot a SDS-PAGE analýzu. Pri dot-blot analýze (Obr. 3) sme nezaznamenali prítomnosť v médiu, čo znamená, že EK nebola sekrétovaná z buniek. V cytoplazme sa EK nachádzala, čo je možné vysvetliť jej post-translačnou translokáciou do endoplazmatického retikula, nakoľko je k nej pridaný invertázový sekrečný signál. Bunkové kompartmenty sme opakovane trikrát sonikovali.



Obr. 3. Dot-blot analýza vzoriek z média, cytoplazmy a bunkových kompartmentov po opakovanej sonikácii. Žltá šípka označuje negatívnu kontrolu. Zelené šípky predstavujú pozitívnu kontrolu (PK) a 10 krát riedenú pozitívnu kontrolu (PK 10r). V stĺpcoch sú nanosené vzorky z média (M), cytoplazmy (C) a bunkových kompartmentov sonikované 1 krát (K1x), 2 krát (K2x) a 3 krát (K3x). Riadky predstavujú jednotlivé dni odberu (DO) 1-3.

Pri SDS-PAGE elektroforéze sme pozorovali štiepenie substrátu. Najvýraznejší náznak správneho štiepenia je možné pozorovať v dráhe číslo 6 gélu A) (obrázok 4).



Obr. 4. SDS-PAGE analýza vzoriek média, cytoplazmy a bunkových kompartmentov z DO1-3. 1. dráha: *NovexTM Sharp Pre-Stained Protein Standard*, 2. dráha: pozitívna kontrola, 3. dráha: negatívna kontrola, 4.-6. dráha: vzorky z DO1, 7.-9. dráha: vzorky z DO2, 10.-12. dráha: vzorky z DO3 **B) SDS-PAGE analýza z opakovaných sonikácií bunkových kompartmentov.** 1. dráha: *NovexTM Sharp Pre-Stained Protein Standard*, 2. dráha: pozitívna kontrola, 3. dráha: negatívna kontrola, 4.-6. dráha: bunkové kompartmenty z DO1, 7.-9. dráha bunkové kompartmenty z DO2, 10.-12. dráha: bunkové kompartmenty z DO3.

Záver

Podarilo sa nám skonštruovať plazmidový vektor pre ukotvenie ľahkého reťazca enterokinázy do Golgiho aparátu kvasinky. Zároveň sme tento vektor úspešne integrovali do chromozómu kvasinky. Taktiež sme testovali lokalizáciu a aktivitu integrovanej enterokinázy.

PodĎakovanie

Táto publikácia vznikla aj vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt Zvýšenie kapacít a kompetencií Univerzity Komenského vo výskume, vývoji a inováciách, ITMS2014+: 313021BUZ3, spolufinancovaných zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a projektu APVV-21-0076.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Mattanovich D., Branduardi P., Dato L. et al., (2012) *Methods Mol Biol.* 824, p. 329
- [2] Massey S. E., Moura G., Beltrão P., et al., (2003) *Genome Res.* 13(4), p. 544
- [3] Buerth C., Heilmann C. J., Klis F. M., et al., (2011) *Microbiology.* 157(9), p. 2493text
- [4] Tomita Y., Ikeo K., Tamakawa H., et al., (2012) *PLoS One.* 7(5), p. 37226
- [5] Krahulec J., Lišková V., Boňková H., et al., (2020) *J Appl Genet.* 61(2), p. 275
- [6] Gasparian M. E., Ostapchenko V. G., Dolgikh D.A., et al., (2006) *Biochemistry* 71(2), p. 113
- [7] Maroux S., Baratti J., Desnuelle P. (1971) *J Biol Chem.* 246(16), p. 5031
- [8] Boňková H., Osadská M., Krahulec J., et al. (2014) *J Biotechnol* 189, p. 136

Th₁/M1 and Th₂/M2 immune response in hearts of Balb/c mice infected with lethal dose of A/WSN/33 and NS80 viruses

Miriam Mladá¹, Karin Donátová^{1,2}, Viktória Zezulová¹, Jana Jakubíková³, Tatiana Betáková^{1,2}

¹*Biomedical Research Center of Slovak Academy of Sciences, v.v.i., Institute of Virology, Department of Viral Immunology, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovak republic; miriam.hanckova@savba.sk*

²*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Microbiology and Virology, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak republic*

³*Biomedical Research Center of Slovak Academy of Sciences, v.v.i., Cancer Research Institute, Department of Tumor Immunology, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovak republic*

Abstract

Influenza A virus is a significant pathogen in humans with the ability to cause extensive morbidity and mortality. In healthy individuals, influenza virus infection generally remains localized to epithelial cells of the respiratory system. However, severe flu infections are often associated with diseases manifestations outside the respiratory tract. The highly virulent influenza strains may cause complications, including the central nervous system, cardiovascular and liver diseases. During innate immunity, the alveolar macrophages are capable of the mechanism of phagocytosis of infected cells. In addition, macrophages are part of a group of antigen-presenting cells that participate in developing the Th cell immune response (Th₁/Th₂). Homeostasis between phenotype M1 and M2 of macrophages is necessary for the correct induction of immune response against pathogens, suppression of the inflammatory reaction, and regeneration of damaged tissues.

Keywords: *influenza virus; macrophages; Th cells population; NS1 protein; cytokines*

Introduction and Objectives

The influenza A virus (IAV) is a major contributor to acute respiratory infections, but its pathogenicity is not limited to respiratory damage. Various complications in non-respiratory tissues (e.g., encephalopathy, Reye's syndrome) have been described during seasonal influenza infections [1]. Among others, myocarditis, congestive heart failure, and cardiac dysfunctions are common complications of severe influenza virus infection [2].

Macrophages are primarily part of innate immunity and are classified into M1 and M2 phenotypes. The population of M1 macrophages produces high levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-12). M2 macrophages, characterized as anti-inflammatory cells, represent the second alternative population, and produce IL-12 and IL-10 cytokines [3]. However, activated alveolar macrophages also play an important role in induction and production of virus-specific acquired immunity. Macrophages are closely associated with the Th₁/Th₂ immune response against influenza virus. Generally, M1 population (CD38, Gpr18, Fpr2) is associated with the Th₁ immune response (IFN- γ , IL-2). However, the phenotype M2 of

macrophages (Arg1, Egr2) is more inhibitory and part of the Th₂ immune response (IRF4, IL-10), which participates in the repair of damaged tissues [4, 5]. The non-structural protein 1 (NS1) is a major viral protein, that is strongly expressed in infected cells. It plays role in modifying the host's innate immune response and controlling virus replication. In this study, we observed changes in the expression of mRNAs in RIG-I like receptor signalling pathway, also Th₁/M1 and Th₂/M2 immunity in hearts of mice infected with non-adapted and adapted A/WSN/33 and NS80 viruses. Similarly, our attention was aimed at the quantity of immune cells in heart homogenates.

Materials and methods

Cell line, viruses and animals: The adherent epithelial Vero cells (ATCC® CCL-81™), that are generally extracted from *Cercopithecus aethiops* kidneys. These cells were incubated in the DMEM medium with 10% fetal bovine serum and maintained at 37°C with 5% CO₂. We used the control A/WSN/33 (WSN) virus and NS80 virus without the effector and C-terminal domains of NS1 protein [6]. Both viruses were propagated on Vero cells. Infected virus titers were evaluated with the ELISA method at 48 hours post infection. The Balb/c mice (4 weeks old, Dobrá Voda, Slovakia) were anesthetized and infected with WSN and NS80 viruses (40µl of viral inoculum). The mice were killed, lungs and heart were removed three days post infection, and obtained organs were homogenized in PBS and aliquots stored at -80°C.

Nested RT-PCR reaction: The SV Total RNA Isolation System kit (Promega) purified total viral RNA from hearts. A total of 400ng/µl RNA was reverse transcribed using random primer and reverse transcriptase (ThermoFisher Scientific). The primers targeting β-actin, RIG-I, NF-κB, IRF3, IRF4, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, CD38, Gpr18, Fpr2, Arg1, and Egr2 were described [6, 7, 8]. The final cDNA products were amplified with PCR method and obtained DNA fragments were visualized in 2% agarose gel.

Western blotting: After fractionation by SDS-PAGE, the protein was electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane. The blot was incubated in 5% nonfat dry milk in PBS solution overnight and then for 1 hour with IRF3 and Phospho-IRF3 (Ser385) polyclonal antibodies (Invitrogen). The membranes were washed several times with PBS solution and incubated with secondary antibody Protein A-HRP Conjugated (ThermoFisher Scientific). The blot was washed with PBS solution again, and visualized using the Luminol solution (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione).

Flow cytometry: The collected organs were washed with PBS solution and mechanically homogenized through the cell strainer. The red blood cells were lysed with ACK

lysis buffer. Subsequently, the cell suspension was centrifuged (1100 rpm, 30 min, 22°C). The supernatant was removed and the pellet was resuspended in PBS solution and centrifuged again (870 rpm, 10 min, 22°C). Following cell counting, cells were resuspended in PBS solution. Then, Fc block reagent was added, vortexed, and incubated (Innovex Bio). Cells were then stained with a mixture of immunophenotyping antibodies: anti-mouse CD4, anti-h/mIL-12R β 2, anti-mouse CD193 (CCR3), anti-mouse CD68, and anti-mouse CD163 (BD Biosciences, R&D Systems, Biolegend). After staining, FACS buffer was added and cells were centrifuged (1500 rpm, 5 min, 4°C). Obtained pellet was resuspended in PBS solution. Data were acquired with a *BD FACS Aria II SORP UV Flow Cytometer*.

Results and discussion

Balb/c mice were infected with non-adapted and adapted A/WSN/33 and NS80 viruses by lung passaging. We established the growth curves for non-adapted (WSN and NS80) and adapted viruses (WSN ad and NS80 ad) on the Vero cell line. We observed that NS80 virus was replicated slower to the lower titers *in vitro*, compared to the control A/WSN/33 virus. After adaptation, the NS80 ad virus grows to the same viral titer as the WSN virus (Fig.1).

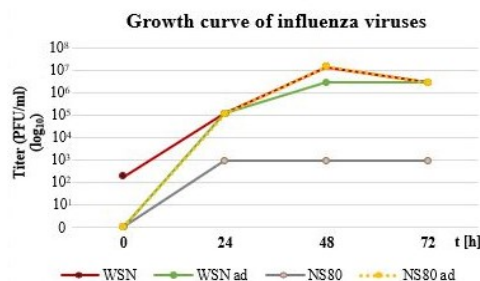


Fig. 1. Influenza viruses – Growth curve of A/WSN/33 and NS80 viruses

Mice were infected with a lethal dose of influenza viruses. Lungs and hearts were removed three days post infection. We determined the infect viral titers in the lungs and we observed that NS80 virus was not attenuated after adaptation. To find out how adaptation influences the spreading of the viruses into the hearts of infected mice, the virus titers were established in the heart's homogenates with ELISA test and RT-PCR method. Although, we have not detected influenza viruses in the hearts of infected mice by ELISA method, we have detected influenza viruses in the hearts infected especially with WSN and NS80 ad viruses by RT-PCR method. The RT-PCR method was used to prove that all viruses activated the RIG-I like receptor signalling pathway. We have found out that WSN and NS80 viruses activated

RIG-I signalling pathway (e.g., RIG-I, IRF3, NF- κ B, and cytokines such as IFN- α and IFN- β) stronger than WSN ad and NS80 ad virus. On the other hand, the synthesis of IRF3 protein was significantly increased in the hearts of mice infected with WSN ad and NS80 viruses but the phosphorylated form of IRF3 was higher in the hearts infected with the adapted viruses (Fig.2).

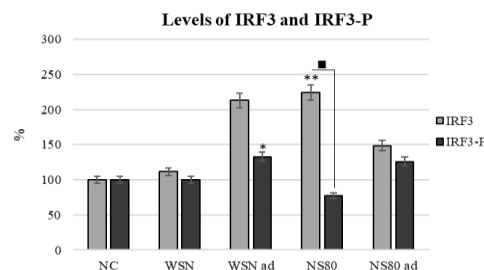


Fig. 2. Levels of IRF3 and IRF3-P in hearts of mice infected with A/WSN/33 and NS80 viruses

The WSN virus significantly increased the expression of IFN- γ mRNA (Fig.3A). On the other hand, WSN ad and NS80, and NS80 ad viruses significantly decreased the level of IFN- γ mRNA. The NS80 ad increased the expression of IFN- γ , compared to WSN ad virus. A higher level of IRF4 mRNA was detected in the hearts of mice infected with the adapted NS80 virus (Fig.3B). All viruses influence the expression of cytokines (data not shown).

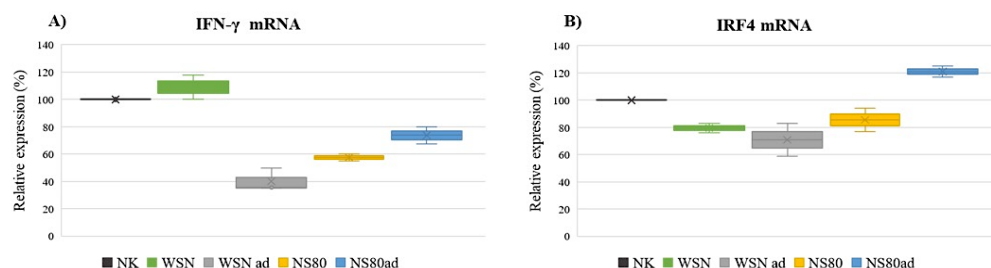


Fig. 3. Expression of IFN- γ (A) and IRF4 (B) mRNA in hearts of mice infected with influenza viruses

Classically, activated macrophages (M1) can be distinguished from alternatively activated macrophages (M2) by their relative expression of CD38, Gpr18, Fpr2, and Arg1, Egr2, respectively. The levels of CD38 mRNA were significantly increased post infection with WSN ad and NS80 ad viruses (Fig.4A). On the contrary, expression of monitored Gpr18 mRNA was mainly stimulated due to infection with WSN and NS80 viruses. The levels of Fpr2 mRNA were significantly lower, compared with negative control. There, we have not detected the significant effect of adaptation of both viruses (data not shown). On the contrary, the expression of Arg1 mRNA was equally increased post infection with both A/WSN/33 viruses.

Although, the effect of non-adapted NS80 was stronger on stimulation of Arg1 mRNA, compared to NS80 ad virus (data not shown). The level of Egr2 mRNA was statistically raised in hearts infected with WSN ad and NS80 virus (Fig.4B).

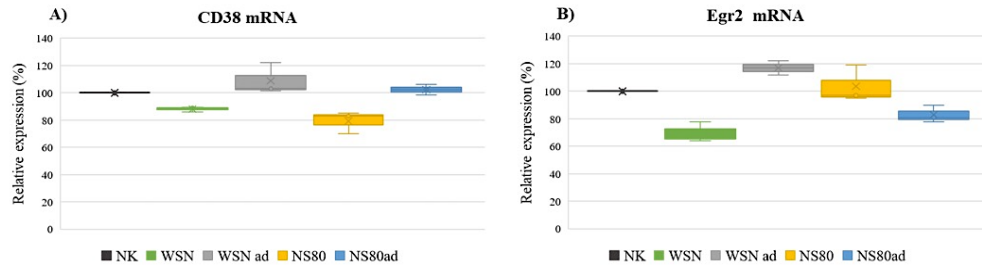


Fig. 4. Expression of CD38 (A) and Egr2 (B) mRNA in hearts of mice infected with influenza viruses

The quantity of the activated immune cells was determined in the hearts of mice infected with lethal (LD_{100}) and non-lethal (LD_0) doses of all influenza viruses by flow cytometry. The surface proteins expressed with Th cells ($CD4^+$), Th_1 ($IL-12R \beta 2^+$), Th_2 ($CCR3^+$ ($CD193$)), M1 ($CD68^+$), M2 ($CD163^+$) were detected by using immunophenotyping antibodies. The levels of Th_1 cells were increased in hearts of mice infected with LD_{100} of adapted NS80 virus (Fig.5A). On the contrary, expression of $CCR3^+$ marker for Th_2 cells was increased post infection by LD_0 WSN ad and LD_{100} NS80 ad viruses (Fig.5B). The number of M1 macrophages ($CD68^+$) was not significantly changed after infection with all viruses and did not depend on the LD (Fig.5C). The level of M2 macrophages ($CD163^+$) was significantly higher in the hearts of mice infected with LD_{100} WSN and LD_0 NS80 ad viruses (Fig.5D).

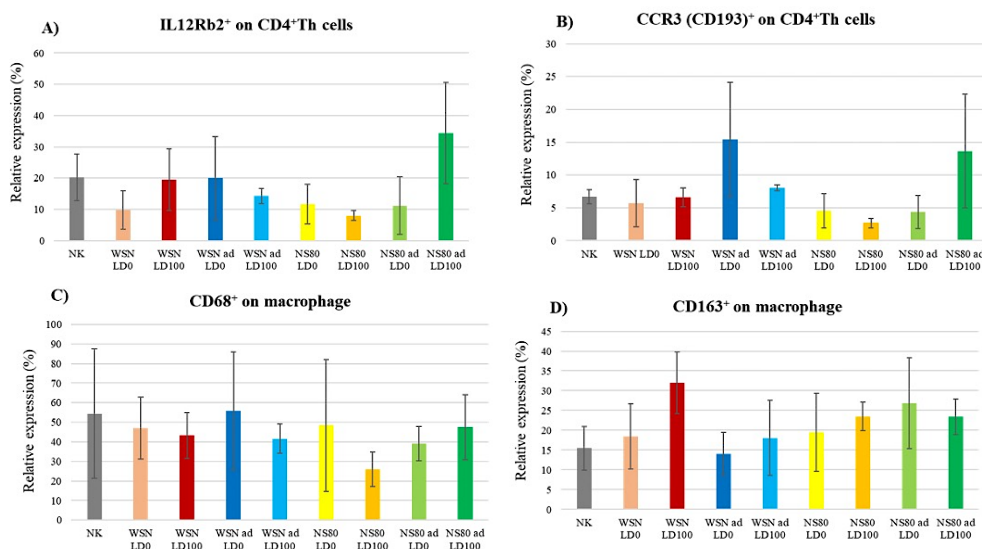


Fig. 5. Levels of markers of Th_1/Th_2 cells and M1/M2 macrophages in hearts of influenza-infected mice

Conclusion

The non-adapted NS80 virus was replicated to the lower virus titer *in vitro*. NS80 virus was not attenuated in the lungs of infected Balb/c mice. Viruses WSN and NS80 ad spread into the hearts of infected Balb/c mice. All virus activated RIG-I like receptor signalling pathway. Synthesis of IRF3 protein was significantly increased in hearts infected by adapted A/WSN/33 and non-adapted NS80 viruses. Levels of IRF3-P were promoted by adapted A/WSN/33 and NS80 viruses. There was no significant difference in the induction of Th₁ and Th₂ cells isolated from the hearts of infected Balb/c mice. Infection with LD₁₀₀ WSN and LD₀ NS80 ad significantly increased the expression of M2 macrophages.

Acknowledgment

This research was funded by European Regional Development Fund and by the Slovak Research and Development Agency (grand No. VEGA 2/0031/20).

References

- [1] Filgueiras-Rama D., Vasilijevic J., Jalife J., et al. (2021) *Cardiovasc. Res.* 117(3), p. 876
- [2] Kenney A. D., Aron S. L., Gilbert C., et al. (2022) *Sci. Adv.* 8(19), p. 5371
- [3] Shapouri-Moghaddam A., Mohammadian S., Vazini H., et al. (2018) *J. Cell. Physiol.* 233(9), p. 6425
- [4] Braga T. T., Agudelo J. S. H., Camara N. O. S. (2015) *Front. Immunol.* 6, p. 602
- [5] Porta C., Riboldi E., Ippolito A., et al. (2015) *Semin. Immunol.* 27(4), p. 237
- [6] Turianová L., Lachová V., Beňová K., et al. (2020) *Acta. Virol.* 64(1), p. 78
- [7] Švančarová P., Svetlíková D., Betáková T. (2015) *Virus Res.* 195, p. 100
- [8] Turianová L., Lachová V., Svetlíková D., et al. (2019) *Exp. Ther. Med.* 18(6), p. 4397

Expression of BTLA is increased in chronic lymphocytic leukemia

Zuzana Nižňanská, Katarína Lopusná

*Institute of Virology of Slovak Academy of Sciences, v. v. i., Biomedical Research Center,
Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovak republic; zuzana.niznanska@gmail.com*

Abstract

Immune checkpoint molecules play very important role in the proper functioning of the body's immune system while maintaining homeostasis. The activation of B and T-lymphocytes is controlled by the action of immune checkpoints. However, increased expression of some immune checkpoints was detected also in B/T-cell leukemias and lymphomas, therefore, we hypothesize that immune checkpoint molecules might play a key role in the pathogenesis of hematologic malignancies. In this work, we identified high expression level of B and T lymphocyte attenuator (BTLA) in tumors of Chronic lymphocytic leukemia and several cell lines. The role of this receptor is to inhibit the activation and proliferation of immune cells, however, its role in the pathogenesis of B-cell malignancies remains unknown.

Keywords: *BTLA; immune checkpoint molecule, RNA-seq, B-cell malignancies*

Introduction and Objectives

B-cell malignancies are the result of the malignant proliferation of B-cells during their differentiation from stem cells to mature B-cell. B-cell tumors are divided into: Hodgkin's lymphoma and non-Hodgkin's lymphoma. Most B-cell tumors belong to the group of non-Hodgkin lymphomas, the most common is Chronic lymphocytic leukemia (CLL) [1].

CLL is the most common leukemia in adult patients. The disease is characterized by clonal expansion of mature CD5+, CD23+ and CD19+ B-1 lymphocytes in the blood, bone marrow, lymph nodes and spleen [2]. A large number of recurrent genetic defects and cytogenetic changes are present in patients diagnosed with CLL [3].

In the immune system, the balance between the activation and inhibition of immune cells must be constantly maintained. The immune checkpoint molecules are important immune response regulators that protect self-tolerance while responding to threats [4]. These molecules are expressed on most of the immune cells. They are divided into two categories: co-stimulatory molecules (CD40, HVEM, CD154, CD28, LIGHT, CD70, CD226, CD37, CD2, CD80, CD86) and co-inhibitory molecules (CTLA-4, PD-1, BTLA, TIGIT, CD160, LAG-3, TIM-3) [5]. The B and T lymphocyte attenuator (BTLA/CD272), is very important inhibitory receptor and its main function is the inhibition of lymphocytes during the immune response. BTLA belongs to the CD28 family, like receptors PD-1 and CTLA-4 [6].

In our study, we focused on analysis of BTLA expression in CLL and cell lines derived from various B-cell malignancies. The objectives of our work were:

1. To identify expression level of BTLA in CLL from publicly available RNA-seq data
2. To identify expression level of BTLA in cell lines derived from B-cell lymphomas and leukemias from publicly available RNA-seq data
3. To identify expression level of BTLA in selected cell lines using real-time qPCR.

Materials and methods

Tab. 1. Data from SRA database used in this study

Disease	RNA-seq
CLL	SRP055390 [7]
Controls	SRP055390 [7]

Bioinformatic analysis: RNA-seq data were obtained from the SRA database. The sequencing data were analyzed in UseGalaxy Europe [8] using FASTQC (version 0.11.9) [9], TrimGalore (version 0.6.7) [10] and Trimmomatic (version 0.38.1) [11]. Reads were then aligned to the *Homo sapiens* hg38 reference genome using RNA Star (version 2.7.8a) [12]. The RNA-seq data were quantified through the software Seqmonk (version 1.48.0) [13]. The expression values of BTLA in tumor cell lines were obtained from Cancer cell line encyclopedia [14].

Used cells: The cell lines CI-1 and JVM-2 were grown in RPMI 1640 medium with 10% fetal bovine serum. The cell lines RAJI and CA46 were cultured in RPMI 1640 medium containing 5% fetal bovine serum. The cell line MEC-1 was grown in IMDM medium with 5% fetal bovine serum. All cells were maintained at 37°C and 5% CO₂ atmosphere.

Real-time PCR: Total RNA from cell lines was isolated using Trizol. The concentration and purity of the isolated RNA was determined using NanoDrop 200 (ThermoFisher Scientific). Reverse transcription of 1 µg of RNA into cDNA was performed using the First strand cDNA synthesis kit (ThermoFisher Scientific, #K1612). To amplify cDNA segments Luminaris Color HiGreen High ROX qPCR MasterMix (ThermoFisher, K0363, USA) was used. The primers used are listed in Table 2. A StepOnePlus™ Real-Time PCR System thermal cycler (Applied Biosystems, USA) was used for the PCR reaction, and the results were evaluated using the StepOneSoftware™ v2.3 program (Applied Biosystems). Conditions of PCR were: initial denaturation (95°C – 10min), {denaturation (95°C -15sec), primer annealing (BTLA - 57°C, β-actin - 60°C – 1min), polymerization (60°C – 1min)} 40x , final

polymerization (95°C – 15 sec).

Tab. 2. Sequence of used primers

Tab. 2. Primer	Sequence
hBTLA – forward	5' ACA TCT GGA ACA TCC ATG GGA A 3'
hBTLA – reverse	5' ACA TGA GGC CTG TTA GCA CA 3'
β-actin – forward	5' CCA ACC GCG AGA AGA TGA 3' [15]
β-actin – reverse	5' CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG 3' [15]

Results and discussion

Bioinformatic analysis showed that the expression of BTLA is increased (at least two-times compared to control) at the mRNA level in 7 out of 11 CLL tumor samples (Fig.1)

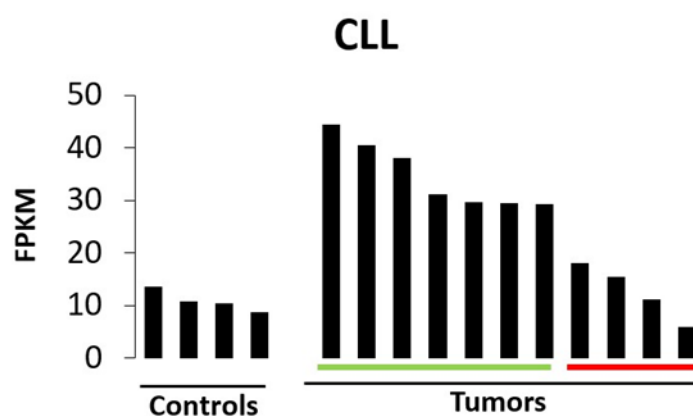


Fig. 1. Expression of BTLA in CLL. Tumors with increased BTLA expression (FC > 2) are marked green and tumors with reduced or unchanged BTLA expression compared to the control are red. FPKM value - fragments per kilobase per million. Control cells CLL: healthy CD19+ B-cells.

Analysis of BTLA expression in cell lines derived from B-cell malignancies demonstrated that BTLA is highly expressed not only in CLL cell lines (EHEB, FPKM=28 and MEC-1, FPKM=20), but also in multiple myeloma (MM) cell lines (KMS-18, FPKM=95 and MOLP-2, FPKM=27) and mantle cell lymphoma (MCL) cell lines (JVM2, FPKM=24) (Fig.2).

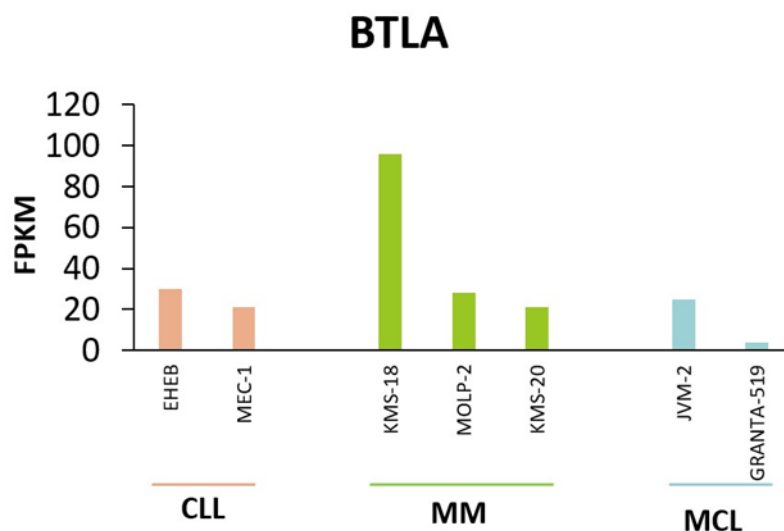


Fig. 2. Expression of BTLA in cell lines derived from B-cell malignancies. FPKM values were obtained from the Cancer Cell Line Encyclopedia database [14].

The RT qPCR method was used to determine BTLA expression values in the monitored B-cell lines (JVM-2 – MCL, MEC-1 - CLL, CA46 and RAJI – Burkitt lymphoma, CI-1 – B-ALL). All cell lines expressed BTLA at the mRNA level, with the highest BTLA expression detected in the JVM-2 cell line and the lowest in RAJI cells (Fig. 3).

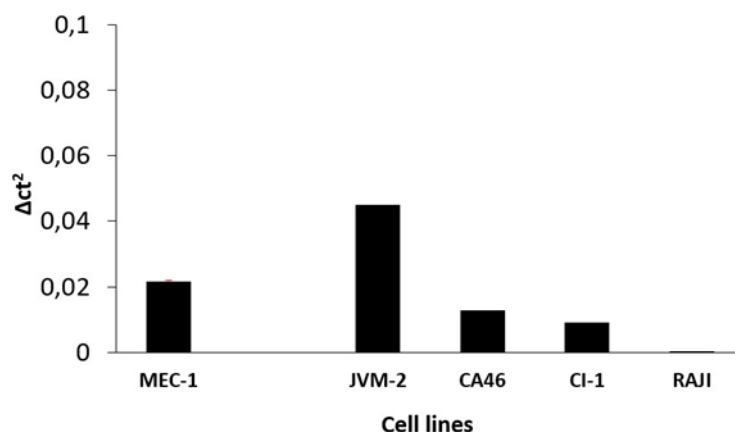


Fig. 9. BTLA expression in MEC-1, JVM-2, CA46, CI-1 and RAJI cell lines.

Karabon et al. demonstrated high levels of BTLA expression in CLL patients compared to healthy controls. This study also showed that BTLA and CTLA-4 gene polymorphisms are associated with mRNA expression, and variations in these genes can be considered potential risk factors in CLL [16]. Interestingly, in CLL it was showed that miR-155-5P (an oncogene

overexpressed in B-cell lymphomas) may be involved in BTLA inhibition. According to this study, this inhibition may be one of the many mechanisms responsible for the pathogenesis of CLL [17]. BTLA is also expressed in tumor-infiltrating cytotoxic T-lymphocytes and is often associated with an impaired antitumor immune response. It has been observed that an increased level of BTLA⁺ CD8⁺ T-cells is related to an adverse outcome in patients with gallbladder cancer [18].

Conclusion

In this study, we identified high expression levels of the BTLA receptor in CLL through bioinformatic analysis. In addition, from publicly available data we also identified high expression of BTLA in cell lines derived from Chronic lymphocytic leukemia, as well as Multiple myeloma and Mantle cell lymphoma.

We confirmed high expression of BTLA in JVM-2, MEC-1, CA46 and CI-1 cell lines using real-time qPCR. In RAJI cells, the level of BTLA was lower.

Our results suggest, that BTLA might play a role in the pathogenesis of B-cell malignancies, especially in Chronic lymphocytic leukemia, however, the function of BTLA in tumor cell signalling remains unknown. It would be worth to evaluate, whether BTLA in CLL has inhibitory or activatory effect on tumor cell proliferation. The identification of genes affecting the disease development and progression might be used in the future for improvement of cancer management and therapy

Acknowledgement

The project was funded by the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme on the basis of the Grant Agreement under the Marie Skłodowska-Curie funding scheme No. 945478 - SASPRO 2; by the Scientific Grant Agency of the Slovak Republic under the grant VEGA 2/0063/21; and by the Slovak Research and Development Agency under the project APVV-19-0376.

References

- [1] Coupland S. E. (2011). *Histopathology*. 58, p. 69
- [2] Hallek M. (2015). *Am. J. Hematol.* 90, p. 446
- [3] Papajík T., Jarošová M., Plachý R., et al. (2006). *Trans. Hemat.* 12, p. 53
- [4] Pritchard N. R., Smith K. G. C. (2003). *Immunology*. 108, p. 263
- [5] Patsoukis N., Weaver J. D., Strauss L., et al. (2017). *Frontiers in Immunology*. 8, p. 1

- [6] Sedy J. R., Gavrieli M., Potter K. G. et al. (2005). *Nat. Immunol.* 6, p. 90
- [7] Kushwaha G., Dozmorov M., Wren J. D., et al. (2016). *Hum Genomics.* 10, p. 2
- [8] Afgan E., Baker D., Batut B., et al. (2018). *Nucleic Acids Res.* 46
- [9] FastQC Babraham Bioinformatics [Cited: July 2 2021]
< <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> >
- [10] Krueger F. (2021). GitHub repository
- [11] Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. (2014). *Bioinformatics.* 30, p. 21
- [12] Dobin A., David C. A., Schlesinger F., et al. (2012). *Bioinformatics.* 29, p. 15
- [13] Seqmonk Babraham Bioinformatics [Cited: May 12 2021]
< <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/seqmonk/> >
- [14] Barretina J., Caponigro G., Stransky N., et al. (2012). *Nature.* 483, p. 603
- [15] Wang N., Zhu M. Tsao S. W., et al. (2012). *PLoS ONE.* 7, p. 9
- [16] Karabon L., Partyka A., Ciszak L., et al. (2020). *Journal of Immunology Research.* p. 1
- [17] Karabon L., Andrzejczak A., Ciszak L., et al. (2021). *Cells.* 10, p. 3009
- [18] Oguro S., Ino Y., Shimada K., et al. (2015). *Cancer Sci.* 106, p. 1750

Prvý molekulárny dôkaz hybridizácie endosymbiontných nálevníkov (Protista: Ciliophora)

Tomáš Obert, Tengyue Zhang, Ivan Rurik, Peter Vďačný

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra zoológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; obert7@uniba.sk

Abstract

First molecular evidence of hybridization in endosymbiotic ciliates (Protista, Ciliophora)

Hybridization is an important evolutionary process that can fuel diversification via formation of hybrid species or can lead to fusion of previously separated lineages by forming highly diverse species complexes. We provide here the first molecular evidence of hybridization in wild populations of ciliates, a highly diverse group of free-living and symbiotic eukaryotic microbes. The impact of hybridization was studied on the model of *Plagiotoma*, an obligate endosymbiont of the digestive tube of earthworms, using various phylogenetic methods and multidimensional morphometrics. Phylogenetic analyses indicated that gene flow slowed down and eventually hampered the diversification of *Lumbricus*-dwelling plagiotomids, which collapsed into a single highly variable biological entity, the *P. lumbrici* complex.

Keywords: nuclear rRNA; mitochondrial COI gene; *Plagiotoma*; hybridization; earthworms

Úvod a formulácia cieľa

Populácie ťažko alebo takmer úplne morfológicky nerozlíšiteľných, ale geneticky veľmi dobre izolovaných skupín nálevníkov sú známe už od čias prvých Sonnebornových [1, 2] štúdií na modelovom organizme *Paramecium aurelia* Ehrenberg, 1838. Takéto populácie boli pôvodne označované ako formy alebo variety a známe sú naprieč voľne žijúcimi aj symbiontnými skupinami nálevníkov.

Popri zástupcoch čeľade Plagiotomidae Bütschli, 1887 tráviaci trakt dážďoviek obývajú ďalšie tri skupiny nálevníkov: čeľaď Nyctotheridae Amaro, 1972, čeľaď Hysteroecinetidae Diesing, 1886 a podtrieda Astomatia Schewiakoff, 1896. Existujú veľké rozdiely v alfa-diverzite týchto skupín nálevníkov. Plagiotomidy zahŕňajú len zopár druhov [3–5], naproti tomu hysteroecinetidy, nyctotheridy a astomáty predstavujú vysoko diverzifikované skupiny obsahujúce niekoľko desiatok až stoviek taxónov [1, 6, 7]. Práve takáto nerovnomerná distribúcia endosymbiontných nálevníkov naprieč týmito štyrmi skupinami ponúka otázku príčin rozdielov v ich diverzite. Distribúcia a diverzita endosymbiontných nálevníkov sú viazané na geografický výskyt a ekológiu ich hostiteľských organizmov [8–16]. Avšak zmena hostiteľského spektra a hybridizácia môžu mať výrazný dopad práve na diverzifikáciu a proces speciácie. Hybridizácia môže urýchliť diverzifikáciu pomocou vzniku hybridogénnych druhov [17–22], ale môže ju tiež spomaliť narušením reprodukčných druhových bariér už

sformovaných druhov, ktoré následne splynú do jedného komplexu [23–25].

Pomocou rozsiahleho vzorkovania a kombinácie sekvencií jadrového rDNA cistrónu, mitochondriálneho COI génu, morfológických a geometrických analýz sa pokúšame zodpovedať nasledovné otázky:

1. Bola rozmanitosť rodu *Plagiotoma* podcenená len na základe morfológie?
2. Kladujú línie rodu *Plagiotoma* na základe ekologických skupín ich hostiteľov?
3. Aký má dopad hybridizácia na alfa-diverzitu plagiotomidov?

Materiál a metódy

Dážďovky boli zozbierané na 36 lokalitách v Bratislave a okolí. Pomocou morfológie [26] a sekvencií mitochondriálnych ND1 a COI génov boli určené do druhov, prípadne druhových komplexov. Následne boli dážďovky vypitvané a obsah ich čreva bol skúmaný na prítomnosť nálevníkov.

Nálevníky boli pozorované pomocou mikroskopu Leica DM2500, pričom celkovo bolo meraných alebo skórovaných 21 taxonomicky významných znakov. Analýza hlavných komponentov (PCA) bola vykonaná na normalizovanej matici obsahujúcej párové vzdialenosti jedincov merané pomocou euklidovskej vzdialenosti za pomoci knižnice scikit-learn [27]. Analýza tvaru buniek bola vykonaná pomocou knižnice Momocs.

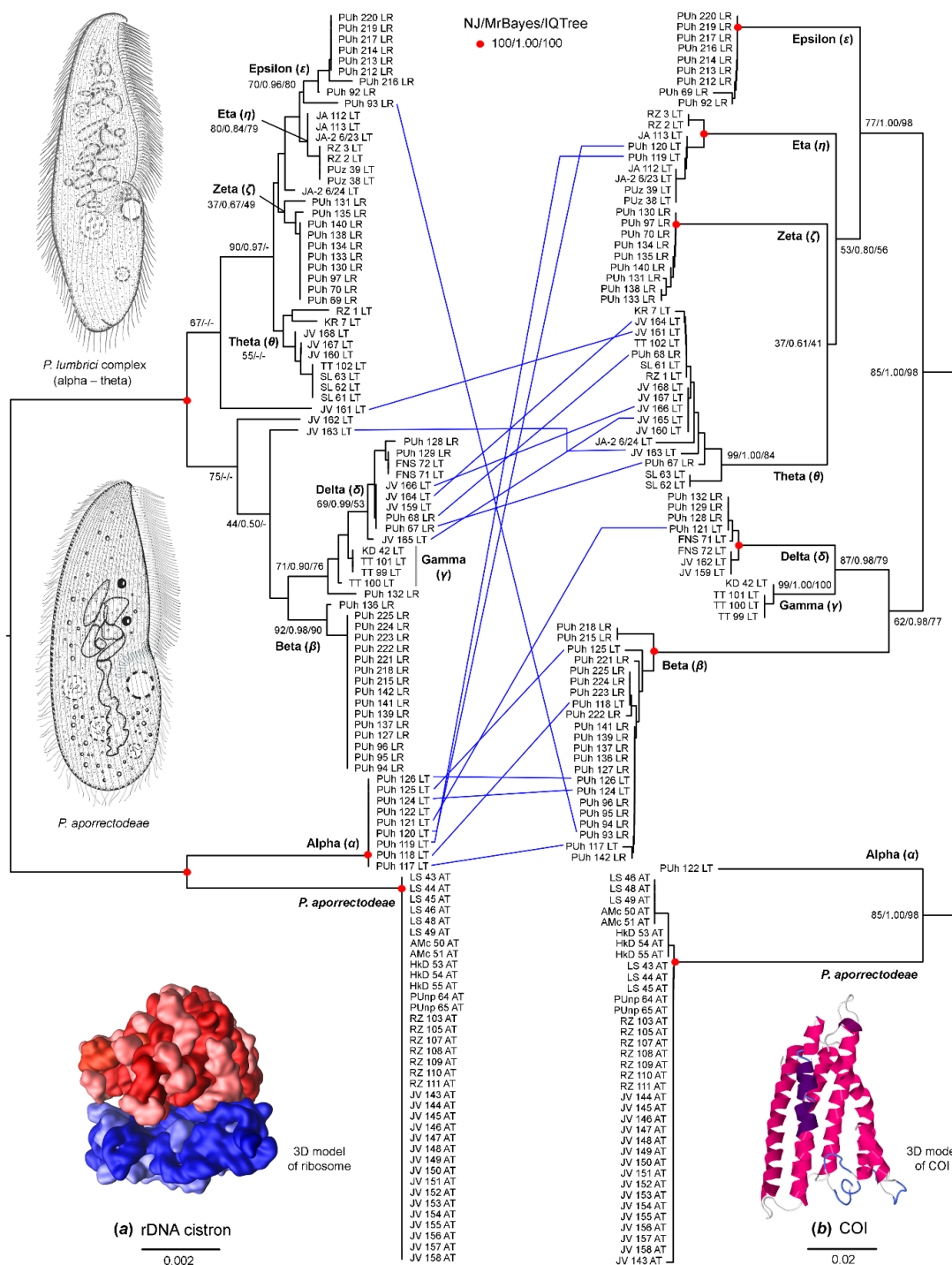
Jednotlivé bunky nálevníkov boli odobraté pomocou modifikovanej Pasteurovej pipety a vložené do 180 µl lyzačného pufru (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA). Z takto uskladnených vzoriek bola DNA izolovaná pomocou súpravy chemikálií ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA). Tri jadrové gény (18S, 5,8S a 28S rRNA gén), ich dva medzerníky (ITS1 a ITS2) a mitochondriálny COI gén boli amplifikované podľa postupu uvedeného v článku Obert et al. [28].

Získané sekvencie boli zoradené na základe ich primárnej a sekundárnej štruktúry v programe 4SALE ver. 1.7.1 [29]. Sekundárne štruktúry 18S, 5,8S a 28S rRNA molekúl boli vymodelované za pomoci R2DT [30]. Génové stromy boli skonštruované za pomoci metód neighbour-joining, maximum likelihood a Bayesiankej inferencie. Druhové stromy boli vypočítané na základe koalescenčného modelu za pomoci *BEAST ver. 1.8.3 [31].

Výsledky a diskusia

Približne 880 dážďoviek bolo zozbieraných na 36 lokalitách na Slovensku. Avšak iba jeden druh z každej ekologickej skupiny dážďoviek obsahoval endosymbiontné nálevníky rodu *Plagiotoma*. Konkrétne anektický druh *Lumbricus terrestris* Linné, 1758; epigeický druh *L.*

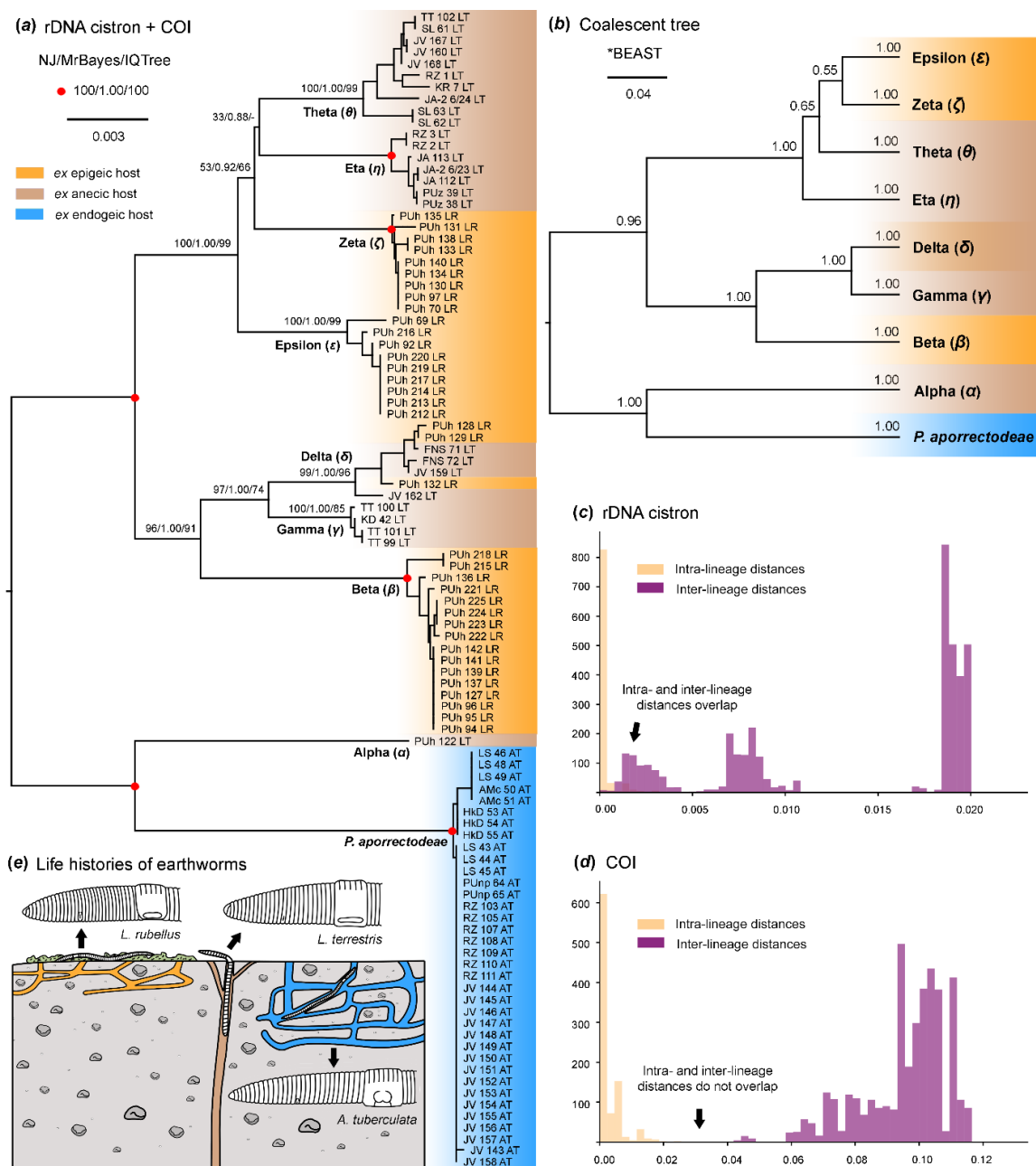
rubellus Hoffmeister, 1843 a endogeický druh *Aporrectodea tuberculata* (Eisen, 1874).



Obr. 1. Génové stromy rodu *Plagiotoma* odvodené zo sekvencií rDNA cistronu (a) a COI génu (b)
Modré línie naznačujú konfliktné pozície hybridných jedincov

Na základe fylogenetických analýz bolo rozoznaných deväť mitochondriálnych línií nálevníkov rodu *Plagiotoma* (Obr. 1). Jedna molekulárne homogénna línia reprezentovala druh *P. aporrectodeae* z endogeickej dážd'ovky *A. tuberculata*, kým zvyšných osem línií

izolovaných z druhov *L. terrestris* a *L. rubellus* patrilo do druhového komplexu *P. lumbrici*.



Obr. 2. Multigénový (a) a druhový strom rodu *Plagiotoma* (b), výsledky barkódovacích analýz (c, d) a ekologické skupiny skúmaných hostiteľských dážďoviek

Genetická variabilita rodu *Plagiotoma* ponúka otázku možného rozdelenia jednotlivých línií na základe ich morfológie a ekológie ich hostiteľských dážďoviek. Za pomoci PCA bolo zistené, že jednotlivé mitochondriálne línie plagiotomidov nie je možné rozlíšiť na základe 21 meristických znakov. Avšak línie pochádzajúce z epigeických a endogeických dážďoviek možno od seba spoľahlivo odlíšiť. Nálevníky z anektických dážďoviek boli morfológicky prechodné medzi obidvomi skupinami. Eliptická Fourierová analýza tvaru buniek ukázala

podobné výsledky ako PCA. Vo fenotypovom priestore tak bolo detegované kontinuum variability prepojujúce jednotlivé mitochondriálne línie plagiotomidov. Chýbanie diskretných skupín bolo pravdepodobne spôsobené hybridizáciou, čo naznačujú aj molekulárne analýzy.

Hybridizácia je veľmi dôležitý evolučný proces, ktorý významne ovplyvňuje diverzifikáciu [19–22]. Až 16 zo 115 (~ 14 %) skúmaných jedincov v rámci druhového komplexu *P. lumbrici* pripadalo na hybridy. Práve tieto hybridné jedince spôsobovali konflikty a nezrovnalosti v génových stromoch zostrojených na základe jadrového rDNA cistronu a mitochondriálneho COI génu (Obr. 1). Po vylúčení hybridov z analýz bolo možné sekvencie rDNA cistronu a COI zkonkatenovať a odvodiť dobre vyriešené multigénové a koalescenčné stromy (Obr. 2). V týchto stromoch jednotlivé línie plagiotomidov obsahujú jedince izolované len z jednej ekologickej skupiny hostiteľských dážďoviek. Jedinú výnimku predstavuje línia delta, ktorá zahŕňa symbiontov ako anektických tak aj epigeických hostiteľov.

Evolúcia lumbricidných dážďoviek bola do značnej miery ovplyvnená paleoklimatickými a paleogeografickými udalosťami, pričom stredná Európa predstavuje ancestrálnu oblasť pre väčšinu rodov lumbricidov [32–35]. Epigeické aj anektické dážďovky sa vyvinuli viackrát nezávisle z rôznych endogeických predkov. Adaptívna radiácia hostiteľov v kombinácii so zmenšovaním a zväčšovaním ich areálov v dôsledku paleoklimatických zmien mohli ovplyvniť aj diverzifikáciu a sekundárne strety endosymbiontných plagiotomidov, ktoré následne mohli hybridizovať.

Záver

Pomocou multigénových analýz sme prvýkrát dokázali existenciu introgresie u nálevníkov aj mimo laboratórnych podmienok. Hybridizácia v prípade plagiotomidov znižuje alfa-diverzitu narušením druhových bariér, rozširuje hostiteľské spektrum a zvyšuje variabilitu jadrového rDNA cistronu v rámci druhového komplexu *P. lumbrici*.

PodĎakovanie

Práca bola vypracovaná vďaka podpore Agentúry na podporu výskumu a vývoja (APVV-19-0076) a Vedeckej grantovej agentúry MŠVVaŠ SR a SAV (VEGA 1/0013/21).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Sonneborn T. M. (1938) Proc. Am. Philos. Soc. 73, p. 434
- [2] Sonneborn T. M. (1939) Am. Nat. 73, p. 413
- [3] Albaret J. -L. (1975) Mem. Mus. Natl. Hist. Nat. 89, p. 114

- [4] Albaret J. -L., Njiné T. (1975) *Protistologica* 11, p. 311
- [5] Mandal A. K., Nair K. N. (1975) *Arch. Protistenkd.* 117, p. 40
- [6] de Puytorac P. (1954) *Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim.* 11, p. 270
- [7] Raabe Z. (1972) *Acta Protozool.* 10, p. 184
- [8] Irwin N. A. T., Sebetrasekh M., Lynn D. H. (2017) *Protist* 168, p. 493
- [9] Vďačný P. (2018) *Mol. Biol. Evol.* 35, p. 1769
- [10] Rataj M., Vďačný P. (2020) *Parasitol. Res.* 119, p. 1545
- [11] Rataj M., Vďačný P. (2021) *Mol. Phylogenet. Evol.* 161, e107174
- [12] Obert T., Rurik I., Vďačný P. (2021) *Front. Microbiol* 12, e689987
- [13] Zhang T., Vďačný P. (2021a) *Zool. J. Linnean Soc.* 192, p. 23
- [14] Zhang T., Vďačný P. (2021b) *Parasitol. Res.* 120, p. 2616
- [15] Zhang T., Vďačný P. (2022) *Mol. Phylogenet. Evol.* 166, e107310
- [16] Rataj M., Zhang T., Vďačný P. (2022) *Front. Microbiol.* 13, e830951
- [17] Seehausen O. (2004) *Trends Ecol. Evol.* 19, p. 207
- [18] Litsios G., Salamin N. (2014) *BMC Evol. Biol.* 14, e245
- [19] Stankowski S., Streisfeld M. A. (2015) *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci* 282, e20151666
- [20] Sefc K. M., Mattersdorfer K., Ziegelbecker A., et al. (2017) *Ecol. Lett.* 20, p. 662
- [21] Ebersbach J., Tkach N., Röser M., et al. (2020) *Diversity* 12, e440
- [22] White O. W., Reyes-Betancort J. A., Chapman M. A., et al. (2020) *New Phytol.* 228, p. 1971
- [23] Huxel G. R. (1999) *Biol. Conserv.* 89, p. 152
- [24] Gómez J. M., González-Megias A. Lorite J., et al. (2015) *Biodivers. Conserv* 24, p. 1857
- [25] Todesco M., Pascual M. A., Owens G. L., et al., (2016) *Evol. Appl.* 9, p. 908
- [26] Pižl V. (2002) *Žížaly Čerské republiky. Sborník Přírodovědného Klubu v Uherském Hradišti. Česká republika*, 9, p. 28
- [27] Pedregosa F., Varoquaux G., Gramfort A., et al. (2011) *J. Mach Learn. Res.* 12, p. 2830
- [28] Obert T., Zhang T., Rurik I., et al. (2022) *Front. Microbiol.* 13, e1067315
- [29] Seibel P. N., Müller T., Dandekar T., et al. (2006) *BMC Bioinform.* 7, e498
- [30] Sweeney B. A., Hoksza D., Nawrocki E. P., et al. (2021) *Nat. Commun.* 12, e3494
- [31] Heled J., Drummond A. J. (2010) *Mol. Biol. Evol.* 27, p. 580
- [32] Fernández R., Almodóvar A., Novo M., et al. (2013) *Soil. Biol. Biochem.* 58, p. 135
- [33] Domínguez J., Aira M., Breinholt J., et al. (2015) *Mol. Phylogenet. Evol.* 83, p. 19
- [34] James S. W., Csuzdi C., Chang C. H., et al. (2021) *Science* 371, eabe4629
- [35] Marchán D. F., Csuzdi C., Decaëns T., et al. (2021) *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 59, p. 1717

Účinok fotobiomodulačného žiarenia po hypericínom indukovanej fotodynamickej terapii v nádorových a nenádorových bunkách *in vitro*

Soňa Olejárová¹, Veronika Huntošová²

¹Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta, Katedra biofyziky, Jesenná 5, 040 01 Košice, Slovenská republika; sona.olejarova@student.upjs.sk

²Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Technologický a inovačný park, Centrum interdisciplinárnych biovied, Jesenná 5, 040 01 Košice, Slovenská republika

Abstract

Effect of photobiomodulation radiation after hypericin-induced photodynamic therapy in tumour and non-tumour cells *in vitro*

Photodynamic therapy (PDT) involves the use of a photosensitizer or photosensitizing agent, which is activated by light, to destroy cancer cells. The goal of hypericin-induced PDT is not only to increase the rate of cell death in tumour cells but also to monitor the level of cytotoxicity in the surrounding healthy tissues. Photobiomodulation (PBM) is linked to the stimulation of mitochondrial metabolism processes and appears to enhance the effectiveness of cancer cell PDT. We focused on evaluating the effects of PBM on the metabolic activity of tumour (glioblastoma cells, U87MG) and non-tumour (fibroblasts, HDF) cells after the application of PDT. We found that hypericin-mediated PDT significantly reduced the metabolic activity of both healthy (HDF) and cancerous (U87MG) cells. The metabolism of HDF cells was significantly higher after the combined therapy (PDT + PBM) compared to PDT alone, but this effect was not observed in glioblastoma cell culture.

Keywords: *hypericin; mitochondria; metabolism; fibroblasts; glioblastoma cells*

Úvod a formulácia cieľa

Glioblastóm je najčastejšie sa vyskytujúcim typom nádorového ochorenia mozgu a predstavuje asi 50 % z celkového počtu diagnostikovaných nádorových ochorení CNS [1].

Liečba glioblastómov je veľmi zložitá a aj napriek značnému rozvoju modernej medicíny, predstavuje celkové prežívanie pacientov s nádorom CNS len 5 % [2]. Preto sa čoraz viac výskumnej aktivity zameriava na aplikáciu alternatívnych protinádorových terapií zahrňujúcich neinvazívnu aplikáciu, vrátane fotodynamickej liečby (PDT) [3].

Princíp fotodynamickej terapie spočíva v aktivácii fotosenzitívnych molekúl, ako napríklad hypericínu, ktoré sú inkorporované prednostne do nádorových buniek. Svetelná indukcia fotosenzibilizátora spúšťa tvorbu reaktívnych foriem kyslíka (ROS), ktorých zvýšená koncentrácia je pre bunky signálom pre autofágiu alebo bunkovú smrť (apoptózu, nekrózu). Cieľom hypericínom indukovanej PDT je nielen zvyšovať mieru bunkovej smrti nádorových buniek, ale aj sledovať mieru cytotoxicity v okolitých zdravých bunkách [4].

V kontexte zvyšovania cytotoxického vplyvu PDT na nádorové bunky sa začína uvažovať o fotobiomodulačnom žiarení (PBM), ktoré využíva svetlo v blízkej infračervenej oblasti a má kapacitu ovplyvňovať mitochondriálne dráhy. Napriek tomu, že niektoré účinky

PBM, ako znižovanie tvorby reaktívnych foriem kyslíka, zvyšovanie hladiny ATP a tiež mitochondriálneho membránového potenciálu, sú známe, presný mechanizmus jeho pôsobenia je stále neobjasnený [5].

Naším cieľom bolo zamerať sa nielen na samotný účinok PBM, ale aj na novo diskutovanú tému kombinovanej terapie, spájajúcu fotodynamickú terapiu a fotobiomodulačné žiarenie. V našej práci sme sa zamerali na testovanie účinkov PBM po aplikovanej PDT na metabolickú aktivitu nádorových a nenádorových buniek.

Materiál a metódy

Pre realizáciu *in vitro* pokusov boli použité bunkové línie odvodené od ľudských dermálnych fibroblastov (HDF) a nádorové bunky glioblastómov (U87MG). Kultivácia HDF a U87MG buniek prebiehala pri štandardných podmienkach pri 37°C a 5 % CO₂. Kompletné médium použité na kultiváciu HDF (RPMI 1640), U87MG (DMEM) obsahovalo 10 % FBS a 1 % antibiotík (penicilín, streptomycín).

V experimente hodnotiacom metabolickú aktivitu mitochondrií boli bunky vysiate na 96 jamkové platničky, v experimente zameranom na vizualizáciu mitochondrií boli bunky vysiate na petriho misky. Terapeutický protokol bol stanovený nasledovne: po dosiahnutí 80 – 90 % konfluencie bol k bunkám pridaný hypericín/vehiculum (DMSO). Koncentrácia hypericínu v médiu bola 100 nM. Po 3 hod inkubácie buniek s hypericínom/vehiculom v tme, bolo bunkám vymenené médium a aplikované žiarenie s vlnovou dĺžkou 590 ± 10 nm (2 J/cm²) za účelom aktivácie hypericínom indukovanej fotodynamickej terapie (PDT). Po 24 hodinách boli bunky ožiarené fotobiomodulačným žiarením v oblasti blízkej infračervenému svetlu, 808 ± 3 nm (2 J/cm²). Experimentálne skupiny analyzované v experimente: PDT (590 nm), PBM (808 nm), kombinovaná terapia (PDT + PBM) a kontrolná skupina (K, 0 J/cm²).

Následne po 24 hod od aplikácie PBM, respektíve 48 hod od začiatku experimentu, bola hodnotená metabolická aktivita mitochondrií prostredníctvom MTT testu (Sigma-Aldrich, USA). Princíp MTT testu spočíva v metabolickej premene reagentu 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazóliumbromidu na purpurový formazán. Po 1,5 hod inkubácii buniek s MTT reagentom bol formazán rozpustený v DMSO. Následne bola spektrofotometricky odmeraná koncentrácia rozpusteného formazánového produktu pri 560 nm (GloMax TM-MultiDetection, USA), pričom množstvo formazánu je priamo úmerné metabolickej aktivite buniek.

Rovnako po 48 hod od začiatku experimentu boli bunky fixované 4 % paraformaldehydom, penetrované a farbené fluorescenčnými farbičkami: mitochondrie boli značené protilátkou voči ATP syntáza V subjednotka alfa (Cytochrome c Apoptosis ICC

Antibody Kit, abcam), jadrá boli označené 10 ug/ml Hoechst 33258 (ThermoFisher Scientific, USA).

Štatistická analýza zahŕňala jednofaktorovú a dvojfaktorovú ANOVU a Tukey post hoc test. Za signifikantne preukazné boli považované rozdiely vykazujúce $p < 0,05$.

Výsledky a diskusia

Preukázali sme signifikantný vplyv hypericínom mediovanej fotodynamickej terapie na zmenu metabolickej aktivity mitochondrií v bunkovej línii zdravých fibroblastov (HDF) (Obr. 1) a glioblastómov (U87MG) (Obr. 2) v porovnaní s kontrolou (ANOVA, Tukey post hoc test, $p < 0,01$). Celková metabolická aktivita HDF a U87MG bola po aplikácii fotodynamickej terapie signifikantne znížená v porovnaní s kontrolnou skupinou (0 J/cm^2).

Štatisticky významné zníženie metabolickej aktivity sme zaznamenali aj v skupine s kombinovanou terapiou (PDT + PBM) v porovnaní s kontrolnou skupinou, rovnako pre fibroblasty ako aj pre glioblastómy (ANOVA, Tukey post hoc test, $p < 0,0001$).

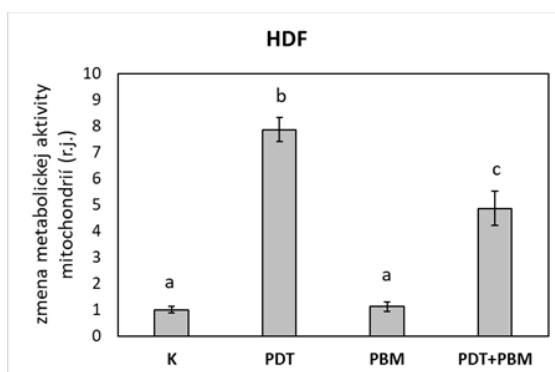
Pri porovnaní účinku samotného fotobiomodulačného žiarenia na zmenu metabolickej aktivity mitochondrií analýza nepotvrdila významný rozdiel v porovnaní s kontrolnou skupinou ani u jednej zo sledovaných bunkových kultúr (Obr. 1, 2).

Dvojfaktorová analýza variancie preukázala signifikantný vplyv interakcie hypericínu s aplikovaným žiarením (ANOVA, $p < 0,0001$). Zmena metabolickej aktivity nádorových buniek glioblastómov nebola pozorovaná pri porovnávaní účinku hypericínom indukovanej fotodynamickej terapie s kombinovanou terapiou (Obr. 2). Napriek tomu, že efekt kombinovanej terapie (PDT + PBM) u HDF signifikantne znížil metabolizmus mitochondrií (ANOVA, Tukey post hoc test, $p < 0,0001$), zmena mitochondriálnej aktivity bola celkovo nižšia v porovnaní so skupinou, v ktorej bola hypericínom indukovaná fotodynamická terapia (ANOVA, Tukey post hoc test, $p < 0,01$) (Obr. 1).

Keďže sme zaznamenali rozdiel v metabolickej aktivite mitochondrií medzi skupinami PDT a PDT + PBM u HDF buniek, vizualizáciou mitochondriálnej siete sme chceli potvrdiť, či ide o poškodenie mitochondrií, alebo nie. Na obrázkoch z fluorescenčného mikroskopu, kde boli farbené mitochondriálne siete fibroblastov (Obr. 3, vľavo) je vidieť, že mitochondriálna sieť po hypericínom indukovanej PDT je sústredená hlavne v oblasti jadra a celkovo zaberá menšiu plochu v porovnaní s kombinovanou terapiou (PDT + PBM). Mitochondriálna sieť po kombinovanej terapii bola distribuovaná rovnomernejšie v celej dĺžke fibroblastov (Obr. 3, vpravo) rovnako, ako v kontrolných podmienkach. Napriek distribučnej zmene mitochondrií v HDF bunkách, nebolo preukázané poškodenie mitochondrií.

Indukovaný fotobiomodulačný efekt je najčastejšie študovaný v kontexte jeho pozitívneho regeneračného vplyvu na tkanivá [6], avšak na druhej strane, bol potvrdený aj účinok PBM ako možného zosilňovača fotodynamickej liečby na bunkách glioblastómov. Metabolická aktivita nádorových buniek U87MG po kombinovanej terapii (PBM + PDT) bola výraznejšia v porovnaní so zdravými bunkami fibroblastov [7]. To sa však v našej štúdii nepotvrdilo. Dôvodom môže byť nižšia koncentrácia aplikovaného hypericínu a inak nastavený terapeutický protokol. Autori Pevná a kol. (2022) totiž vystavili bunky najprv fotobiomodulačnému žiareniu a následne bola aplikovaná PDT. Pôsobenie PBM v kontexte zvýšenej účinnosti PDT vysvetľujú tak, že PBM môže pôsobiť ako amplifikátor tvorby vezikúl a stimulácie autofágie. Čím je viac vezikúl prítomných pred aplikáciou PDT, tým viac molekúl hypericínu je schopných sa na membrány vezikúl viazať. Po aplikácii svetla s vlnovou dĺžkou 590 nm dochádza k aktivácii hypericínu a zvýšenej produkcii ROS, ktoré vedú k bunkovej smrti [7].

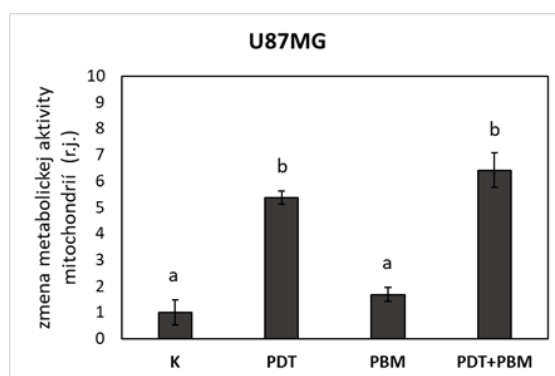
Na druhej strane, v súlade s uvedenou prácou [7] zostáva nami analyzovaný výsledok merania metabolickej aktivity HDF buniek, kde kombinovaná terapia pôsobila na fibroblasty menej cytotoxicky v porovnaní s U87MG. Zdá sa, že poradie v akom za sebou nasledujú jednotlivé kroky kombinovanej terapie je kľúčový.



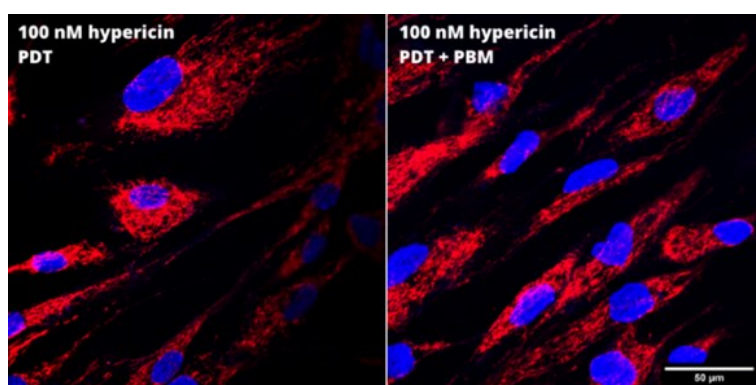
Obr. 1. Metabolická aktivita mitochondrií v bunkovej kultúre zdravých fibroblastov HDF K bunkám bol pridaný 100 nM hypericín resp. vehiculum po dobu 3 hodín. Za účelom indukcie fotodynamickej terapie (PDT) bolo aplikované svetlo ~ 590 nm (2 J/cm²). Po 24 hodinách boli bunky stimulované fotobiomodulačným žiarením (PBM) (808 nm, 2 J/cm²). Analyzované dáta boli relativizované vzhľadom k negatívnej kontrole (vehiculum). Dáta sú prezentované ako priemer ± SEM. Štatisticky významné rozdiely medzi skupinami sú znázornené odlišnými písmenami (ANOVA, Tukey post hoc test, p < 0,01)

Odlišný účinok kombinovanej terapie na nádorové a zdravé bunky možno vysvetliť hypotézou o ich rozdielnom bunkovom metabolizme. Metabolizmus nádorových buniek je viac glykolytický v porovnaní so zdravými bunkami. V procese glykolýzy sa okrem produkcie ATP, produkuje aj veľké množstvo ROS [8]. Hypericínom indukovaná PDT zvyšuje oxidačný

stres rovnako v nádorových ako v nenádorových bunkách [9]. Na druhej strane, PBM hladiny ROS znižuje [5]. Na základe uvedeného môžeme predpokladať, že hladina ROS v nádorových bunkách U87MG bola vyššia v porovnaní so zdravými fibroblastami. Domnievame sa, že aditívnym účinkom PDT na hladiny ROS, je bunkový metabolizmus nádorových buniek znížený natoľko, že ani antagonisticky pôsobiace PBM v kombinovanej terapii nemá kapacitu zvýšiť bunkový metabolizmus nádorových buniek v porovnaní s PDT. Aplikácia PBM v prípade kombinovanej terapie u fibroblastov mohla pôsobiť antagonisticky k produkcii ROS, čo stačilo na to, aby bola zmena metabolickej aktivity fibroblastov signifikantne nižšia v porovnaní s PDT.



Obr. 2. Metabolická aktivita mitochondrií v bunkovej kultúre glioblastómov U87MG K bunkám bol pridaný 100 nM hypericin resp. vehiculum po dobu 3 hodín. Za účelom indukcie fotodynamickej terapie (PDT) bolo aplikované svetlo ~ 590 nm (2 J/cm^2). Po 24 hodinách boli bunky stimulované fotobiomodulačným žiarením (PBM) (808 nm, 2 J/cm^2). Analyzované dáta boli relativizované vzhľadom k negatívnej kontrole (vehiculum). Dáta sú prezentované ako priemer $\pm$ SEM. Štatisticky významné rozdiely medzi skupinami sú znázornené odlišnými písmenami (ANOVA, Tukey post hoc test, $p < 0,01$)



Obr. 3. Porovnanie mitochondriálnej siete bunkovej kultúry fibroblastov po aplikácii fotodynamickej terapie (PDT) s kombinovanou terapiou (PDT + PBM) K bunkám bol pridaný 100 nM hypericin resp. vehiculum po dobu 3 hodín. Za účelom indukcie fotodynamickej terapie (PDT) bolo aplikované svetlo ~ 590 nm (2 J/cm^2). Po 24 hodinách boli bunky stimulované fotobiomodulačným žiarením (PBM) (808 nm, 2 J/cm^2). Protilátka na farbenie mitochondrií – komplexu V- je znázornená červenou farbou. Hoechst sa použil na kontrastné farbenie jadier (modrá)

Máme za to, že náš výskum v oblasti fotodynamickej terapie v kombinácii s fotobiomoduláciou môže prispieť k lepšiemu pochopeniu mechanizmu PBM, a to v kontexte jeho účinku na bunkový metabolizmus nádorových a nenádorových buniek.

Záver

Naše výsledky ukázali, že hypericínom sprostredkovaná PDT významne znížila metabolickú aktivitu ako zdravých (HDF), tak aj nádorových (U87MG) buniek. Metabolizmus HDF buniek bol po kombinovanej terapii (PDT + PBM) signifikantne vyšší v porovnaní s PDT, pričom tento efekt nebol dokázaný v bunkovej kultúre glioblastómov. Je teda zrejmé, že účinok PBM žiarenia môže modulovať účinok fotodynamickej terapie v kontexte zmien na úrovni bunkového metabolizmu. Preukázaný odlišný účinok kombinovanej terapie na zdravé bunky v porovnaní s nádorovými potencuje ďalšie štúdium účinku fotobiomodulačného žiarenia ako podpornej terapeutickej liečby po indukovanej fotodynamickej terapii.

PodĎakovanie

Práca bola podporená grantami APVV-20-0340 a BioPickmol ITMS2014+: 313011AUW6.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Miller K. D., Ostrom Q. T., Kruchko C., et al. (2021) Cancer J. Clin. 71(5), p. 381
- [2] Tamimi A. F., Juweid M. (2017) Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. In: De Vleeschouwer S. (ed) Glioblastoma [Internet]. Codon Publications, Brisbane, Australia, p. 1
- [3] Bartusik-Aebischer D., Źołyński A., Barnaś E., et al. (2022) Molecules 27(20), p. 6847
- [4] Kwiatkowski S., Knap B., Przystupski D., et al. (2018) Biomed. Pharmacother. 106, p. 1098
- [5] Fallahi F., Mostafavinia A., Sharifi Z., et al. (2023) Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc. 285, p. 121835
- [6] Dompe C., Moncrieff L., Matys J., et al. (2020) J. Clin. Med. 9(6), p. 1724
- [7] Pevna V., Horvath D., Wagnieres G., et al. (2022) J. Photochem. Photobiol. B. 234, p. 112539
- [8] Gorrini C., Harris I. S., Mak T. W. (2013) Nat. Rev. Drug Discov. 12, p. 931
- [9] Sai D. L., Lee J., Nguyen D. L., et al. (2021) Exp. Mol. Med. 53(4), p. 495

Asociácia expresie génov vybraných komponentov transláznej syntézy DNA s rezistenciou bunkových línií nádorov zo zárodočných buniek na cisplatinu

Eveline Órásová¹, Andrea Holíčková¹, Jan Roška¹, Ivana Valicová², Danica Ivovič¹, Pavlína Kabelíková¹, Dana Jurkovičová¹, Miroslav Chovanec¹

¹*Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Ústav experimentálnej onkológie, Oddelenie genetiky, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika; eveline.orasova@savba.sk*

²*Slovenská technická univerzita, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika*

Abstract

Association of expression of selected components of translesion DNA synthesis with cisplatin resistance in germ cell tumours

Testicular germ cell tumours (GCTs) mostly affect young males. It has been reported that 95% of patients receiving standard cisplatin (CDDP)-based chemotherapy show excellent treatment outcomes, while approx. 5-10 % of patients develop CDDP resistance. The cytostatic effects of CDDP reside in induction of DNA damage and aberrant DNA repair could partake in chemoresistance development. We investigated differences in expression of translesion DNA synthesis (TLS) components in six GCT cell lines and their CDDP-resistant derivatives. We observed increased expression of RAD18 E3 ubiquitin ligase in CDDP-resistant derivatives and cell line-specific changes in expression of other analyzed TLS factors. We propose that increased expression of the TLS components may serve as a marker of chemoresistance and as a potential therapeutic target. However, further research and is required to better understand the role of TLS in development of CDDP resistance in GCTs.

Keywords: *germ cell tumours; cisplatin; translesion DNA synthesis; chemoresistance*

Úvod a formulácia cieľa

Testikulárne nádory zo zárodočných buniek (TGCTs) patria medzi najčastejšie sa vyskytujúce malígne ochorenia mladých mužov s neustále stúpajúcou incidenciou. TGCTs sú výnimočne dobre liečiteľné chemoterapiou na báze cisplatiny (CDDP). Konvenčná chemoterapia spolu s chirurgickým odstránením tumoru poskytuje až 95,3 % päťročnú mieru prežitia u pacientov s lokalizovaným ochorením a 73,7 % mieru prežitia u pacientov s diseminovaným ochorením [1]. Približne 5 % všetkých pacientov s TGCTs a 10-20 % pacientov s metastatickým ochorením je však rezistentných voči CDDP v dôsledku čoho nedosiahne úplnú trvalú remisiu [2 – 3]. Pacienti, ktorí nedosiahnu remisiu ani po vysoko dávkovej záchrannej chemoterapii majú extrémne zlú prognózu a väčšina z nich ochoreniu napokon podľahne [4]. Zhubné nádory ovariálnych zárodočných buniek, medzi ktoré patria aj nádory žltkového vaku (YSTs) tvoria 1-2 % všetkých zhubných nádorov ovárií a zvyčajne postihujú ženy mladšie ako 35 rokov. YSTs sa taktiež ako TGCTs liečia chemoterapiou na báze CDDP a ak ochorenie na danú liečbu neodpovedá, prognóza pacientiek býva

nepriaznivá [5].

Existuje viacero možných mechanizmov rezistencie voči CDDP. Keďže cytostatický účinok CDDP spočíva v indukcii poškodenia DNA, aberantná oprava a/alebo tolerancia poškodenia DNA by mohli mať významný podiel na chemorezistencii voči tomuto liečivu [6 – 7]. Tolerancia poškodenia DNA prostredníctvom transláznej syntézy DNA (TLS) je už niekoľko rokov študovaná v rámci viacerých malignít. V nedávnej štúdii zvyšovala inaktivácia regulačnej podjednotky transláznej polymerázy zeta (Pol ζ) - REV7, chemosenzitivitu buniek TGCTs so získanou rezistenciou voči CDDP v podmienkach *in vitro* aj *in vivo* [8]. Ostatné komponenty TLS však v TGCTs zatiaľ študované neboli. Timmerman a kol. (2022) identifikovali amplifikáciu oblasti chromozómu 3p25.3 v bunkových líniiach GCTs rezistentných voči CDDP, pričom počet jej kópií koreloval so stupňom rezistencie. Vyššia frekvencia amplifikácie tejto oblasti bola tiež detegovaná v nádoroch GCTs rezistentných voči CDDP a spojená s kratším celkovým prežívaním pacientov (OS) a prežívaním bez progresie ochorenia (PFS) [9]. Oblasť p25.3 na treťom chromozóme obsahuje gén kódujúci ubikvitín ligázu RAD18, ktorá je kľúčovým regulátorom TLS. RAD18 sprostredkúva ubikvitináciu jadrového antigénu proliferujúcich buniek (PCNA), prostredníctvom ktorej sa iniciuje výmena replikatívnej polymerázy za transláznu, čím sa spúšťa proces TLS. Jej nadprodukcia by teda potenciálne mohla prispievať k chemorezistencii voči CDDP.

Cieľom tejto práce bolo stanoviť expresiu génu *RAD18* a troch ďalších génov kódujúcich komponenty TLS, t.j. *POLI* (kóduje DNA polymerázu α), *REV7* (kóduje regulačnú podjednotku DNA polymerázy zeta) a *REV3L* (kóduje katalytickú podjednotku DNA polymerázy zeta) u šiestich parentálnych bunkových línii GCTs a od nich odvodených derivátov rezistentných voči CDDP.

Materiál a metódy

V experimentoch sme použili súbor 12 bunkových línii GCTs: NCCIT, NCCIT R, TCAM-2, TCAM-2 R, NOY-1, NOY-1 R, H12.1, H12.1D kultivované v médiu RPMI-1640 + GlutaMAXTM (Gibco) a NTERA-2, NTERA-2 R, 2102EP, 2102EP R kultivované v médiu DMEM (4,5 g/L D-glukóza, L-glutamín, - pyruvát, Gibco). Všetky kultivačné médiá pre bunkové línie boli obohatené 10 % fetálnym hovädzím sérom (Gibco) a 1 % zmesou penicilín-streptomycín (10 000 U/mL, 10 000 μ g/mL, Gibco).

Na stanovenie inhibičnej koncentrácie CDDP bunkových línii GCTs sme použili MTT test viability buniek. Bunkové línie boli kultivované v 96 jamkových platničkách v iniciálnom počte 8 000 buniek na jamku v 100 μ L príslušného kultivačného média po dobu 24 h za

štandardných inkubačných podmienok. Po 24 hodinovej inkubácii boli bunky ovplyvňované rôznymi koncentráciami CDDP: 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 a 32 $\mu\text{g/mL}$ po dobu 48 h. Po skončení ovplyvnenia bolo médium s CDDP odstránené, bunky boli premyté 1x fosfátovým pufrom (PBS) a inkubované v termostate pri 37°C po dobu 4 h v roztoku kultivačného média (100 μL) a MTT (50 μL ; 1 mg/mL; Sigma-Aldrich). Po štvorhodinovej inkubácii bol MTT roztok odstránený a bunky inkubované v 50 μL dimetylsulfoxidu (DMSO) 15 min za stáleho miešania. Následne bola zmeraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 540 nm (referenčná vlnová dĺžka: 690 nm) na xMark™ Microplate Spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories, Inc., Rakúsko). Výsledok MTT testu a inhibičný účinok CDDP na rast buniek bol v rámci jednotlivých meraní prepočítaný na percento viabilných buniek v porovnaní s kontrolou (0 $\mu\text{g/mL}$ CDDP). Pre konečný výsledok bol MTT test pre každú bunkovú líniu opakovaný v troch biologických a ôsmich technických replikách.

Na izoláciu celkovej RNA z bunkových línií bol použitý roztok TRI Reagent (Life Technologies). Koncentrácia a čistota izolovanej RNA bola stanovená spektrofotometrom NanoDrop ND-100 (Thermo Scientific, USA). Expresia sledovaných génov (*RAD18*, *POL1*, *REV3L* a *REV7*) bola stanovená pomocou RT-qPCR. Na prepis RNA do cDNA bolo použité vstupné množstvo 1,5 μg celkovej RNA a cDNA First-strand cDNA Synthesis System (Central European Biosystems, ČR). Samotná qPCR bola prevedená s použitím SYBR Premix Ex Taq II (Tli RnaseH Plus, Takara). Na priebeh reakcie bol použitý termocyklér Agilent, ARIA Real-Time PCR System s amplifikačným programom: 95°C/ 5 min, 40 cyklov 95°C/ 20 s a 60°C/ 50 s, po ktorom nasledoval cyklus krivky topenia. Amplifikácia génov bola prevedená v troch biologických a troch technických replikách. Ako kontrolné referenčné gény boli použité *PGK1* (kóduje fosfoglycerát kinázu) a *ACTB* (kóduje β -aktín).

Na štatistickú analýzu výstupov boli použité softvéry SigmaPlot 12.5 a Prism GraphPad 8.4.3. Analýza signifikancie v zmenách expresie sledovaných génov bola vyhodnocovaná z hodnôt ΔCt normalizovaných na geometrický priemer referenčných génov. V prípade parametrickej distribúcie dát bol na vyhodnotenie štatistickej signifikancie použitý nepárový t-test. V prípade neparametrickej distribúcie dát bol použitý Mann-Whitney test. Relatívnu expresiu génov ($2^{-\Delta\text{Ct}}$) uvádzame ako priemer $\pm$ SD. Maximálna inhibičná koncentrácia (IC_{50}) pre jednotlivé bunkové línie bola stanovená nelineárnou regresiou. Za štatisticky významné hodnoty sme považovali hodnoty $p < 0.05$.

Výsledky a diskusia

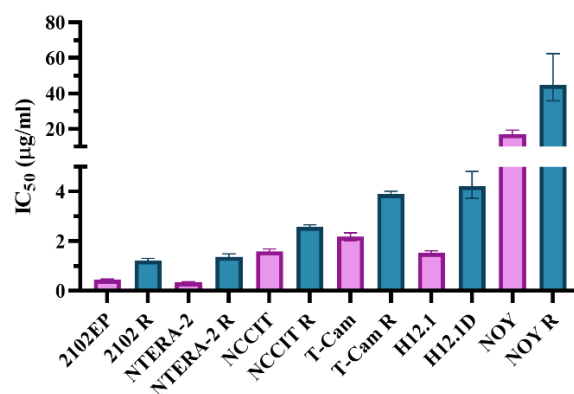
Prostredníctvom MTT testu sme pre bunkové línie GCTs stanovili hodnoty IC_{50} po 48

h ovplyvnení CDDP, na základe ktorých sme potvrdili, že jednotlivé deriváty bunkových línií sú v rôznej miere rezistentnejšie na túto látku ako ich parentálne bunkové línie (Obr. 1).

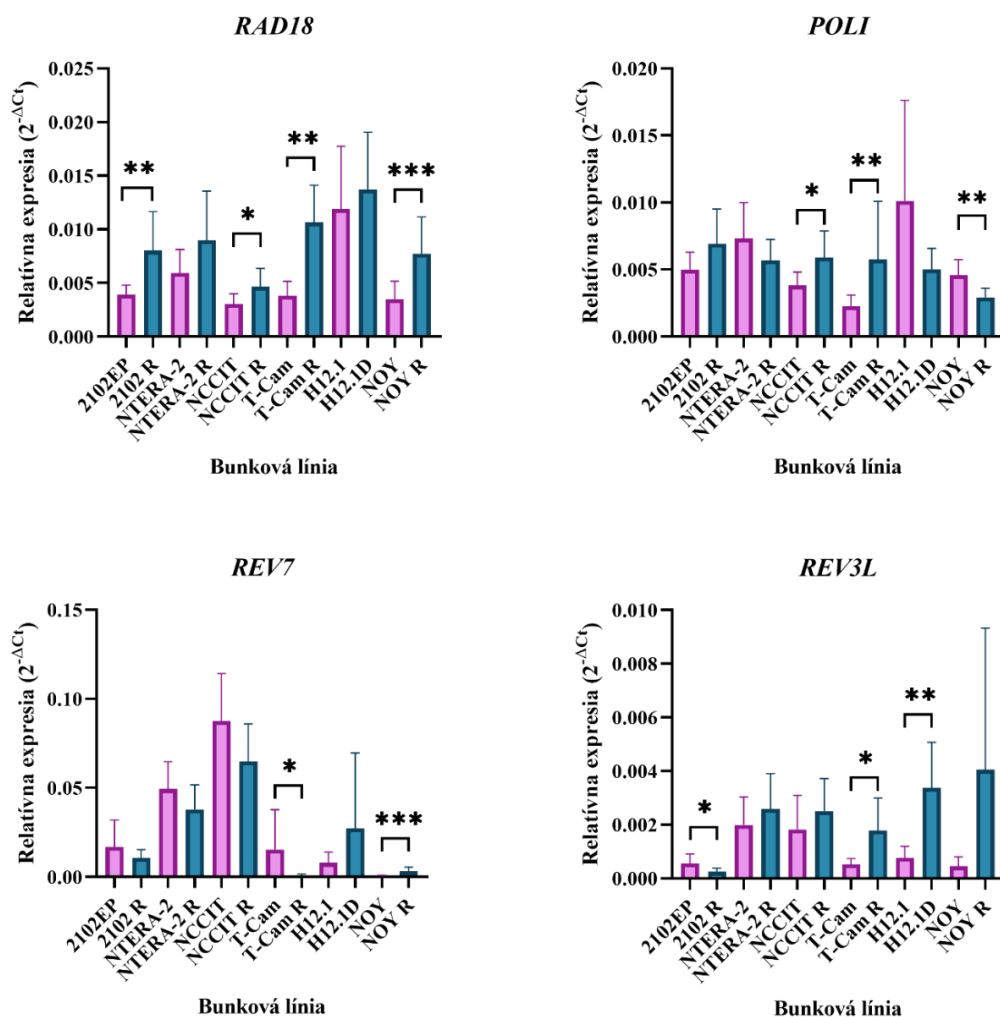
Hlavným terapeutickým cieľom CDDP je DNA, na ktorej vytvára monoaddukty, vnútro- a medzireťazcové krížne väzby a krížne väzby DNA s proteínmi. Väčšina poškodenia DNA indukovaná CDDP je opravovaná nukleotidovou excíznou opravou (NER) a homologickou rekombináciou (HR) v úzkej spolupráci s Fanconi anemia dráhou [10]. Osobitné postavenie v eliminácii cytotoxického poškodenia DNA indukovaného CDDP má TLS. *Knockdown* mRNA *REV3L* sprostredkováva hypersenzitivitu na CDDP u skvamóznych buniek karcinómu hlavy a krku [11]. Sakurai a kol. (2020) zaznamenali navodenie senzitivity na CDDP po inaktivácii *REV7* v bunkovej línii TGCT rezistentnej voči CDDP. V literatúre sa síce neuvádza účasť Pol τ na vývoji rezistencie voči CDDP a alkylačné látky, *in vitro* však dokáže vykonávať TLS v regiónoch medzireťazcových krížnych väzieb pri psoralénových adduktoch [12].

V GCTs doposiaľ nebola úloha TLS a jej jednotlivých komponentov v súvislosti s rezistenciou voči CDDP preskúmaná, zamerali sme sa teda na preskúmanie bazálnej expresie mRNA štyroch komponentov TLS – *RAD18*, *REV3L*, *REV7* a *POL1* v šiestich bunkových líniiach GCTs a od nich odvodených derivátov rezistentných voči CDDP. Vo všetkých derivovaných bunkových líniiach sme zaznamenali vyššiu relatívnu expresiu mRNA *RAD18* ako v ich parentálnych líniiach. Štatisticky významný rozdiel sme zaznamenali v líniiach 2102 R ($p = 0,0017$), NCCIT R ($p = 0,023$), T-Cam R ($p = 0,001$) a NOY R ($p < 0,001$) (Obr. 2). Tieto výsledky korešpondujú so zisteniami Timmermana a kol. (2022), ktorí zaznamenali amplifikáciu oblasti p25.3 tretieho chromozómu kódujúcej okrem iného aj gén *RAD18*, asociovanú s chemorezistenciou TGCTs voči CDDP. Zvýšená expresia *RAD18* by tak potenciálne mohla v rezistentných GCTs v reakcii na CDDP podnecovať bunky k zvýšenej TLS. V expresii mRNA *POL1* sa derivované bunkové línie GCTs v porovnaní s parentálnymi líniami správali heterogénne. Niektoré derivované línie vykazovali vyššiu expresiu tejto polymerázy, štatisticky významne v NCCIT R ($p = 0,026$) a T-Cam R ($p = 0,0028$) a niektoré nižšiu, významne v NOY R ($p = 0,0017$). V štyroch derivovaných líniiach sme zaznamenali nižšiu expresiu *REV7* v porovnaní s parentálnymi líniami, signifikantne v T-Cam R ($p = 0,0101$) a v troch vyššiu, signifikantne v NOY R ($p < 0,001$). Relatívna expresia *REV3L* bola u všetkých derivovaných línií vyššia, signifikantne v T-Cam R ($p = 0,0285$) a H12.1D ($p = 0,006$) s výnimkou línie 2102 R, kde sme zaznamenali signifikantne nižšiu ($p = 0,048$) expresiu tohto génu v porovnaní s parentálnou líniiou (Obr. 2). Pretože sú GCTs histologicky rôznorodou skupinou malignít, naše výsledky nie sú prekvapivé. Vďaka určitej promiskuite v obchádzaní špecifických poškodení DNA sú jednotlivé translézne DNA polymerázy do

určitej miery medzi sebou zastupiteľné.



Obr. 1. Hodnoty IC₅₀ pre jednotlivé parentálne (ružová) a derivované (modrá) bunkové línie GCTs po 48 h vplyve CDDP



Obr. 2. Relatívna expresia vybraných komponentov TLS v parentálnych a derivovaných bunkových líniách GCTs rezistentných voči CDDP A – mRNA *RAD18*, B – mRNA *POLI*, C – mRNA *REV7*, D – mRNA *REV3L*. Ružovou farbou sú znázornené parentálne bunkové línie GCTs, modrou farbou ich CDDP-rezistentné deriváty. Štatistická signifikancia: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Napriek heterogénnej expresii komponentov TLS v rámci študovaných bunkových línií sa teda domnievame, že ich kombinácia so zvýšenou expresiou *RAD18* môže kumulatívne prispievať k zvýšenej tolerancii poškodenia DNA a v konečnom dôsledku prispievať k chemorezistencii voči CDDP. Zaujímavé by teda bolo preskúmať expresiu aj ďalších kľúčových hráčov TLS, ako je napríklad REV1, Pol κ a Pol μ a zistiť, či kumulatívna expresia všetkých týchto komponentov koreluje s hodnotami IC₅₀ študovaných línií GCTs. Ak by sa táto hypotéza potvrdila, zacielenie proteín-proteínových interakcií medzi ubikvitinovaným PCNA a komponentami TLS by mohlo viesť k potlačeniu rezistencie GCTs voči CDDP.

Záver

Na základe získaných výsledkov konštatujeme, že štúdium mechanizmu TLS v GCTs môže prispieť k pochopeniu rezistencie tejto skupiny malignít voči CDDP a že inaktivácia TLS by potenciálne mohla zlepšiť odpoveď rezistentných GCTs na toto liečivo.

PodĎakovanie

Práca bola finančne podporená grantovými projektami VEGA 2/0075/23, VEGA 2/0056/21, APVV-17-0384, APVV-19-0286 a MZ SR 2019/57-BMCSAV-1.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Stevenson S. M., Lowrance W. T. (2015) Urol. Clin. N. 42, p. 269
- [2] Kelland L. (2007) Nat. Rev. Cancer 7, p. 573
- [3] Sheikine Y., Genega E., Melamed J., et al. (2012) Am. J. Cancer Res. 2, p. 153
- [4] Roska J., Jurkovicova D. (2020) Neoplasma 67(1), p. 1
- [5] Shibata K., Kajiyama H., Yamamoto E., et al. (2008) Oncology 74(1-2), p. 104
- [6] Galluzzi L., Senovilla L., Vitale I., et al. (2012) Oncogene 31(15), p. 1869
- [7] Cierna Z., Miskovska V., Roska J., et al. (2020) BMC Cancer 20(1), p. 1
- [8] Sakurai Y., Ichinoe M., Yoshida K., et al. (2020) Cancer Lett. 489, p. 100
- [9] Timmerman D. M., Eleveld T. F., Sriram S., et al. (2022) J. Clin. Oncology 40(26), p. 3077
- [10] Cavallo F., Graziani G., Antinozzi C., et al. (2012) Plos One 7(12), p. 51563
- [11] Adachi M., Ijichi K., Hasegawa Y., et al. (2008) Mol. Med. Rep. 1(5), p. 695
- [12] Smith L. A., Makarova A. V., Samson L., et al. (2012) Biochemistry 51(44), p. 8931

Štruktúrna a funkčná charakteristika SLT domény bakteriofága BFK20

Kristína Pápayová, Lucia Bocánová, Mária Kajsiková, Gabriela Bukovská

*Ústav molekulárnej biológie Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Oddelenie genomiky
a biotechnológií, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovenská republika;
kristina.papayova@savba.sk*

Abstract

Structural and functional characterization of the SLT domain of bacteriophage BFK20

Worldwide overuse of antibiotics leads to the spread of antibiotic resistance, especially among pathogenic bacteria. With renewed interest, bacteriophages and bacteriophage-derived enzymes came back into focus as new alternative antimicrobials. Bacteriophage BFK20 encodes two distinct groups of proteins able to degrade bacterial cell walls – endolysins and virion-associated peptidoglycan hydrolases (VAPGH). In our study, we characterize the properties of soluble lytic transglycosylase (SLT) located on the major tail protein gp15. The SLT domain is probably involved in the process of infection of the bacterial host. Changes in the structure and properties of proteins in relation to different lengths of the SLT region were analyzed. We evaluated the ability to form oligomeric structures, thermal stability of the proteins SLT02 and SLT05 and effect of Ca^{2+} , Mg^{2+} and Zn^{2+} cofactors.

Keywords: bacteriophages; proteins; structure; stability

Úvod a formulácia cieľa

Zvýšená prevalencia výskytu infekčných ochorení a s nimi spojená rozširujúca sa rezistencia voči antibiotikám spôsobila v posledných rokoch zvýšený dopyt po alternatívnych látkach schopných eliminovať patogénne baktérie. Bakteriofágy, ako prirodzené predátory baktérií, v priebehu životného cyklu produkujú niekoľko rôznych potenciálne lytických proteínov, ktoré využívajú na oslabenie a rozrušenie bakteriálnej bunkovej steny. Známe sú predovšetkým fágové endolýziny – proteíny produkované na konci lytického cyklu, za účelom cielennej degradácie bunkovej steny a následného uvoľnenia novovytvorených vírusových častíc do prostredia [1]. Menej známu skupinu proteínov tvoria tzv. virión asociované peptidoglykánhydrolázy, ktoré sa uplatňujú počas iniciačnej fázy fágovej infekcie [2]. Počas tohto kroku dochádza k vytvoreniu stabilného spojenia medzi bakteriofágom a baktériou pomocou fágového chvostíka. Proteín chvostíka bakteriofága BFK20 – gp15 vo svojej štruktúre obsahuje dve proteínové domény: TMP (z angl. *tape measure protein*) a SLT (solubilná lytická transglykozyláza) doménu. TMP doména ma štruktúrnú funkciu a vplýva na dĺžku fágového chvostíka [3]. SLT domény sú predovšetkým prirodzene rozšírené ako bakteriálne proteíny zúčastňujúce sa na metabolizme a lokálnej degradácii bunkovej steny počas rastu a delenia buniek [4]. U bakteriofágov je pravdepodobne hlavnou funkciou proteínov s SLT doménou zvýšenie účinnosti infekcie počas nepriaznivých podmienok

spôsobených štruktúrnymi zmenami v stene bakteriálnych buniek.

Celkovo bolo navrhnutých 8 rôznych plazmidových konštruktov obsahujúcich SLT doménu bakteriofága BFK20 s variabilnou dĺžkou vlozenej sekvencie. Cieľom bolo sledovať vplyv zloženia aminokyselinových sekvencií v úsekoch priľahlých k SLT doméne na výslednú štruktúru a vlastnosti proteínu.

Materiál a metódy

Klonovanie

Plazmidové konštrukty boli vytvorené pomocou metodík PCR a restrikčného klonovania. Na vytvorenie konštruktov sme použili bunky *E. coli* DH5 α (Thermo Scientific), klonovací vektor pSparkIV (Canvax) a expresný vektor pET28a⁺ (Invitrogen).

Expresia a izolácia proteínov

Bunky *E. coli* BL21(DE3) (Thermo Scientific) boli transformované pripravenými plazmidovými vektormi, obsahujúcimi SLT doménu, overenými pomocou sekvenovania. Expresia proteínov prebiehala počas 16 hodín pri 18 °C v tekutom TB médiu s obsahom kanamycínu (Km 50 μ g/ml) v prítomnosti 0,4 mM induktora IPTG. Exprimované SLT proteíny boli izolované pomocou afinitnej chromatografie na His-Select Nikel Affinity Gel (Sigma Aldrich) kolónach podľa pokynov výrobcu. Získané frakcie sme analyzovali pomocou SDS-PAGE elektroforézy a western blot imunodetekcie.

Zosieťovanie proteínov - crosslinking

Na zosieťovanie proteínov boli použité SLT proteíny s koncentráciou 5 mg/ml. Reakcia sa uskutočnila v roztoku obsahujúcom 50 mM HEPES pH 7,4; 150 mM NaCl a 10 % glycerol, v prítomnosti 2 % glutaraldehydu pri teplotách 4 °C, 20 °C a 30 °C po dobu 5 minút. Reakcia bola zastavená pridaním 1 M roztoku Tris-HCl pH 8,0. Jednotlivé reakcie boli analyzované pomocou SDS-PAGE elektroforézy. Sledovali sme aj vplyv kofaktorov 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂ a 0,1 mM ZnCl₂ na tvorbu vyšších oligomérnych štruktúr proteínov.

Analýza termálnej stability SLT proteínov pomocou nanoDSF

nanoDSF Prometheus systém (nanoscale differential scanning fluorimetry, Nanotemper) využíva sledovanie zmien vo fluorescencii aromatických jadier aminokyselín tryptofán a tyrozín, ktoré sa nachádzajú v štruktúre SLT proteínov. Postupná tepelná denaturácia proteínu spôsobuje zmeny v intenzite fluorescencie a vyvoláva posun emisného spektra v rozmedzí 330 – 350 nm.

Alikvotné vzorky SLT proteínov boli rozsuspendované do výslednej koncentrácie 10 mM v tlmivých roztokoch: octan sodný pH 5.0; kyselina jantárová pH 5.4; kyselina jablčná

pH 5.6; MES monohydrát pH 5.6; ADA pH 7.0; Bis-Tris propán pH 7.3; Tris-HCl pH 7.4; HEPES pH 7.5 a bicín pH 8.4 vo výslednej koncentrácii 200 mM. Denaturácia prebiehala zvyšovaním teploty od 20 °C do 90 °C s teplotným prírastkom 0,3°C/min. Zmeny vo fluorescencii boli vyhodnotené vo forme grafu ako pomer hodnôt zaznamenaných signálov pri vlnových dĺžkach F350/F330. Z týchto hodnôt boli stanovené teploty topenia (T_m). Rovnako bol pripravený skrining na zistenie účinku iónových kofaktorov vo forme zlúčenín – CaCl_2 , MgCl_2 a ZnCl_2 .

Bioinformatická analýza

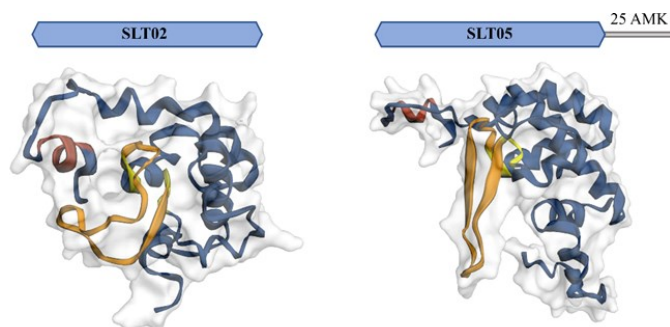
Na predikciu štruktúry SLT proteínov sme použili programy: Phyre2 - Protein Fold recognition server [5], MIB – Metal Ion Binding prediction server [6] a EzMol – Protein Display Wizard [7].

Výsledky a diskusia

Naším cieľom bolo štúdium vzťahu medzi sekvenčnými úsekmi SLT proteínov a fyziologicko-štruktúrnymi vlastnosťami pripravených rekombinantných proteínov. V jednotlivých analýzach sme porovnávali SLT proteíny SLT02 (14,2 kDa) a SLT05 (16,7 kDa) odlišujúce sa 25 aminokyselinami.

Bioinformatická analýza

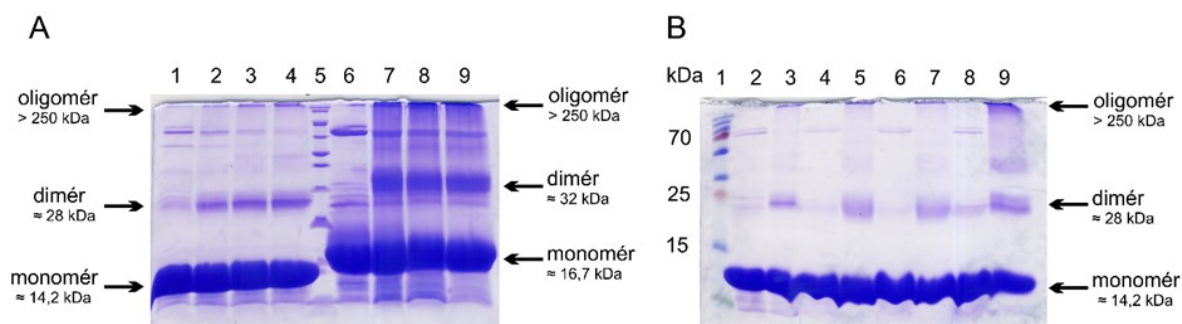
Vizualizácia 3D štruktúry SLT proteínov SLT02 a SLT05 bola navrhnutá pomocou serveru Phyre2. Získané modely boli analyzované na prítomnosť motívov schopných viazať kofaktory, ktoré by mohli ovplyvňovať aktivitu študovaných proteínov. Na predikciu schopnosti viazať ióny Ca^{2+} , Mg^{2+} a Zn^{2+} sme použili Metal Ion Binding server. Oba SLT proteíny obsahovali sekvenčné úseky so značnou afinitou voči vybraným kovovým prvkom. Na zobrazenie 3D štruktúr sme použili modelovací program EzMol. SLT02 má v porovnaní s SLT05 kompaktnejšiu štruktúru, pričom SLT05 obsahuje vystúpené úseky (Obr. 1).



Obr. 1. 3D štruktúry proteínov SLT02 (vľavo) a SLT05 (vpravo). Konzervovaná štruktúra SLT proteínov (oranžová), proteínový marker His-tag (červená).

Zosieťovanie proteínov

Viaceré fágové proteíny sú vo forme trimérnych alebo multimérnych štruktúr, ktoré zabezpečujú ich správnu funkciu [8]. Analyzovali sme schopnosť SLT proteínov vytvárať oligomérne štruktúry, a to pomocou zosieťovania činidlom glutaraldehyd. Na Obr. 2A vidno, že zvolené podmienky zosieťovania viedli k vytvoreniu dimérnych a vyšších oligomérnych štruktúr. Zosieťovanie SLT05 nemá ucelený charakter – pozorujeme vznik tzv. „smearu“, ktorý je pravdepodobne spôsobený priestorovou orientáciou vystúpených úsekov na povrchu proteínu. Zároveň sme pozorovali vznik dimérnych a oligomérnych jednotiek aj v prítomnosti kofaktorov kovových prvkov. Napriek zachovaniu rovnakých podmienok – pri použití rovnakých koncentrácií a množstva proteínu, môžeme konštatovať, že prídavok kovových kofaktorov mal vplyv na vznik väčšieho počtu oligomérnych jednotiek.

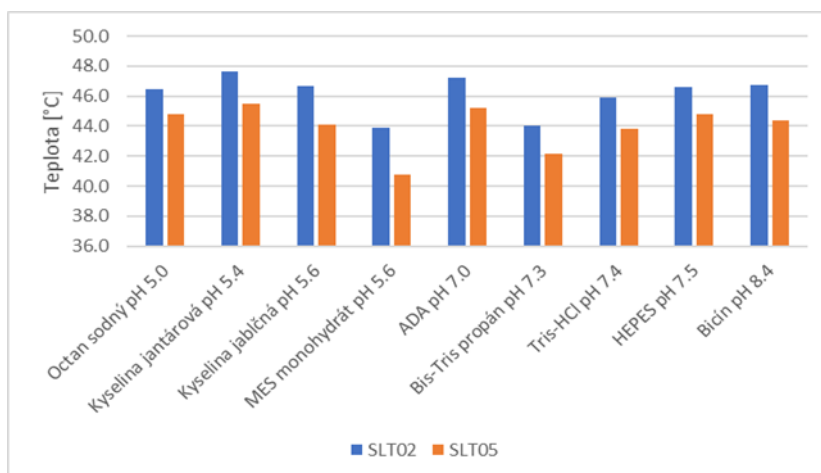


Obr. 2. A: Chemické zosieťovanie SLT proteínov. A: SLT02 1 – kontrolná vzorka bez glutaraldehydu (GD), 2 – zosieťovanie pri 4 °C, 3 – pri 20 °C, 4 – pri 30 °C, 5 – štandard molekulových hmotností Protein Ruler Broad Range (Thermo Scientific) (MW), SLT05: 6 – kontrolná vzorka, 7 – zosieťovanie pri 4 °C, 8 – pri 20 °C, 9 – pri 30 °C. B: 1 – MW, 2 – SLT02 kontrola, 3 – SLT02 + GD 4 – SLT02 + CaCl₂, 5 – SLT02 + CaCl₂ + GD, 6 – SLT02 + MgCl₂, 7 – SLT02 + MgCl₂ + GD, 8 – SLT02 + ZnCl₂, 9 – SLT02 + ZnCl₂ + GD.

Termálna stabilita SLT proteínov

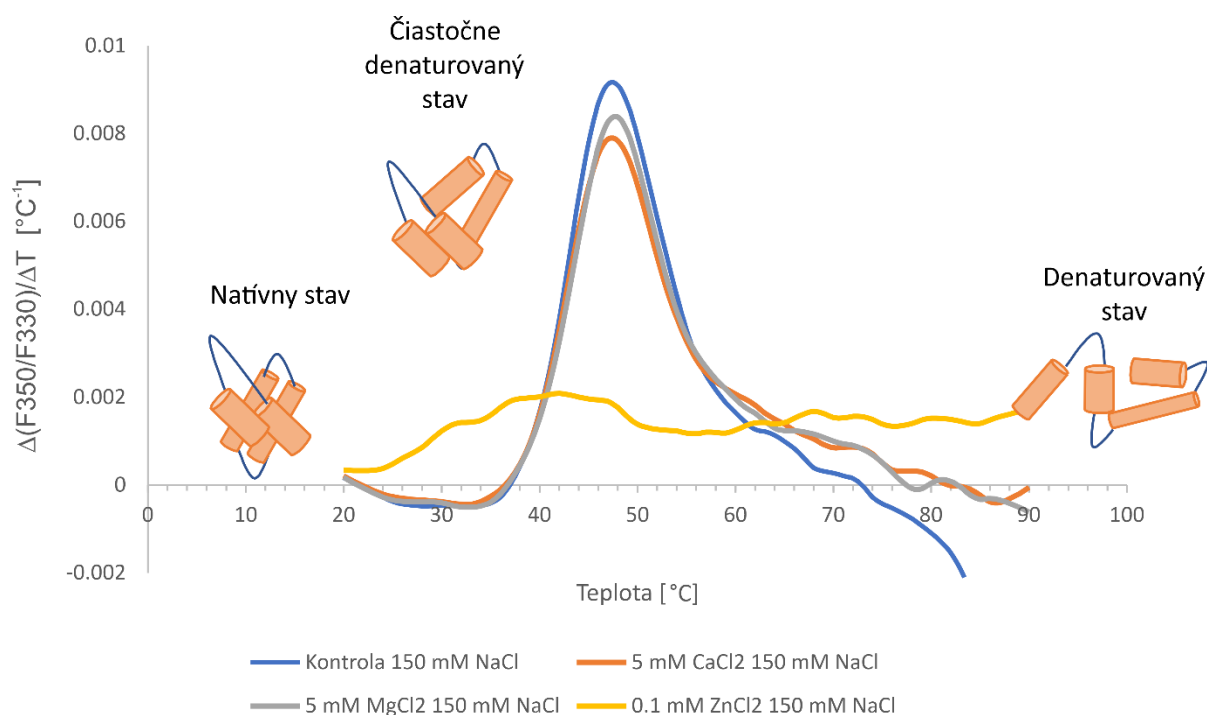
Analýza termálnej stability v rozličných podmienkach je nevyhnutná pre zistenie optimálnych podmienok pre biologické fungovanie proteínu. Najzásadnejšími faktormi sú typ a zloženie tlmivého roztoku v ktorom sa proteín nachádza, ako aj prítomnosť prídavných kofaktorov. Na Obr. 3 vidno výsledok skrínungu vplyvu pH na stabilitu proteínov SLT02 a SLT05 pomocou nanoDSF. Celkovo vo všetkých testovaných roztokoch dosahuje SLT05 nižšie hodnoty teploty topenia v porovnaní s proteínom SLT02, z čoho usudzujeme, že sekvenčné rozdiely neovplyvňujú len lokálnu konformáciu proteínu a schopnosť viazať kofaktory, ale aj celkovú stabilitu proteínu. Naopak, kompaktnejšie zbalená molekula proteínu SLT02 vykazuje vyššiu odolnosť voči zvyšujúcej sa teplote. Najvhodnejší tlmivý roztok z hľadiska stability predstavuje pre oba SLT proteíny kyselina jantárová pH 5,4, kde SLT02

dosahuje teplotu topenia $T_m = 47,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ a SLT05 $T_m = 45,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obr. 3. Termálna stabilita SLT proteínov vo vybraných tlmivých roztokoch.

Zároveň sme pomocou nanoDSF analyzovali vplyv prídavných látok – CaCl_2 , MgCl_2 a ZnCl_2 na stabilitu proteínov. Na Obr. 4 vidno, že napriek tomu že ZnCl_2 podporuje vytváranie zosieťovaných štruktúr, má zásadne negatívny vplyv na výslednú stabilitu proteínu. Tento jav možno vysvetliť tak, že ZnCl_2 destabilizuje proteínovú štruktúru – mení natívnu konformáciu proteínu a dochádza k formovaniu proteínových agregátov.



Obr. 4. Krivka denaturácie proteínu

Záver

V predloženej práci sme analyzovali rozdiely v aminokyselinových sekvenciách a ich vplyv na štruktúru a vlastnosti SLT proteínov SLT02 a SLT05. Preukázali sme, že koncová oblasť SLT05 vplýva na konformáciu výslednej molekuly proteínu. Zároveň sme zistili, že táto oblasť proteínu SLT05 do istej miery znižuje jeho teplotnú stabilitu. Prítomnosť kofaktorov Ca^{2+} a Mg^{2+} nemá zatiaľ preukázateľný pozitívny vplyv, avšak prítomnosť Zn^{2+} výrazne znižuje stabilitu SLT proteínov.

PodĎakovanie

Predložená práca bola financovaná z projektu VEGA 2/0079/22: Príprava mutantných lytických a replikačných proteínov bakteriofágov a ich antibakteriálny potenciál.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Bocanova L., Psenko M., Barák I., et al. (2022) J. Biotechnol. 359, p. 48
- [2] Moak M., Molineux I. J. (2004) Mol. Microbiol. 51(4), p. 1169
- [3] Bukovska G., Klucar L., Vlcek C., et al. (2006) Virology 348(1), p. 57
- [4] Scheurwater E., Reid C. W., Clarke A. J. (2008) Int. J. Biochem. Cell Biol. 40(4), p. 586
- [5] Phyre2: Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0 [Citované: 15. marec 2023] < <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index> >
- [6] MIB – Metal Ion Binding prediction server [Citované 16. marec 2023] < <http://combio.life.nctu.edu.tw/MIB2/> >
- [7] EzMol – Protein Display Wizard [Citované 18. Marec 2023] < <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/ezmol/> >
- [8] Bartual, S. G., Otero, J. M., Garcia-Doval, C., et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107(47), p. 20287

Rekonštrukcia fylogenie nálevníkov radu Clevelandellida s využitím sekundárnych štruktúr rRNA molekúl

Lukáš Pecina, Peter Vďačný

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra zoológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; pecina4@uniba.sk

Abstract

Reconstruction of the phylogeny of the ciliate order Clevelandellida with the use of the secondary structures of rRNA molecules

The ciliate order Clevelandellida unites endosymbionts of the digestive tract of a variety of invertebrates and vertebrates. In the present study, the primary and secondary structures of nuclear and hydrogenosomal rRNA molecules were employed to reconstruct the phylogenetic relationships and to estimate the divergence times of the Clevelandellida ciliates inhabiting the hindgut of the Panesthiinae cockroaches. According to the performed analyses, the family Clevelandellidae and all its genera represent monophyletic taxa. The last common ancestor of the family Clevelandellidae very likely emerged during the Late Cretaceous in Asia and its descendants most likely expanded to Australia together with their host cockroaches.

Keywords: 16S rRNA molecule; Clevelandellida; Nuclear rDNA cistron; Phylogeny

Úvod a formulácia cieľa

Nálevníky radu Clevelandellida de Puytorac & Grain, 1976 sú endosymbiontmi tráviaceho traktu viacerých stavovcov ako aj bezstavovcov [1]. Z piatich čeľadí zaradovaných do radu Clevelandellida boli zo zadnej časti tráviaceho traktu švábov izolovaný zástupcovia patriaci iba do čeľade Clevelandellidae Kidder, 1938 a rodu *Nyctotherus* Leidy, 1849 z čeľade Nyctotheridae Amaro, 1972 [1 – 9].

Fylogenie symbiontných nálevníkov tráviaceho traktu švábov podčeľade Panesthiinae Kirby, 1904 bola doposiaľ rekonštruovaná len s využitím jadrových molekulárných markerov [3, 5 – 7]. Predložená štúdia je zameraná na preskúmanie fylogenetických vzťahov a divergenčných časov nálevníkov obývajúcich tráviaci trakt švábov podčeľade Panesthiinae s využitím sekvencií jadrového rDNA cistronu a hydrogenozomálneho 16S rRNA génu. Popri primárnej štruktúre skúmaných molekulárných markerov bola v analýzach využitá aj informácia obsiahnutá v sekundárnych štruktúrach rRNA molekúl a intrónu ITS2.

Materiál a metódy

Nálevníky radu Clevelandellida boli izolované z tráviaceho traktu siedmich populácií švábov: *Macropanesthia rhinoceros* Saussure, 1895 z Austrálie; *Panesthia angustipennis angustipennis* (Illiger, 1801) z Khao Yai, provincia Nakhon Ratchasima, Thajsko; *Panesthia*

angustipennis cognata Bey-Bienko, 1969 z ostrova Côn Son, provincia Br Rịa–Vũng Trú, Vietnam a bližšie nešpecifikovanej lokality v Kambodži; *Panesthia* sp. z Mae Taeng, provincia Chiang Mai, Thajsko; *Salganea raggei* Roth, 1979 z provincie Yunnan, Čína; *Salganea taiwanensis taiwanensis* Roth, 1979 z bližšie neurčenej lokality vo Vietname.

Šváby boli pred pitvou usmrtené chloroformovými výparmi. Nálevníky boli z obsahu čreva zbierané pomocou upravených pipiet a umiestnené jednotlivo do mikroskúmaviek s 180 µl lyzačného roztoku CLD (Promega, Fitchburg, WI, USA). Genomická DNA bola izolovaná pomocou súpravy ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega, Fitchburg, WI, USA). Hydrogenozomálny 16S rRNA gén bol amplifikovaný pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) s využitím 16S-mtSSU-F a 16S-mtSSU-R primerov [10]. Každá PCR obsahovala 5 µl templátovej DNA, 10 µl GoTaq® Long PCR Master Mix (Promega, Fitchburg, WI, USA), 0,4 µl každého z primerov (10 pmol) a 4,2 µl deionizovanej destilovanej vody. PCR podmienky boli nasledovné: počiatočná denaturácia pri teplote 94 °C po dobu 3 minút; 5 cyklov s teplotami 94 °C po dobu 30 sekúnd, 50 °C po dobu 60 sekúnd, 68 °C po dobu 75 sekúnd; 35 cyklov s teplotami 94 °C po dobu 30 sekúnd, 60 °C po dobu 60 sekúnd, 68 °C po dobu 75 sekúnd; záverečná elongácia pri teplote 68 °C po dobu 10 minút. Získané PCR produkty boli purifikované pomocou EPPiC Fast (A&A Biotechnology, Gdaňsk, Poľsko) a následne sekvenované prostredníctvom automatického sekvenátora ABI 3730 spoločnosťou Macrogen Europe B.V. (Amsterdam, Holandsko) s využitím vyššie spomenutých primerov.

Čiastkové sekvencie boli zložené do výsledných sekvencií v programe BioEdit ver. 7.2.5 [11]. Sekvencie 16S rRNA génu boli spolu so skorej získanými sekvenciami 18S rRNA génu, ITS regiónu a časti 28S rRNA génu [5 – 7] použité pri rekonštrukcii fylogenetických vzťahov a pri odhade divergenčných časov. Pri zarovnávaní jednotlivých sekvencií bola využitá spolu s primárnou štruktúrou aj informácia obsiahnutá v sekundárnych štruktúrach skúmaných molekúl. Sekundárne štruktúry hydrogenozomálnej 16S rRNA molekuly a jadrových 18S rRNA, 5,8S rRNA a 28S rRNA molekúl boli modelované pomocou R2DT [12]. Študované sekvencie boli zarovnané v programe 4SALE ver. 1.7.1 [13].

Multigénové stromy boli rekonštruované pomocou dvoch metód. Strom maximálnej vierohodnosti bol rekonštruovaný pomocou programu IQ-TREE ver. 1.6.12 [14], pričom vhodný evolučný model bol nájdený zvlášť pre jadrový rDNA cistrón a hydrogenozomálny 16S rRNA gén prostredníctvom zabudovaného programu ModelFinder [15]. Evolučné modely získané programom ModelFinder boli využité pri rekonštrukcii fylogenetických vzťahov pomocou Bayesovskej metódy v programe MrBayes on XSEDE ver. 3.2.7 [16] na portáli CIPRES ver. 3.3 [17]. Druhovité stromy spolu s odhadom divergenčných časov boli vyrábané

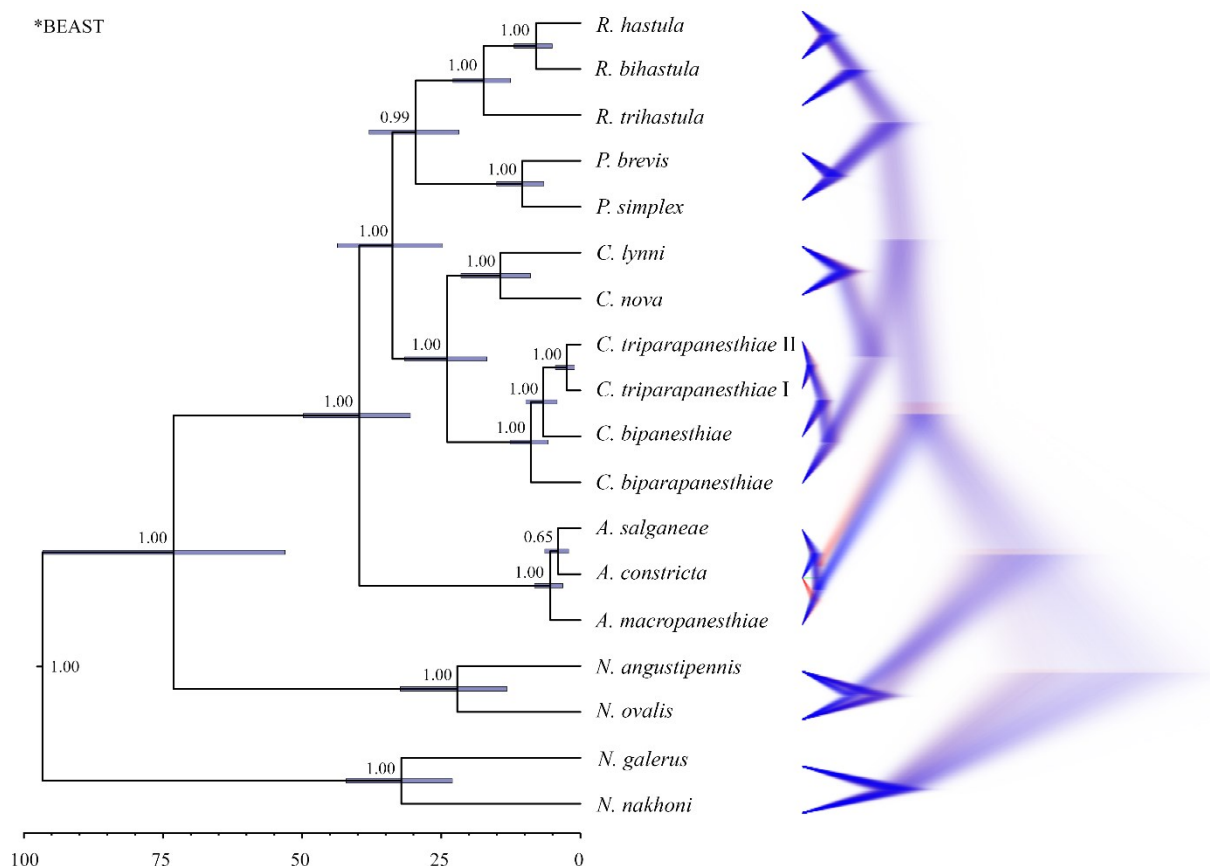
pomocou balíčka programov *BEAST ver. 2.6.7 [18], pričom molekulárne hodiny boli kalibrované na základe fylogény švábov podčelade Panesthiinae [19].

Výsledky a diskusia

Čeľaď Clevelandellidae predstavuje monofyletickú skupinu umiestnenú v parafyletickej čeľadi Nyctotheridae (obr. 1). V rámci čeľadi Clevelandellidae sa ako prvá oddelila línia reprezentujúca rod *Anteclevelandella* Pecina & Vďačný, 2022. Rod *Clevelandella* Kidder, 1938 je s vysokou štatistickou podporou sesterskou skupinou línie pozostávajúcej z rodov *Paraclevelandia* Kidder, 1937 a *Rhynchoclevelandella* Pecina & Vďačný, 2022. Fylogenetické stromy získané pomocou Bayesovskej metódy (MrBayes) a metódy maximálnej vierohodnosti (IQTree) zdieľajú takmer identickú topológiu. Jedinou výnimkou je nezhoda v rode *Anteclevelandella*, kde na základe Bayesovských analýz predstavuje *A. macropanesthiae* Pecina & Vďačný, 2022 sesterský druh zvyšných druhov tohto rodu. V prípade maximálnej vierohodnosti je *A. salganeae* Pecina & Vďačný, 2022 sesterským taxónom ku zvyšným druhom rodu *Anteclevelandella*. Rovnaké fylogenetické vzťahy medzi rodmi boli zaznamenané aj v predošlých fylogenetických štúdiách [6, 7].

Koalescenčný druhový strom (obr. 2) znázorňuje rovnaké vzťahy medzi druhmi ako multigénové stromy, pričom vzťahy v rámci fylogenetického stromu sú plne alebo silne štatisticky podporené. Výnimkou je rod *Anteclevelandella*, vo vnútri ktorého ostávajú vzťahy medzi druhmi nevyriešené. Na základe Bayesovských molekulárnych hodín vznikla čeľaď Clevelandellidae asi pred 73,1 miliónmi rokov (Ma) (95 % vierohodnostný interval 96,6 – 53,1 Ma) v neskorej kriede až eocéne. Rod *Anteclevelandella* predstavuje sesterskú líniu k zvyšným rodom čeľade a k jej vzniku prišlo pred 39,7 Ma (95 % vierohodnostný interval 49,8 – 30,6 Ma) počas eocénu až oligocénu. Rod *Clevelandella* sa oddelil asi pred 33,8 Ma (95 % vierohodnostný interval 43,7 – 24,9 Ma). Rody *Paraclevelandia* a *Rhynchoclevelandella* divergovali pred približne 30,0 Ma (95 % vierohodnostný interval 38,0 – 21,8 Ma). Podobné časy vzniku čeľade Clevelandellidae (75,67 Ma) a začiatku jej diverzifikácie (51,83 Ma) boli odhadnuté aj v predošlej štúdii, aj keď so širšími vierohodnostnými intervalmi [20]. Nálevníky čeľade Clevelandellidae, až na jednu výnimku [21], obývajú výlučne tráviaci trakt švábov podčelade Panesthiinae rozšírenej v Ázii a Austrálii [2 – 9, 22]. Na základe fylogenetických analýz sa predpokladá, že podčeľaď Panesthiinae vznikla pred približne 80 – 120 Ma v Ázii a jej zástupcovia minimálne dva razy nezávisle kolonizovali Austráliu po strete kontinentálnych šelfov Sahul a Sunda, ktoré nastalo pred približne 25 Ma [19, 22 – 25].

rhinoceros, potomka skoršej kolonizačnej vlny [19, 24], obsahoval len jeden druh nálevníka z rodu *Anteclevelandella* [7]. *Panesthia cribrata* Saussure, 1864, reprezentant neskoršej kolonizačnej vlny [19, 24], obsahoval v tráviacom trakte druhy z fylogeneticky staršieho rodu *Anteclevelandella* ako aj z mladších rodov *Clevelandella* a *Paraclevelandia* [3].



Obr. 2. Druhový strom

Fylogénéza endosymbiontných nálevníkov radu Clevelandellida izolovaných z tráviaceho traktu švábov podčel'ade Panesthiinae. Posteriórne pravdepodobnosti a 95% vierohodnostné intervaly sú uvedené pri uzloch. Horizontálna os predstavuje mierku v miliónoch rokov. Cloudogram znázorňuje nesúlad medzi uloženými stromami v stacionárnej fáze analýzy

Záver

Rad Clevelandellida združuje päť čel'adi endosymbiontných nálevníkov obývajúcich tráviaci trakt stavovcov a bezstavovcov. Sekvenčné dáta nevyhnutné pre molekulárne fylogenetické analýzy sú v súčasnosti dostupné len pre čel'ade Clevelandellidae, Nyctotheridae a Sicutophoridae Amaro, 1972, pričom z poslednej uvedenej čel'ade je dostupná len jedna sekvencia. Z hľadiska hostiteľského spektra sú molekulárne najlepšie preskúvané endosymbionty tráviaceho traktu švábov aj vďaka predloženej štúdii. Pre lepšie porozumenie evolučnej histórie radu Clevelandellida je nutné výrazne rozšíriť zber molekulárnych dát.

PodĎakovanie

Práca bola podporená grantmi APVV-19-0076, VEGA 1/0013/21 a UK/164/2023.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Lynn D. H. (2008) *The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification, and Guide to the Literature*. Springer, Dordrecht, p. 364
- [2] Kidder G. W. (1937) *Parasitology* 29, p. 163
- [3] Lynn D. H., Wright A.-D. G. (2013) *J. Eukaryot. Microbiol.* 60, p. 335
- [4] Mandal A. K., Nair K. N. (1974) *India. Acta. Protozool.* 12, p. 351
- [5] Pecina L., Vďačný P. (2020) *J. Eukaryot. Microbiol.* 67, p. 436
- [6] Pecina L., Vďačný P. (2020) *Eur. J. Taxon.* 697, p. 1
- [7] Pecina L., Vďačný P. (2022) *Zool. J. Linn. Soc.* 194, p. 1072
- [8] Vďačný P., Érseková E., Šoltys K., et al. (2018) *Sci. Rep.* 8, e17749
- [9] Yamasaki M. (1939) *Annot. Zool. Jpn.* 18, p. 65
- [10] Van Hoek A. H. A. M., Akhmanova A. S., Huynen M. A., et al. (2000) *Mol. Biol. Evol.* 17, p. 202
- [11] Hall T. A. (1999) *Nucl. Acid. S.* 41, p. 95
- [12] Sweeney B. A., Hoksza D., Nawrocki E. P., et al. (2021) *Nat. Commun.* 12, e3494
- [13] Seibel P. N., Müller T., Dandekar T., et al. (2006) *BMC Bioinform.* 7, e498
- [14] Nguyen L. T., Schmidt H. A., von Haeseler A., et al. (2015) *Mol. Biol. Evol.* 32, p. 268
- [15] Kalyaanamoorthy S., Minh B. Q., Wong T. K. F., et al. (2017) *Nat. Methods* 14, p. 587
- [16] Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., et al. (2012) *Syst. Biol.* 61, p. 539
- [17] Miller M. A., Pfeiffer W., Schwartz T. (2010) 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE), Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees, New Orleans, USA, p. 1
- [18] Bouckaert R., Heled J., Kühnert D., et al. (2014) *PloS Comput. Biol.* 10, e1003537
- [19] Beasley-Hall P. G., Rose H. A., Walker J., et al. (2021) *Syst. Entomol.* 46, p. 767
- [20] Vďačný P., Rajter L., Stoeck T., et al. (2019) *J. Eukaryot. Microbiol.* 66, p. 167
- [21] Uttangi J. C., Desai R. N. (1963) *Parasitology* 53, p. 39
- [22] Maekawa K., Lo N., Rose H. A., et al. (2003) *Proc. R. Soc. B* 270, p. 1301
- [23] Bourguignon T., Tang Q., Ho S. Y. W., et al. (2018) *Mol. Biol. Evol.* 35, p. 970
- [24] Lo N., Tong K. J., Rose H. A., et al. (2016) *Proc. R. Soc. B* 283, e20152869
- [25] Wang Z., Shi Y., Qiu Z., et al. (2017) *Sci. Rep.* 7, e3903

Ako vplýva voda na znášku a správanie nosníc

Anna Pénzešová

*Katolícka spojená škola sv. Mikuláša, Duklianska 16, 080 01 Prešov, Slovenská republika;
apenzesova2006@gmail.com*

Abstract

How water affects the laying and behaviour of laying hens

Domestic chicken is used for a variety of purposes, primarily for meat and eggs. However, how to increase the laying performance of laying hens, and at the same time support their psychological well-being and health? We decided to test the effect of different types of water on laying hens and observe the changes in both laying and behaviour. We gave our flock magnetically treated water in addition to drinking normal water throughout the year. When drinking the magnetically treated water, there was a much higher proportion of eggs with hard eggshells, indicating an improvement in the health status of the laying hens. Drinking magnetically treated water had also positive effect on the behaviour of the hens. After a year, we replaced magnetically treated water with ionised water and repeated the experiment. Again, there was an increase in laying, but we did not get so positive results in terms of the laying hens' ethology. In practice, the method of feeding magnetically treated water to laying hens may help to improve their condition and hens will also be healthier and happier.

Keywords: *hen; magnetically treated water; behavior; health; egg laying; ionised water*

Úvod a formulácia cieľa

Ako zvýšiť znášku nosníc, ale zároveň podporiť ich zdravie a psychickú pohodu? Kvôli zvýšeniu znášky skúšajú ľudia stále nové a nové spôsoby, ktoré však zvyčajne majú neblahý dopad na zdravie a pohodu nosníc. Pre čo najvyšší výnos na čo najmensej ploche sú veľmi často využívané klietkové chovy, ktoré ale nie sú pre nosnice vyhovujúce [1]. Chovatelia zvyčajne nepoznajú metódy na zvýšenie znášky bez negatívneho vplyvu na zdravie nosníc, takže si musia vyberať medzi znáškou a zdravím sliepok.

Ako drobnochovateľom nám veľmi záleží na zdraví a pohode našich nosníc. Chceli sme pomôcť zlepšiť stav nosníc vo všeobecnosti, keďže vieme, aké sú to úžasné zvieratá s obrovským potenciálom. V škole sme testovali vplyv magneticky upravenej vody na klíčenie žeruchy siatej, čo nás veľmi zaujalo. Nevedeli sme si predstaviť, ako by takáto voda mohla ovplyvniť správanie a zdravie nosníc, ale rozhodli sme sa to vyskúšať. Chceli sme otestovať metódu, ktorá je jednoduchá, dostupná, a zároveň priaznivo vplýva na zdravie aj psychickú pohodu nosníc, avšak povedie aj k zvýšeniu znášky.

Začali sme teda testovať vplyv magneticky upravenej vody na zdravie a správanie našich nosníc. Po roku zbierania výsledkov sme sa rozhodli vymeniť magneticky upravenú vodu za ionizovanú, keďže sme boli zvedaví, ako na ňu naše sliepky zareagujú.

Materiál a metódy

Magneticky sme upravili vodu pretečením cez 2 permanentné magnety značky AQUA-MAG $1\frac{1}{2}$ " so silou 12 800 gaussov. Permanentný magnet sa využíva na zmäkčovanie vody predovšetkým do pračiek, umývačiek riadu a podobných zariadení, aby sa na ohrievacom telese neusadzoval vodný kameň. Magnety sme namontovali podľa návodu na sprchovaciu hadicu, cez ktorú sme púšťali vodu na plný prietok do nádoby a podávali sliepкам.

Na ionizovanie vody sme použili ionizačnú kanvicu Aquatip ION pitcher značky AQUAPHOR. Pri ionizovaní vody sa upravuje pH na zásadité. Produkujú sa záporné hydroxylové ióny, ktoré znižujú oxidačno-redukčný potenciál na -200 až -400 mV. Okrem ionizácie však táto kanvica aj vodu filtruje, čím ju zbavuje chóru, ťažkých kovov a iných škodlivín.

V januári 2022 sme jedenástim nosniciam plemena oravka (do pozorovania bolo zahrnutých všetkých 11 nosníc) počas 7 dní podávali bežnú pitnú vodu. Nosnice boli chované systémom vo voľnom výbehu s krytým prístreškom, pričom mali každý deň približne 9 hodín denné svetlo + 2 hodiny umelé osvetlenie. Počas siedmych dní sme vyzbierali všetky vajcia, ktoré nosnice zniesli, spolu 50 kusov. Tieto vajcia považujeme za kontrolnú skupinu. Odmerali sme ich dĺžku aj šírku pomocou posuvného meradla s nóniusom. Odvážili sme ich pomocou lyžicovej váhy s presnosťou 0,1 gramu značky SilverCrest, následne aj hmotnosť žĺtka a škrupiny a dopočítali sme hmotnosť bielka. Nasledujúci týždeň sme nosniciam podávali magneticky upravenú vodu a zopakovali sme predošlý postup, ale do pokusu sme zahrnuli rovnaký počet vajec (50 kusov). Vypočítali sme tiež strednú chybu priemeru a variačný koeficient. Výsledky sme graficky spracovali a porovnali.

Počas roka 2022 sme realizovali pokus s magneticky upravenou vodou každý druhý mesiac, v marci, máji, júli, septembri a novembri. Týždeň sme nosniciam podávali magneticky upravenú vodu, vyzbierali sme 50 vajec, odvážili sme ich a pomerali sme ich dĺžku a šírku a posúdili sme pevnosť škrupiny na pohmat. Vyzbierali sme aj 50 kontrolných vajec v prestávkach pri pití bežnej vody a zopakovali sme postup ako pri pití magneticky upravenej vody. Tiež sme pozorovali prípadné kondičné zmeny a zmeny správania.

Správanie nosníc pozorovali v domácich podmienkach 2 pozorovatelia, teda chovateľ a konzultant. Pozorovali sme správanie nosníc v krdli, ako aj so zameraním na každého jedinca samostatne. Zamerali sme sa predovšetkým na faktory poukazujúce na zdravotný stav nosníc, teda komunikatívnosť nosníc, správanie voči ostatným členkám krdľa, zapájanie sa do života krdľa, ochotu učiť sa a tráviť čas v spoločnosti chovateľa. Nosnice sme pozorovali pri pití bežnej, magneticky upravenej a neskôr aj ionizovanej vody. Zamerali sme sa zvlášť na

pozorovanie kondičného stavu starších nosníc vo veku 4 roky (na začiatku pozorovania, v súčasnosti 5 rokov). Zamerali sme sa na pozorovanie intenzity pohybu a dĺžky trvania pohybu, chuti do jedla, ochotu zapojiť sa do diania v krdli, ale aj na celkový postoj nosnice, predovšetkým na polohu letiek na krídlach, pričom spustené letky znamenajú zhoršenie zdravotného stavu nosnice.

V januári 2023 po mesačnom napájaní obyčajnou vodou sme nosniciam týždeň podávali ionizovanú vodu a vyzbierali sme 50 vajec. Vajcia sme odmerali a odvážili rovnako ako vajcia pri pití magneticky upravenej vody, taktiež sme ohodnotili pevnosť škrupiny na pohmat. Vyzbierali sme aj 50 vajec pri pití bežnej vody ako kontrolnú vzorku a zopakovali sme postup meraní. Pozorovali sme aj správanie a kondičný stav nosníc a porovnali sme výsledky pri pití bežnej, magneticky upravenej a ionizovanej vody.

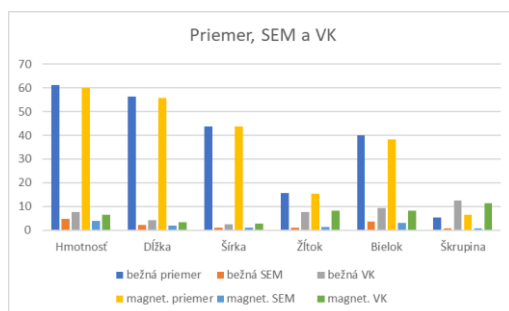
Výsledky a diskusia

Pri pití bežnej vody sa denné maximum znesených vajec pohybovalo okolo 9, za týždeň nosnice zniesli 50 vajec. Pri pití magneticky upravenej vody sa denné maximum posunulo na 11 vajec, zatiaľ čo za týždeň nosnice zniesli 58 vajec, čo predstavuje nárast znášky o 16%. Pri pití magneticky upravenej vody sme dosiahli vyšší počet znesených vajec, ale vajcia boli menšie. Neboli medzi nimi také veľké rozdiely, vajcia sa štandardizovali. Vajcia sa pri pití magneticky upravenej vody nezmenšili, iba vymizli príliš veľké vajcia so slabou škrupinou, ktoré sú nežiaduce a značia poruchu metabolizmu vápnika v organizme sliepky.

Tab. 1. Porovnanie faktorov medzi vajcami pri pití bežnej a magneticky upravenej vody

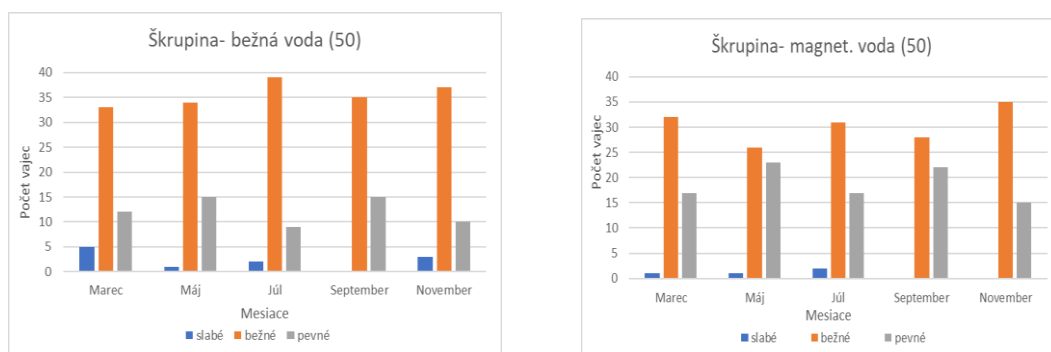
Vajcia	Hmotnosť (g)						Rozmery (mm)	
Voda	celková hmotnosť	denné min.	denné max.	žltok	bielok	škrupina	dĺžka	šírka
bežná (50)	61,13	53,10	76,50	15,45	40,21	5,46	56,5	43,7
magneticky upravená(50)	60,02	54,36	66,25	15,39	39,42	6,34	55,6	43,8
bežná-magnet. (g)	-1,11	1,26	-10,25	-0,06	-0,79	0,88	-0,9	0,01
bežná-magnet.(%)	-1,8	2,4	-13,4	-0,4	-2	16,1	-1,6	0,02

Skutočné rozdiely v znáške ukazuje variačný koeficient, ktorý je najvyšší pri hmotnosti škrupiny a najnižší pri šírke vajec (Obr. 1).



Obr. 1. Priemer, stredná chyba priemeru a variačný koeficient

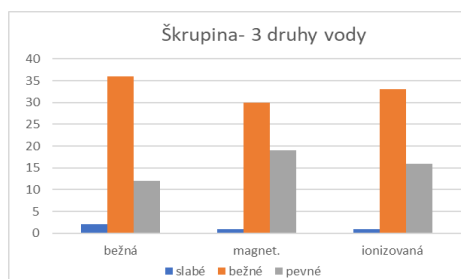
V rámci roka sme porovnali základné faktory, čiže hmotnosť, ich dĺžku, šírku a pevnosť škrupiny na pohmat pri pití bežnej (Obr. 2A) a magneticky upravenej (Obr. 2B) vody. Zvlášť sme sa zamerali na pevnosť škrupiny, keďže na nej sa najviac odzrkadľuje zdravie nosníc. Pevnosť škrupiny sa zvyčajne odráža aj na jej farbe- čím tmavšia, tým pevnejšia, ale nemusí to byť tak, preto je vhodné overiť pevnosť škrupiny aj hmatom. Rozdiely cíti aj laik.



Obr. 2. A - Škrupina- bežná voda a B - škrupina- magnet. upravená voda

Sliepky sme pozorovali predovšetkým vo výbehu, keďže v tomto prostredí trávia najviac času. Pri pití bežnej vody boli mladšie členky krdľa (1,5 roka, 9 nosníc) živé, komunikatívne. Staršie členky krdľa (4,5 roka, 2 nosnice) vyhľadávali skôr pohodu a ticho, významnejšie sa nezapájali do života krdľa. Počas týždňa, kedy bola sliepkam podávaná magneticky upravená voda boli všetky sliepky omnoho energetickejšie, veselšie a pôsobili zdravšie. Dokonca sa staršie sliepky opätovne zapojili do života krdľa a behali spolu s mladšími členkami. Pri pití ionizovanej vody sa spávanie nijak výrazne nezmenilo v porovnaní so správaním pri pití bežnej vody. Zvýšil sa počet vajec s pevnou škrupinou, ale výsledok nebol taký viditeľný ako pri pití magneticky upravenej vody. Znáška vzrástla o približne 2 vajcia denne. Porovnali sme pevnosť škrupiny pri pití bežnej, magneticky upravenej a ionizovanej vody (Obr. 3), ako aj dĺžku, šírku a hmotnosť vajec, ktoré sa významne

nelišili.



Obr. 3. Pevnosť škrupiny- 3 druhy vody

Ak by sa zaviedlo používanie magneticky upravenej vody v chovoch nosníc do praxe, umožnilo by to dosiahnuť nárast znášky, ale zároveň by sa podporilo zdravie nosníc a ich psychická pohoda. O zvýšení znášky o 10% pri pití magneticky upravenej vody sa môžeme dočítať aj v knihe „Magnetizácia vodných systémov“ od V. I. Klassena [2]. Okrem toho sa v knihe uvádza aj, že sliepky pri pití magneticky upravenej vody mali pevnejšie kosti a v chove sa znížil ich úhyn. Pri magnetickej úprave vody sa zvyšuje rozpustnosť vápenatých solí, čo znamená ich vyšší príjem pri pití takto upravenej vody. U nosníc sú bežné problémy s poruchou metabolizmu vápnika, pričom je možné, že pitie magneticky upravenej vody im pomáha sa s problémami vyrovnáť. Poruchu metabolizmu vápnika môžeme najskôr spozorovať na základe pevnosti vaječných škrupín.

Neodškriepiteľný fakt je, že magneticky upravená voda pozitívne vplýva na psychickú pohodu nosníc. Je to pravdepodobne spôsobené priaznivým vplyvom pitia magneticky upravenej vody na celkové zdravie nosnice, keďže vo všeobecnosti sú zdravé nosnice šťastnejšie. Sliepky zvyčajne hladkanie a prítomnosť chovateľa oceňujú, dokonca vyžadujú. To, že pri pití magneticky upravenej vody boli sliepky komunikatívnejšie naznačuje, že boli uvoľnené a šťastné. Tento fakt podporuje aj kniha Melissy Caughey „Co nevíme o slepicích [3],“ ktorá je zameraná na etológiu a komunikáciu sliepok. Sliepky pri pití magneticky upravenej vody pôsobili živšie, čo znamená, že ich zvýšenie znášky nijako nevyčerpalo.

Predpokladali sme, že pitie ionizovanej vody bude mať podobné účinky na nosnice, keďže voda prešla cez množstvo minerálov a navyše bola prefiltrovaná. Síce sme dosiahli nárast znášky o približne 2 vajcia denne, ale sliepky nepôsobili energetickejšie ako pri pití bežnej vody. Navyše je permanentný magnet aj po finančnej stránke dostupnejší ako ionizátor.

Záver

Napájanie nosníc magneticky upravenou vodou pôsobí priaznivo na ich psychické aj fyzické zdravie, pričom sa zvýši znáška. Sliepky pôsobia energetickejšie, vyhľadávajú spoločnosť chovateľa a živo s ním komunikujú.

Pri pití magneticky upravenej vody stúpila znáška o 16%. Zvýšenie znášky sa potvrdilo aj pri opakovanom pití magneticky upravenej vody. Tiež takmer úplne vymizli vajcia so slabou škrupinou, ktoré značia zdravotný problém nosnice, najčastejšie poruchu metabolizmu vápnika.

Pri pití ionizovanej vody sme taktiež dosiahli nárast znášky o približne 2 vajcia denne, ale nemala taký pozitívny vplyv na zdravie a pohodu nosníc ako magneticky upravená voda.

Metódu napájania nosníc magneticky upravenou vodou je možné využívať na zvýšenie znášky a zároveň podporu zdravia nosníc. Je dostupná pre všetkých, keďže permanentné magnety sú voľne dostupné, a to aj po finančnej stránke. Táto metóda môže pomôcť chovateľom, ale pomôže predovšetkým nosniciam. Sliepky sú úžasné bytosti s obrovským potenciálom a zaslúžia si, aby sme na nebrali väčší ohľad.

PodĎakovanie

V prvom rade chcem poďakovať pani učiteľke RNDr. Miriam Feretovej z Katolíckej spojenej školy sv. Mikuláša a doc. MVDr. Branislavovi Petrkovi, DrSc. z Univerzity veterinárneho lekárstva a farmácie za pomoc a odborné vedenie pri realizácii projektu. Ďalej chcem poďakovať Ing. RNDr. Andrei Džubinskej, PhD. (CPM-TIP, UPJŠ) za odbornú pomoc a konzultácie pri magnetických meraniach a prof. RNDr. Mariánovi Reiffersovi, DrSc. za sprostredkovanie meraní na Prešovskej univerzite v Prešove.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Nagy J. (2011) Hygiena mäsa hydiny, vajec a zveriny- 2. vydanie. Edičné vydavateľstvo Univerzity veterinárneho lekárstva a farmácie v Košiciach, Košice, p. 282
- [2] Klassen V. I. (1984) Magnetizácia vodných systémov. Vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry, Bratislava, p. 244
- [3] Caugheyová M. (2019) Co nevíme o slepicích- 1. vydanie. Euromedia Group – Esence, Praha, p. 11

Fotodynamická inaktivácia rickettsiových infekcií s použitím uhlíkových kvantových bodiek

Yevheniy-Yuliy Yevhenovych Peresh^{1,3}, Mária Kováčová², Zdenko Špitalský², Ľudovít Škultéty¹, Eva Špitalská¹

¹Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Virologický ústav, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika; peresh2@uniba.sk

²Ústav polymérov Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovenská republika

³Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Photodynamic inactivation of rickettsial infections using quantum dots (QDs)

Tick-borne rickettsioses belong to the oldest known tick-borne diseases. Ticks are epidemiologically important vectors transmitting various *Rickettsia* species including *R. helvetica*, *R. conori* and *R. slovaca* across Europe. The increasing prevalence of microbial infections and the resistance to antibiotics created a critical health menace worldwide. Carbon quantum dots (CQDs) are a new type of fluorescent nanomaterial. Photodynamic inactivation (PDI) can produce photoelectron excitation energy in the bactericidal process. PDI in the presence of CQDs with citric acid results in high-efficiency bactericidal activity towards various bacterial species. CQDs show excellent therapeutic and prophylactic efficacy in treating bacterial infections.

Keywords: photodynamic therapy; carbon quantum dots; rickettsial infections

Úvod a formulácia cieľa

Výskyt infekčných chorôb prenášaných vektormi, vrátane rôznych prípadov rickettsiôz, je zvýšený v dôsledku kontaktu medzi ľuďmi a vektormi článkonožcov v prírode, pričom dochádza ku kombinácii klimatických a sociálnych faktorov [1].

Rickettsie (Alphaproteobacteria; *Rickettsiales*, *Rickettsiaceae*) sú malé (0,3 až 0,5 × 0,8 až 2,0 μm) gramnegatívne obligátne intracelulárne baktérie, ktoré sa zameriavajú na vaskulárne endotelové bunky a rastú v cytoplazme eukaryotických hostiteľských buniek [2], a zapríčiňujú mierne až ťažké ochorenia. Vektormi týchto baktérií sú článkonožce (kliešte, blchy, vši a roztoče) [3].

Kliešťami prenášané rickettsiôzy, ktoré patria medzi zoonózy, patria k najstarším známym ochoreniam prenášanými kliešťami [3]. *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* a *Dermacentor marginatus* sú epidemiologicky dôležité vektory prenášajúce rôzne druhy Rickettsií vrátane *R. helvetica*, *R. conori* a *R. slovaca* po celej Európe [2, 4].

Rastúca prevalencia mikrobiálnych infekcií a rýchly vznik liekovej rezistencie voči antibiotikám predstavujú zdravotnú hrozbu na celom svete. Jednou z možností riešenia tejto

situácie je využitie uhlíkových kvantových bodiek z kyseliny citrónovej (CA-CQD) na fotodynamickú inaktiváciu (PDI), resp. terapiu (PDT). CQD sú novým typom fluorescenčného nanomateriálu vyvinutého v posledných rokoch [5]. PDT v prítomnosti CQD má vynikajúcu terapeutickú a profylaktickú účinnosť voči rôznym druhom baktérií [6]. CQD totiž generujú po absorpcii svetla superoxidový anión ($O_2^{\bullet -}$), ktorý účinne a selektívne zabíja baktérie, zatiaľ čo bunky cicavcov zostávajú nedotknuté. Z hľadiska cytotoxicity sú CQD bio- a hemokompatibilné vo veľkej terapeutickej šírke.

Majú teda veľký potenciál slúžiť na liečbu bakteriálnych infekcií ako účinná a doplnková alternatíva antibiotík [6].

Cieľom našej práce bolo potvrdiť a optimalizovať baktericídnu účinnosť pri PDI *R. conorii* v prítomnosti fotosenzibilizátora CA-CQD po ožarovaní modrým svetlom.

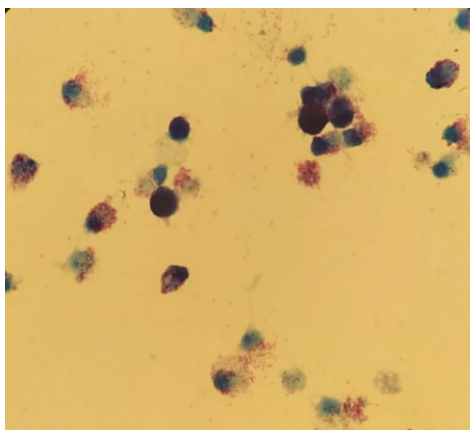
Materiál a metódy

Použitá bunková línia: VERO-stabilizovaná línia z obličiek mačička zeleného (*Cercopithecus aethiops*) zo zbierky Virologického ústavu Biomedicínskeho centra Slovenskej akadémie vied (VÚ BMC SAV). Použitá bakteriálna pasáž: *Rickettsia conorii* zo zbierky VÚ BMC SAV. Použité chemikálie: 0,08 mg/ml CA-CQD (CQD z kyseliny citrónovej) v 3 % Dulbeccovom modifikovanom médiu (DMEM). CA-CQD boli uschovávané v tme až do ich použitia.

Kultúra Vero buniek infikovaných *R. conorii* bola farbená podľa Gimeneza nasledovne: Na podložné sklíčko sme si preniesli kvapku buniek infikovaných *R. conorii* a kvapku etanolu. Následne sme preparát vysušili a fixovali nad plameňom. Preparát sme premyli cez filtračný papier bázičným fuchsínom. Po 5 min pôsobení bázičného fuchsínu sme preparát premyli vodou. Potom sme pridali cez filtračný papier malachitovú zelenú, ktorú sme nechali pôsobiť 8 s. Preparát sme znova opláchli pod tečúcou vodou a nechali vysušiť. Farbená bunková kultúra bola následne vizualizovaná inverzným mikroskopom pri 1000-násobnom zväčšení.

VERO bunky sme zo strednej kultivačnej fľašky preniesli pasážovaním na 12-jamkové mikrotitračné platničky. Po 48 h množenia VERO buniek sme infikovali bunkovú jednovrstvu baktériou *R. conorii* (obr. 1) s počtom kópií $2,5 \times 10^5$ a $2,5 \times 10^4$. Označené platničky sme uschovávali pri 34 °C v termostate s obsahom 5 % oxidu uhličitého. Po 24, 48 a 72 h inkubácie sme odstraňovali z platničiek staré médium okrem kontrolnej skupiny. Po odliatí starého média z jamiek sme k bunkovej jednovrstve pridávali roztok CA-CQD v DMEM a platničky sme 30 min ožarovali modrým svetlom (470 nm). Po každom časovom intervale sme škrabkou

odobrali infekčný materiál a do ďalšieho použitia sme ho uchovali pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na izoláciu DNA/RNA sme použili súpravu AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen) a koncentráciu *R. conorii* sme stanovili pomocou qPCR. Pred infikovaním sme popri kontrolnej skupine použili aj tzv. „predliečbu“: bunky sme ožarovali 5 min modrým svetlom.



Obr. 1. VERO bunková kultúra infikovaná *R. conorii* farbená podľa Gimeneza.

Na reverznú transkripciu izolovanej genómovej RNA na cDNA sme použili First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Na stanovenie počtu životaschopných *R. conorii* sme uskutočnili kvantitatívnu real-time PCR s využitím SuperHot Master Mix (2×) (Bioron). Použili sme CS-r a CS-f primery a próbu CS-p cielené na syntézu fragmentu *gltA* génu kódujúceho citrátsyntázu [8].

Tab. 1. Podmienky amplifikácie fragmentu *gltA* génu na kvantifikáciu rickettsii použitím real-time PCR.

Zloženie reakčnej zmesi (20 μl)		Program amplifikácie	
SuperHot Master Mix (2×)	10 μl	iniciačná teplota a čas	50 $^{\circ}\text{C}$, 2 min
miliQ H ₂ O	5,25 μl	iniciačná denaturačná teplota a čas	95 $^{\circ}\text{C}$, 2,5 min
100 mM MgCl ₂	0,5 μl	denaturačná teplota a čas	95 $^{\circ}\text{C}$, 20 s
10 pM oba primery	0,5 μl	anelačno-polymerizačná teplota a čas	60 $^{\circ}\text{C}$, 40 s
10 pM próba	0,25 μl		
DNA/miliQ H ₂ O	3 μl		

Na stanovenie rozdielu v počtoch živých kontrolných bakteriálnych buniek v porovnaní s inhibovanými bakteriálnymi bunkami sme využili Mann-Whitney U Test Calculator [9]. Výsledok je štatisticky signifikantný, ak hodnota $p < 0,05$. Efektívnosť PDI sme vypočítali ako

percento redukcie baktérií:

$$R(\%) = [(a - b)/a] \cdot 100 \%$$

I.

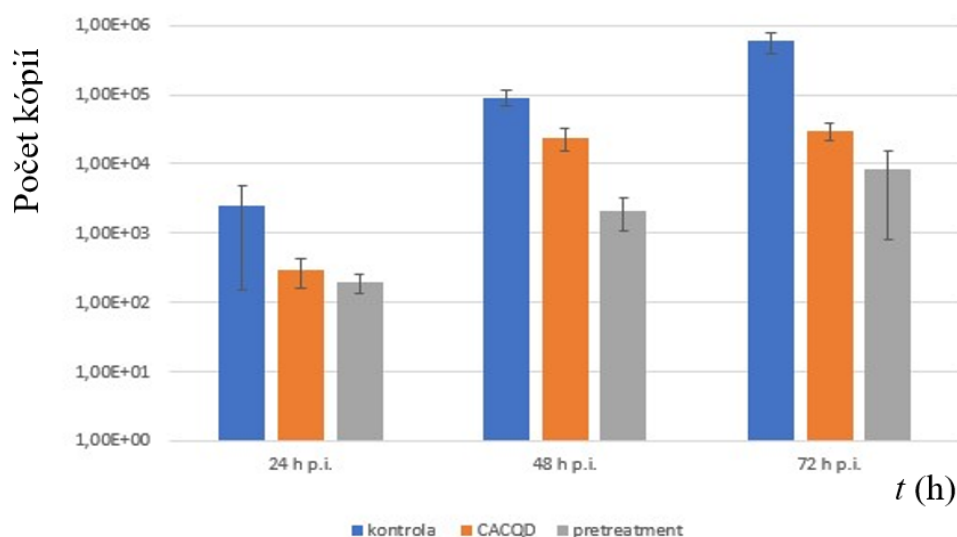
kde a je počet kópií cDNA *R. conorii*/μl v kontrolných vzorkách a b je počet kópií cDNA *R. conorii*/μl vo vzorkách po PDI [7].

Výsledky a diskusia

Pri PDI sme využili netoxický fotosenzibilizátor CA-CQD a neškodné viditeľné svetlo s vlnovou dĺžkou 470 nm. CA-CQD v prítomnosti svetla v excitovanom stave interagujú s molekulami kyslíka za vzniku reaktívnych foriem kyslíka (ROS), napr. aniónov $O_2^{\bullet-}$, ktoré majú antimikrobiálny účinok.

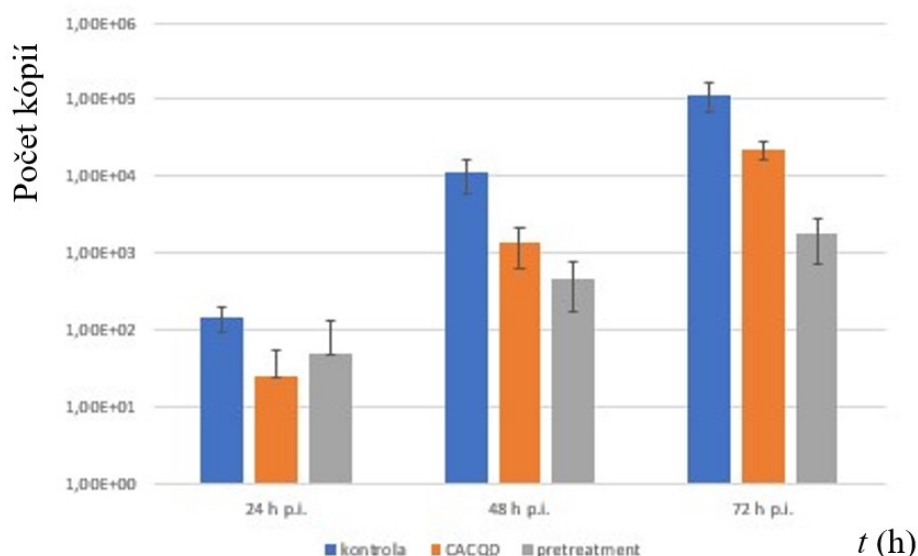
Na vyhodnotenie účinnosti PDI na *R. conorii* infekciu, sme baktérie kultivovali na VERO-stabilizovanej bunkovej línii vyššie uvedenou technikou. Keďže existuje len jedna kópia génu *R. conorii* v chromozóme, z vypočítaného počtu kópií možno odvodiť počet bakteriálnych buniek [3]. Účinnosť sme hodnotili po 24, 48 a 72 h po infekcii.

Použitím inokula $2,5 \times 10^5$ kópií *gltA* génu baktérií/μl bola efektívnosť PDI infekcie *R. conorii* 87,93 % po 24 h po infekcii, 74,36 % po 48 h, 94,84 % po 72 h a použitím „predliečby“ 92,23 % po 24 h, 97,65 % po 48 h a po 72 h 98,61 % (obr. 2). Vplyv PDI na rickettsiálnu infekciu ($2,5 \times 10^5$ kópií baktérií/μl) bol štatisticky signifikantný ($p = 0,0051$).



Obr. 2. Efektivita PDI na *R. conorii* infekciu $2,5 \times 10^5$ kópií/μl *in vitro*. Na osi x je čas uplynutý po infekcii (p. i.). Na osi y je počet kópií cDNA *R. conorii*/μl.

Účinnosť PDI na *R. conorii* infekciu pri použití inokula $2,5 \times 10^4$ kópií baktérií/ μl bola 83,33 % po 24 h ($p = 0,0051$), 87,67 % po 48 h ($p = 0,0080$) a 81,11 % po 72 h ($p = 0,0051$) a so súčasnou aplikáciou „predliečby“ bol efekt PDI po 24 h 66,46 % ($p = 0,083$), po 48 h 95,89 % ($p = 0,0051$) a po 72 h 98,47 % ($p = 0,0051$) (obr. 3). Aj v tomto prípade bol vplyv PDI na rickettsiálnu infekciu ($2,5 \times 10^4$ kópií baktérií/ μl) štatisticky signifikantný.



Obr. 3. Efektivita PDI na *R. conorii* infekciu $2,5 \times 10^4$ kópií/ μl *in vitro* Na osi x je čas uplynutý po infekcii (p. i.). Na osi y je počet kópií cDNA *R. conorii*/ μl .

Záver

V tejto štúdii sme hodnotili účinok PDI na *R. conorii* infekciu VERO buniek v prítomnosti netoxického fotosenzibilizátora CA-CQD s využitím neškodného viditeľného modrého svetla. Potvrdili sme štatisticky významnú baktericídnu účinnosť v intervale 66,5% – 98,5%. Výsledky potvrdzujú účinnosť tejto techniky pri eliminácii *R. conorii*, preto môže byť ďalej testovaná ako podporná liečba rickettsiálnych infekcií v počiatočnom štádiu.

PodĎakovanie

Táto práca bola finančne podporená projektom VEGA č. 2/0021/21.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Sekeyová Z., Socolovschi C., Spitalská E., et al. (2013) Act. Virol. 57(2), p. 180
- [2] Kim H. K. (2022) Infect. Immun. 90(9), p. 0062121

- [3] Špitalská E., Špitalský Z., Markovic Z., et al. (2018) Photodiag. Photodyn. Ther. 24, p.150
- [4] Minichová L., Hamšíková Z., Mahříková L., et al. (2017) Parasites Vectors, 10 (1), p. 158
- [5] Rajendiran K., Zhao Z., Pei DS., et al. (2019) Polymers 11(10), p. 1670
- [6] Lee I., Moon J., Lee H., et al. (2022) Biomater. Sci. 10 (24), p. 7149
- [7] Kuang W., Zhong Q., Ye X., et al. (2019) J. Nanosci. Nanotechnol. 19(7), p. 399
- [8] Stenos J., Graves S. R., Unsworth, N. B. (2005) Am. J. Trop. Med. Hyg. 73, p. 1083
- [9] Mann-Whitney U Test Calculator [15 February 2023]
<<https://www.socscistatistics.com/tests/mannwhitney/default2.aspx>>

Analýza mikrosatelitovej instability asociovanej s Lynchovým syndrómom

Nina Petrová¹, Andrej Dudáš^{1,3}, Evelína Hrčková Turňová², Marcela Bielíková^{1,3}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; petrova54@uniba.sk

²Univerzita Komenského v Bratislave, Vedecký park, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava, Slovenská republika

³Diagnostické laboratórium Slovgen s.r.o., Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Analysis of microsatellite instability associated with Lynch syndrome

Lynch syndrome (LS), previously known as hereditary non-polyposis colorectal cancer, is predisposed to a spectrum of cancers, primarily colorectal and endometrial. It is caused by inactivating germline mutations in genes that encode mismatch repair (MMR) factors. Microsatellite instability (MSI) is caused by MMR deficiency and subsequent failure to repair errors introduced during the replication of DNA. The results of its failure are seen in MSI-positive tissues: an accumulation of mutations that may affect the function of many oncogenes and tumour suppressor genes. The main goal was to analyse 100 available samples for MSI and describe the hereditary genetic risk. By using less invasive methods a suitable screening program will be proposed with the aim of preventing colorectal cancer in people with a genetic risk, as well as, in the general population.

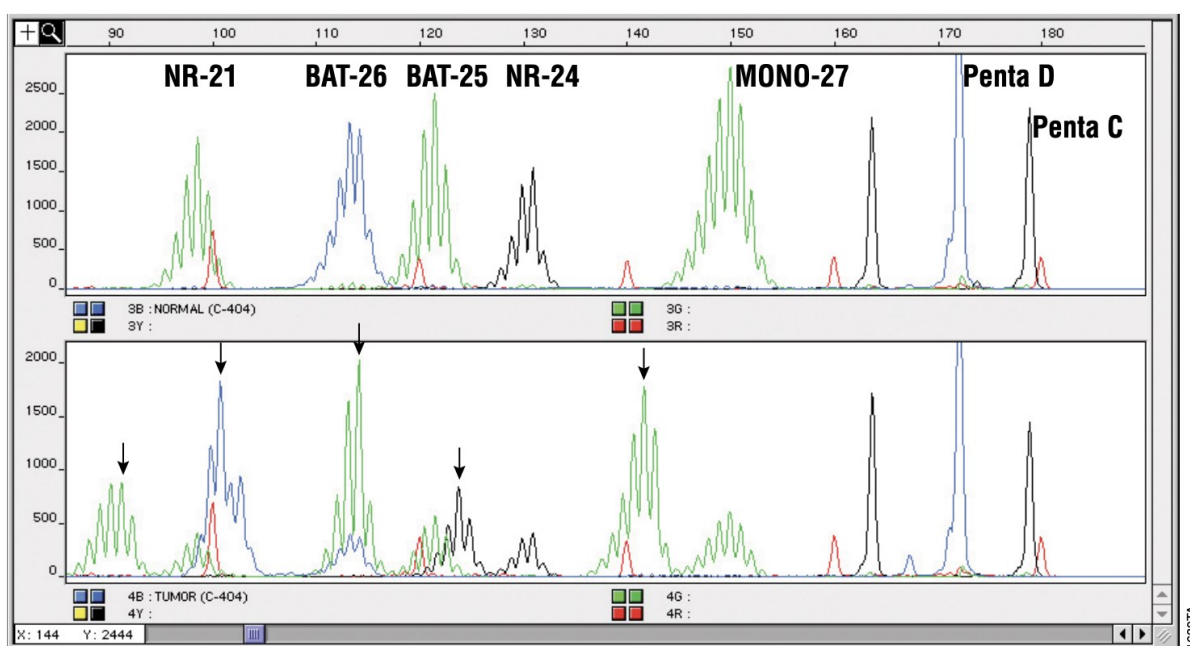
Keywords: Lynch syndrome; microsatellite instability; hereditary colorectal cancer

Úvod a formulácia cieľa

Lynchov syndróm (LS) je dedičné autozomálne dominantné ochorenie, nazývané aj hereditárny nepolypózny karcinóm kolorekta (HNPCC). Počiatky výskumu siahajú do roku 1885, kedy patológ Warthin sledoval zvýšenú predispozíciu rakoviny kolorekta, žalúdka a endometria v troch rodinách [1]. Do dnešného dňa bolo pomocou klinických štúdií a neskôr s využitím molekulárnej genetiky objavených niekoľko kauzálnych mutácií v DNA reparačných génoch - MMR systéme (mismatch repair system). Tento postreplikatívny opravný systém zaisťuje integritu genómu, opravou chybné inkorporovaných nukleotidov. Kľúčové gény, v ktorých boli identifikované mutácie sú *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* [2].

Diagnostika LS zahŕňa vyšetrenie histologického preparátu nádorového tkaniva, analýzu mikrosatelitovej instability (MSI) a imunohistologickú analýzu (IHC) expresie MMR proteínov v nádorovom tkanive. Z dôvodu špecifickosti a citlivosti bolo vytvorených viacero súborov kritérií, ktoré umožňujú dôkladný výber vysoko rizikových rodín. Títo pacienti sú odporúčaní na detekciu MSI, ktorá je dôležitým prognostickým a diagnostickým markerom [3]. Mikrosatelity sú krátke tandemové repetície (STR – short tandem repeats), opakujúcimi sa sekvenciami tvorené motívmi 1 - 6 nukleotidov, ktoré sa vyskytujú predovšetkým

v intrónových oblastiach. V dôsledku mutácií MMR reparačného systému vzniká mikrosatelitová instabilita. Mikrosatelity sú teda považované nielen za skriningový a diagnostický marker, ale aj prognostický a prediktívny biomarker [4]. Jednou z limitácií zavedených analýz je dostupnosť oboch vzoriek nádorového a zdravého tkaniva. Na Obr. 1 je analýza mikrosatelitovej instability a jej porovnanie v nádorovom tkanive a normálnom tkanive [5]. Neinvazívne metódy ako tekutá biopsia by preto mohli byť, napriek svojim momentálnym limitáciám, vhodnou alternatívou k dostupným tradičným metódam.



Obr. 1. Analýza mikrosatelitovej instability v nádorovom a zdravom tkanive. Horný panel zodpovedá normálnej vzorke a spodný panel MSI-pozitívna vzorka. Prítomnosť nových alel, ktoré neboli prítomné v normálnej vzorke, MSI označuje šípka

Cieľom práce bolo optimalizovať metódy určenia MSI z krvi ako prvotný krok skriningu a následne analyzovať skupinu vzoriek získanú zo slovenskej populácie. Súčasne overiť vhodnosť "MSI Analysis System, 1.2" ako nástroja pre prvotné posúdenie prítomnosti mikrosatelitovej instability vo vzorkách.

Materiál a metódy

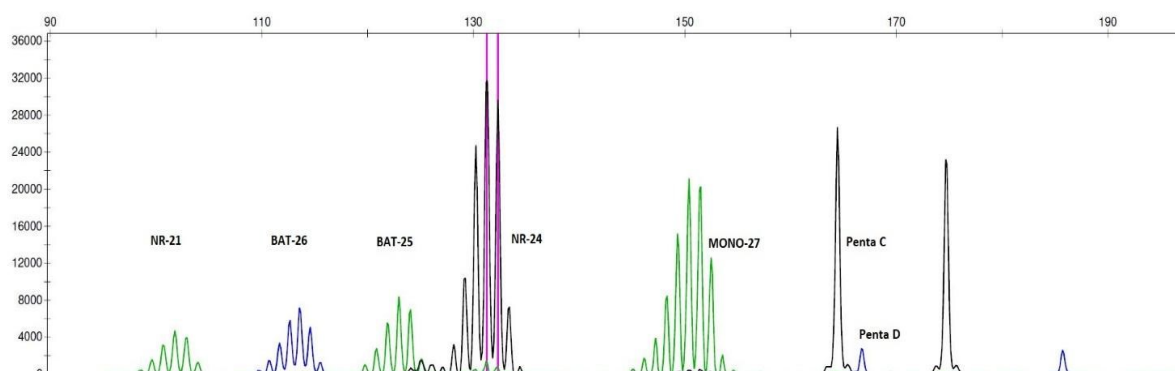
Genomická DNA bola izolovaná použitím DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) podľa návodu výrobcu. Ďalším krokom bola PCR použitím MSI Analysis System 1.2 (Promega). Metóda MSI-PCR pozostáva z fluorescenčnej multiplex PCR, ktorá využíva panel piatich monomorfných homopolymérnych markerov (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 a MONO-27)

a dvoch pentanukleotidových markerov (Penta C and Penta D). Vzniknuté fragmenty boli separované na automatickom genetickom analyzátore Applied Biosystems PRISM® 3500 Genetic Analyzer, kapilárovou elektroforézou POP-7, 54 cm. Analýza dát a špecifické spracovanie prebiehalo v programe GeneMapper®.

Výsledky a diskusia

Analyzované boli vzorky DNA sto jedincov z populačnej vetvy v rámci rozsiahleho projektu zameraného na využitie neinvazívnych metód na stanovenie mikrosatelitovej instability u pacientov s Lynchovým syndrómom a ich následne uplatnenie ako skríningového nástroja v slovenskej populácii.

Na Obr. 2 je vzorový panel nami izolovanej vzorky bez mikrosatelitovej instability. V náhodne vybraných vzorkách zo slovenskej populácie sme nedetekovali mikrosatelitovú instabilitu, to znamená, že boli mikrosatelitovo stabilné (MSS). Pilotné experimenty naznačujú, že "MSI Analysis System, Ver. 1.2" by mohol byť vhodným nástrojom pre prvé posúdenie prítomnosti mikrosatelitovej instability vo vzorkách. V rámci projektu sa bude používať aj ako verifikačný nástroj pre novo zavedené metódy pre skríning prítomnosti nádoru na báze tekutej biopsie.



Obr. 2. Analýza mikrosatelitovej instability. PCR-MSI a následná separácia kapilárnou elektroforézou nami izolovanej vzorky krvi. Po vyhodnotení a spracovaní dát je analyzovaná vzorka na obrázku mikrosatelitovo stabilná.

Záver

Zanalyzovali sme mikrosatelitovú instabilitu populačnej vetvy vzoriek (100 jedincov), ktoré budú slúžiť ako kontrola na porovnávanie s patientskymi vzorkami. Podľa očakávania sme v tejto skupine vzoriek nepozorovali mikrosatelitovú instabilitu, nakoľko sa jednalo o jedincov, ktorí nemali klinické prejavy ochorenia ani rodinnú anamnézu. V súčasnosti

v spolupráci s klinickým pracoviskom prebieha kolektovanie patientskych vzoriek, ktoré budú analyzované v ďalšej fáze projektu. Hlavným cieľom celého projektu je popísať dedičné genetické riziko v našej populácii a aj vďaka využitiu novo zavedených inovatívnych a menej invazívnych metód navrhnúť vhodný skríningový program s cieľom prevencie kolorektálneho karcinómu u ľudí s genetickým rizikom, ako aj vo všeobecnej populácii. Od zavedenia moderných neinvazívnych skríningových vyšetrení a zadefinovania vhodného skríningu v našej populácii sa očakáva zníženie výskytu a úmrtnosti spojenej s nádormi kolorekta.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Dlhodobý strategický výskum a vývoj zameraný na výskyt Lynchovho syndrómu v populácii SR a možnosti prevencie nádorov spojených s týmto syndrómom (ITMS: 313011V578), spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Lynch H. T., Snyder C. L., Shaw T. G., et. al. (2015) Nat. Rev. Cancer. 15, p. 181
- [2] Peltomäki P, Vasen H. F. (1997) Gastroenterol. 113, p. 1146
- [3] Boland C. R, Thibodeau S. N, Hamilton S. R, et al. (1998) A. Cancer Res. 58, p. 5248
- [4] Vilar E, Gruber S. B. (2010) Nat. Rev. Clin. Oncol. 7, p. 153
- [5] Promega [Citované: 21. marec 2023] <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/msi-analysis-system1-2-protocol.pdf?rev=28271666bb9d49c788f47d02b9ccb9ad&sc_lang=en>

Interakcia fluorescenčných molekúl aktívnych vo fotodynamickej terapii s mezopórovitou silikou a bunkami

Viktória Pevná¹, Ľuboš Zauška², Miroslav Almáši², Vladimír Zelenák², Pavol Miškovský^{3,4},
Veronika Huntošová⁵

¹Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta, Ústav fyzikálnych vied, Katedra Biofyziky, Jesenná 5, 04154, Košice, Slovenská republika;
viktoria.pevna@student.upjs.sk

²Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta, Ústav chemických vied, Katedra Anorganickej chémie, Moyzesova 11, 04154, Košice, Slovenská republika

³Cassovia New Industry Cluster, Mäsiarska 11, 040 01 Košice, Slovenská republika

⁴SAFTRA Photonics Ltd., Moldavská cesta 51, 040 11 Košice, Slovenská republika

⁵Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Technologický a inovačný park, Centrum interdisciplinárnych biovied, Jesenná 5, 04154, Košice, Slovenská republika

Abstract

Interaction of fluorescent molecules active in photodynamic therapy with mesoporous silica and cells
Here we present preliminary results of the interaction of photodynamically active molecules with mesoporous silica and cells. The architecture of mesoporous silica, has been exploited in the last decades for numerous applications, and allows them to bind and fill with various molecules. Our aim was to investigate the ability of microparticles to adsorb and release selected fluorescent molecules active in photodiagnostics and photodynamic therapy. Microparticles were coated with a corona of fetal bovine serum proteins, which allows better adsorption of hydrophobic molecules on the surface of the microparticles. Adsorption of ruthenium-polypyridyl complexes, curcumin, and hypericin on microparticles was observed by fluorescence spectroscopy and microscopy. Of the compounds studied, only hypericin could be distributed from the particles to cells. More in-depth studies need to be performed in the future to understand the process of redistribution of smaller silica particles in the cells.

Keywords: mesoporous silica; ruthenium-polypyridyl complex; hypericin; curcumin

Úvod a formulácia cieľa

Silikové materiály, predovšetkým mezopórovitá silika (veľkosť pórov 2 – 50 nm), predstavujú látky pomocou ktorých je možné zlepšiť rýchlosť rozpúšťania liečiv ťažko rozpustných vo vode [1]. V porovnaní s nepórovitou silikou má väčší povrch, vďaka ktorému je možné naviazať väčší objem liečiv. Rovnako je možné kontrolovať jej pórovitú architektúru v procese prípravy [2]. Jednou z výhod tohto materiálu je predovšetkým pórovitý charakter a biokompatibilita častíc. Pórovitý charakter umožňuje uzavretie a stabilizovanie molekuly liečiva vo vnútri častice [3 – 4]. Pomer veľkosti molekuly liečiva k šírke pórov siliky a interakcia molekúl liečiva so silikou bráni rekryštalizácii liečiva, čo následne zvyšuje rýchlosť jeho rozpúšťania.

V našom výskume sme sa rozhodli využiť vlastnosti SBA-15 siliky, ktorá patrí medzi často využívané formy v štúdiách transportných systémov [4 – 9] a jej vlastnosti sme

porovnávali s formuláciou SBA-16, ktorú sme si pripravili.

Viaceré štúdie dokázali, že systém SBA-15 dokáže uzavrieť a preniesť liečivo do cieľovej bunky. Predpokladá sa, že zvýšenie efektivity tohto systému by umocnilo vplyv terapií, akou je aj fotodynamická terapia, využívajúca molekulu citlivú na svetlo, svetlo danej vlnovej dĺžky a kyslík.

Cieľom tejto pilotnej práce bolo zistiť optické parametre vybraných fotocitlivých molekúl po interakcii so systémom SBA-15 a SBA-16. Taktiež sme chceli zistiť, či je možné tento fotocitlivý systém využiť pre aplikácie v biozobrazovaní a či dochádza k distribúcii študovanej molekuly z častíc do buniek. Vzhľadom k stanoveným cieľom sme sa rozhodli v tejto práci využiť metódy fluorescenčnej spektroskopie a mikroskopie.

Materiál a metódy

V práci boli použité mikročastice mezopórovitej siliky pripravené skupinou prof. Zeleňáka na Katedre anorganickej chémie UPJŠ v Košiciach. Mezopórovitá silika SBA-15 a SBA-16 bola pripravená tradičnou sól-gél syntézou. Výsledný materiál bol charakterizovaný štandardnými fyzikálno-chemickými analýzami.

Pre sledovanie interakcie materiálov s biologickou vzorkou boli v tejto práci použité ľudské dermálne fibroblasty (HDF, 106-05a, Cell, APPLICATIONS, Kanada), ktoré boli rastené v médiu RPMI (*LM-R1638/500, biosera, Nuaille, Francúzsko*) obohatené o 10 % FBS (*tel'acie fetálne sérum, Gibco-Invitrogen, Life Technologies Ltd., Paisley, VB*) a 1 % (50/50) penicilín/streptomycín (*Gibco-Invitrogen, Life Technologies Ltd., Paisley, VB*). Počas inkubácie bol bunkám zabezpečený rast v tmavej fáze za kontinuálnej vlhkosti (80 %) v prítomnosti 5 % CO₂ a 37°C. Pre mikroskopické pozorovania bola bunková línia nasadená na 35 mm Petriho misky so sklom (*SPL, Gyeonggi-do, Kórea*).

Častice SBA-15 a SBA-16 boli dispergované v 900 µl sterilného fosfátového pufru (PBS) s pH 7,4 (výsledná koncentrácia suspenzie bola 3,5 mg/ml). Následne boli sonikované 10 minút a do vzorky bolo pridané FBS o finálnej koncentrácii 10 %, ktoré zabezpečilo vytvorenie proteínovej koróny na povrchu častíc (inkubácia 60 minút pri 37°C v tme).

Do pripravenej vzorky FBS-SBA-15 a FBS-SBA-16 boli následne pridávané fluorescenčné molekuly: [Ru(Phen)₃]²⁺, [Ru(bpy)₃]²⁺, kurkumín a hypericín. Roztoky boli inkubované 2 hodiny za tmy. Prebytok FBS, ktorý nebol využitý pre vytvorenie proteínovej koróny bol odstránený centrifugáciou a vzorky boli opäť dispergované do sterilného PBS. Tento roztok nám slúžil ako zásobný roztok v ďalších experimentoch.

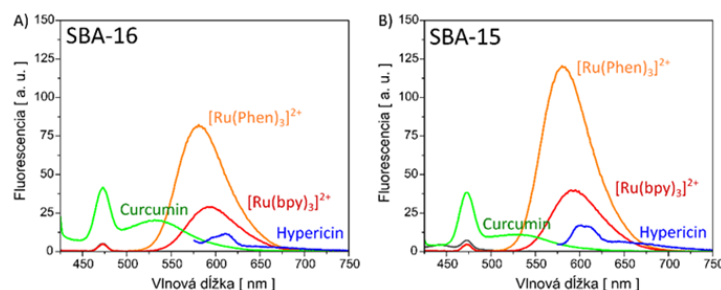
Spektrálna analýza bola vykonaná detekciou fluorescenčných spektier [Ru(Phen)₃]²⁺,

$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, kurkumínu a hypericínu v SBA-15 a SBA-16. 50 μl zo zásobného roztoku pripravených častíc bolo dispergovaných do 2 ml PBS. $[\text{Ru}(\text{Phen})_3]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ a kurkumín boli excitované vlnovou dĺžkou 405 nm a hypericín bol excitovaný 555 nm. Emisné spektrum bolo zaznamenané v oblasti od 425 nm do 750 nm a 570 nm do 750 nm, respektíve.

Fluorescenčný obraz mikročastíc siliky s fluorescenčnými molekulami bol zosnímaný fluorescenčným konfokálnym mikroskopom (*LSM Zeiss, Nemecko*) v transmisnom a fluorescenčnom móde s použitím vodného objektívu a 40-násobného zväčšenia. Fluorescenčný obraz bol zosnímaný pomocou filtrových kociek pre modrú (excitácia 365 nm, emisia 420 nm), zelenú (excitácia 450-490 nm, emisia 515-565 nm) a červenú (excitácia 546 nm, emisia 590 nm) oblasť viditeľného spektra.

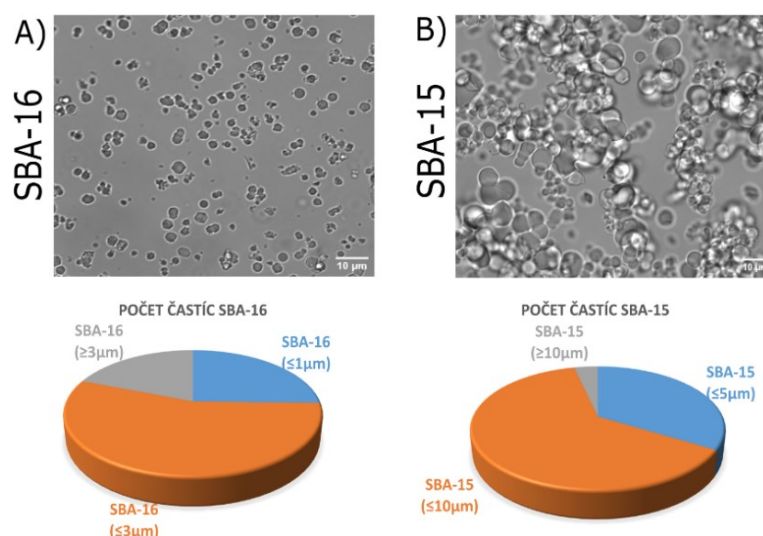
Pre sledovanie interakcie molekúl a siliky a bunkami boli HDF bunky inkubované s pripravenými časticami počas 1 hodiny za tmy. Fluorescenčný a transmisný obraz bol zosnímaný podobne ako v prípade častíc.

Výsledky a diskusia



Obr. 1. Fluorescenčné spektrá siliky s proteínovým obalom a použitými fluorescenčnými molekulami
naľavo - SBA-16+FBS; napravo - SBA-15+FBS

Všetky pripravené formulácie častíc vykazovali fluorescenčné vlastnosti. Fluorescenčné spektrum $[\text{Ru}(\text{Phen})_3]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, kurkumínu a hypericínu v SBA-16 je znázornené na Obr. 1A a SBA-15 na Obr. 1B. Najsilnejšia intenzita bola pozorovaná pre $[\text{Ru}(\text{Phen})_3]^{2+}$ a $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, ktoré majú veľmi dobré hydrofilné vlastnosti. Môžeme očakávať, že budú veľmi dobre vyplňať póry pripravených častíc. Fluorescenčné spektrá kurkumínu a hypericínu mali nižšiu intenzitu, čo môže byť spôsobené ich hydrofóbnym charakterom. Tieto výsledky naznačujú, že plnenie kurkumínu a hypericínu v póroch môže byť vodným prostredím (PBS) ovplyvnené. Navyše hypericín je známy svojím duálnym charakterom, ktorý spôsobuje absenciu jeho fluorescence vo vodnom prostredí a intenzívnu fluorescenciu v organických rozpúšťadlách a lipidickom prostredí.



Obr. 2. Mikroskopické snímky mezopórovitej siliky a pomerná distribúcia častíc vo vzorke A) SBA-16 B) SBA-15 mikročastice pokryté s FBS

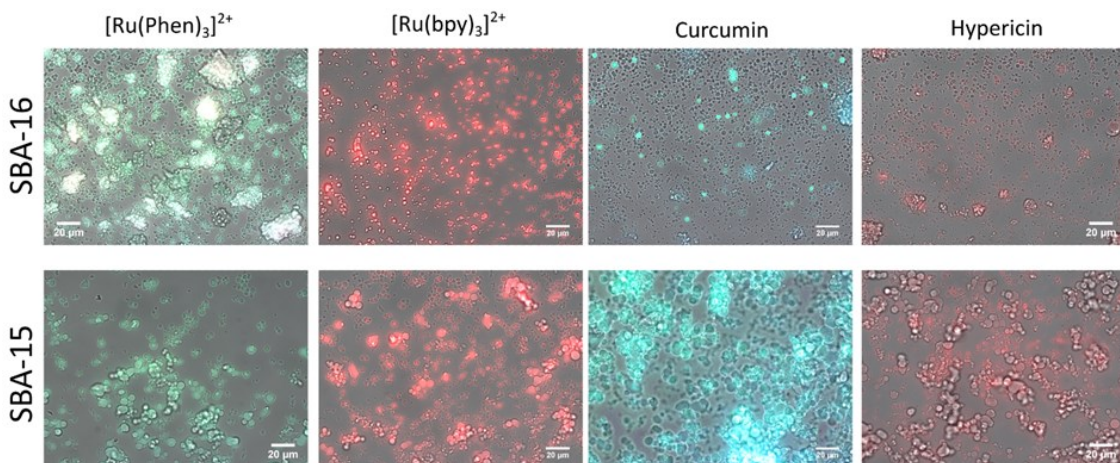
V ďalšom kroku sme pripravené častice sledovali konfokálnou fluorescenčnou mikroskopiou. Vzorka, ktorú sme pripravili nebola homogénna. Veľkosti jednotlivých častíc a ich pomerné distribúcie vo vzorke sú znázornené na Obr. 2 SBA-16 (Obr. 2A) mikročastice sú oveľa menšie ako SBA-15 (Obr. 2B). Veľkosti častíc pri skupine SBA-16 sa pohybovali v rozmedzí od 0,323 μm do 4,643 μm , pričom najväčšiu skupinu tvorili častice s veľkosťou 1-3 μm (Obr. 2A). Naproti tomu vzorka SBA-15 obsahovala častice s veľkosťou od 2,151 μm do 13,578 μm . Percentuálne najobsiahlejšiu skupinu tvorili častice s priemerom 5-10 μm (Obr. 2B).

Bolo dokázané [3], že aj napriek dobrej plniteľnosti častíc SBA-15, sa vhodnejším kandidátom pre neskoršie štúdie *in vivo* javia častice s menšou veľkosťou, nakoľko veľkosť častíc je limitáciou pri schopnosti biokompatibility. Je preto možné predpokladať, že z tohto hľadiska je pre budúci výskum vhodnejšia silika SBA-16 (Obr. 2A).

Z fluorescenčných obrazov znázornených na Obr. 3 je vidno, že obidve formulácie sú schopné adsorbovať vybrané molekuly. Zatiaľ čo ruténiové polypyridylové komplexy plne vyplňajú objem častíc, kurkumín a hypericín sú nerovnomerne distribuované a v prípade hypericínu je možné dokonca pozorovať hypericín v prstencoch vytvorených z proteínovej koróny na povrchu častíc. Vzhľadom na vynikajúce spektroskopické vlastnosti sme sa následne rozhodli pridať tieto častice k bunkám, aby sme videli, či je možné sledovať distribúciu fluorescenčných molekúl z častíc do bunky.

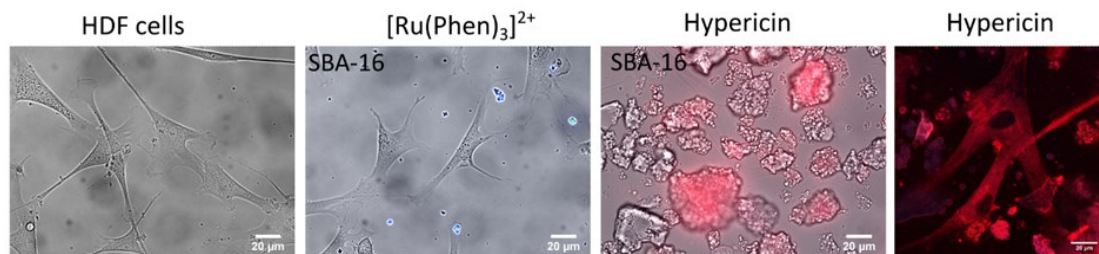
Na Obr. 4 sú znázornené prekryvové obrázky s detekčnými parametrami ako v prípade častíc. V prípade ruténiových komplexov sme pozorovali podobný charakter, a preto sme ako

reprezentatívnu vzorku vybrali $[\text{Ru}(\text{Phen})_3]^{2+}$. V prípade týchto častíc počas 1 h nebola pozorovaná výrazná distribúcia $[\text{Ru}(\text{Phen})_3]^{2+}$ z častice do buniek. Častice sme v tomto prípade znázornili modrou farbou (Obr. 4), nakoľko sme sa obmedzili len na detekciu modrou filtrovou kockou pre jednoduchšiu identifikáciu $[\text{Ru}(\text{Phen})_3]^{2+}$.



Obr. 3. Prekryv transmisného a fluorescenčného obrazu mikročastíc s $[\text{Ru}(\text{Phen})_3]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, kurkumínom a hypericínom v SBA-16 (horný rad) a SBA-15 (spodný rad). Fluorescencia odpovedá prekryvu všetkých troch kanálov (modrá, zelená a červená filtrová kocka)

V prípade kurkumínu sme nepozorovali fluorescenciu ani v bunke a nízka intenzita sa stratila aj z častíc (dáta neprezentujeme). Do istej miery to mohlo byť spôsobené nízkou testovanou koncentráciou a aj schopnosťou kurkumínu sa vo vodnom prostredí rozpadáť na iné nefluorescenčné komponenty. Tento jav bude musieť byť ešte v ďalšom výskume overený. Najväčší úspech sme dosiahli v prípade hypercínu, ktorý nie len že svietil v časticiach, ale po 1 h inkubácii ho bolo možné pozorovať v bunkách. Je nutné pripomenúť, že veľkosť študovaných častíc bola príliš veľká na penetráciu častíc do buniek. Práve preto tieto častice v bunkách pozorované ani neboli.



Obr. 4. Prekryv transmisného a fluorescenčného obrazu buniek a SBA-16 mikročastíc s $[\text{Ru}(\text{Phen})_3]^{2+}$ a hypericínom po 1 h inkubácii s HDF bunkami. Fluorescencia odpovedá prekryvu kanálov (modrá a červená filtrová kocka). Posledný obraz predstavuje snímku ffluorescencie hypercínu v časticiach a v bunkách po laserovej excitácii (555 nm) a detekcii v červenej oblasti spektra ($> 590 \text{ nm}$)

Záver

Štúdiom častíc a ich interakcie s použitými fluorescenčnými molekulami sme ukázali schopnosť mezopórovitej siliky adsorbovať molekuly kurkumín, hypericín, $[\text{Ru}(\text{Phen})_3]^{2+}$ a $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$. Fluorescenciu bolo možné detegovať pre všetky zvolené molekuly. Intenzita fluorescencie nebola distribuovaná homogénne v časticiach s hypericínom a kurkumínom, zatiaľ čo pri časticiach s ruténiovými polypyridylovými komplexmi sme zaznamenali rovnomernú distribúciu. Jedinou molekulou, u ktorej bola pozorovaná redistribúcia z častíc do buniek, bol hypericín. Hypericín sa tak javí sľubnou molekulou v ďalších štúdiách transportného systému akým je mezopórovitá silika. Biologická aktivita hypericínu bude závisieť aj od veľkosti a tvaru použitých častíc, ako bolo ukázané pri porovnaní SBA-15 a SBA-16.

PodĎakovanie

Táto publikácia bola podporená projektom PF UPJŠ v Košiciach vvgs-2022-2184, vvgs-2023-2554. Publikácia je aj výsledok implementácie projektu: OPENMED, ITMS2014+: 313011V455 a projektu BioPickmol ITMS2014+: 313011AUW6.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Van Speybroeck M., et al. (2009) J. Pharm. Sci. 98(8), p. 2648
- [2] McCarthy C. A., et al. (2016) Expert Opin. Drug. Deliv. 13(1), p. 93
- [3] Tang F., Li L., Chen D. (2012) Adv. Mater. 24(12), p. 1504
- [4] Qian M., et al. (2015) Cell Biochem. Biophys. 71, p. 127
- [5] Alkahtani S., et al. (2022) Dose-Response 20(1), p. 15593258211050532
- [6] Krajnović T., et al. (2018) Nanomaterials 8(5), p. 322
- [7] Su W., et al. (2019) Eur. J. Pharm. Sci. 134, p. 246
- [8] Qian J., Gharibi A., He S. (2009) J. Biomed. Opt. 14(1), p. 014012-014012-6
- [9] Ma X., Qu Q., Zhao Y. (2015) ACS Appl. Mater. Interfaces 7(20), p. 10671

Identifikácia reaktívnych častíc zodpovedných za genotoxické účinky nízkoteplotnej plazmy na plazmidovú DNA

Sára Pišteková¹, Stanislav Kyzek¹, Sandra Ďurčányová², Eliška Gálová¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15, Bratislava, Slovenská republika; pistekova7@uniba.sk

²Univerzita Komenského v Bratislave, Fakulta matematiky, fyziky a informatiky, Katedra experimentálnej fyziky, Mlynská dolina F1, 842 48, Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Identification of reactive species responsible for genotoxic effects of non-thermal plasma on plasmid DNA

Non-thermal plasma has a great potential in many applications, such as medicine, food industry, agriculture and sterilization. However, before applying such treatment, it is crucial to understand plasma chemistry and how reactive species within affect DNA. During plasma generation, various reactive species are created. These reactive particles can cause damage to cell structures and genetic material. As in some cases the genotoxic effects are desirable and in others are not, it is necessary to understand the molecular mechanisms behind them.

Keywords: non-thermal plasma; pBR322; DNA damage; reactive species; scavengers

Úvod a formulácia cieľa

Nízkoteplotná plazma (NTP) je čiastočne ionizovaný plyn, ktorý zvyčajne vzniká po pridaní vysokého elektrického napätia do plynu. Všeobecne sa v plazme generujú excitované elektróny (vrátane fotónov) a ióny, ktoré reagujú s okolitými molekulami. Vznikajú tak reaktívne častice (ROS/RNS), ako napríklad voľné radikály, neutrálne molekuly vrátane peroxidu vodíka (H₂O₂) a dočasné polia (teplo, akustické vlny, elektromagnetické polia). Na základe teploty častíc rozlišujeme termálnu (vysokoteplotnú) a netermálnu (nízkoteplotnú) plazmu [1]. V nízkoteplotnej plazme je nerovnovážny termodynamický stav, ktorý spôsobuje nízka teplota neutrálnych častíc a iónov. Teplota týchto častíc býva až desaťkrát nižšia oproti teplote elektrónov, kvôli ich nízkej energii. So zvyšujúcim sa tlakom dochádza k vyššiemu počtu zrážok elektrónov s neutrálnymi časticami, a tým sa zvýši aj teplota plazmy [2].

Pri ovplyvnení vody plazmou prebiehajú rôzne reakcie v kvapaline, na rozhraní kvapaliny a vzduchu (plynu) a v samotnom pracovnom plyne, v ktorom je plazma generovaná. Stabilnejšie molekuly sa rozpúšťajú vo vode a môžu sa zúčastňovať ďalších reakcií [3]. NTP zároveň emituje UV žiarenie, ktoré môže fotolyzovať molekuly a ióny, akými sú napríklad peroxid vodíka a dusitany [4]. Reaktívne častice generované v plynnej fáze nízkoteplotnej plazmy prenikajú do ovplyvnenej kvapaliny, kde sa podieľajú na ďalších reakciách. Rozpustnosť zlúčenín má vplyv na výsledné chemické zloženie kvapaliny. Molekuly ako

kyslík, ozón a oxid dusičitý sa prenášajú z plynnej do vodnej fázy ťažšie. Naopak molekuly ako peroxid vodíka, hydroxylový radikál, kyselina dusitá a dusičná prechádzajú do vodnej fázy ľahko [3]. Z kyselín dusitej a dusičnej vznikajú príslušné dusitany a dusičnany a z hydroxylových radikálov môže vznikáť peroxid vodíka. Rozpustnosť ozónu závisí od prítomnosti iných zlúčenín (napr. hydroxylového radikálu a dusitanov), ktoré s ním dokážu reagovať. Ak je zlúčenina prítomná, ozón s ňou rýchlo reaguje, pričom je potrebné alkalické prostredie [4].

Prebiehajúce reakcie spôsobia acidifikáciu vody a pH reakčnej zmesi prudko klesá so zvyšujúcou dávkou plazmy. Nízke pH tvorí vhodné prostredie pre priebeh peroxynitritových reakcií, pričom vzniká kyselina peroxodusitá, ktorá sa môže neskôr rozpadnúť na hydroxylový radikál a radikál oxidu dusičitého. Okrem peroxynitritovej chémie dochádza vo vode pri kyslom pH k reakcii peroxidu vodíka s dusitanmi za vzniku dusičnanov, vody a vodíkového protónu [3, 5].

Keďže NTP môže pri vyšších dávkach spôsobiť v bunkách oxidačný stres, ktorý vedie k poškodeniu DNA, je nevyhnutné skúmať molekulárne mechanizmy jej účinku. Poznanie týchto mechanizmov môže viesť k optimálnemu ovplyvneniu biologického materiálu, pri ktorom je poškodenie DNA žiaduce (napr. eliminácia nádorov) alebo nežiaduce (napr. ovplyvnenie zdravých buniek v oblasti nádorov).

Materiál a metódy

Pre naše experimenty sme ako zdroj DNA vybrali plazmid pBR322 (New England BioLabs) s veľkosťou 4361 bp [6]. Vzorky boli ovplyvnené plazmovými zdrojmi RPS40 (*Robust Plasma System 40*) alebo MSDBD (*Multi-hollow Surface Dielectric Barrier Discharge*) v rôznych časoch (2 až 50 s). Pri zdroji RPS40 bola plazma generovaná zo vzduchu pri atmosférickom tlaku vo vzdialenosti 5 mm od vzorky. Pri zdroji MSDBD bola plazma generovaná zo vzduchu (prietok plynu 6 l/min) pri atmosférickom tlaku vo vzdialenosti 10 mm od vzorky.

Reakčná zmes s celkovým objemom 10 µl obsahovala 6 µl destilovanej vody, 3 µl plazmidu (75 ng) a po ovplyvnení bol pridaný 1 µl fosfátového tlmivého roztoku (1 M K₂HPO₄, 1 M KH₂PO₄). Negatívna kontrola (bez ovplyvnenia) obsahovala 6 µl destilovanej vody, 3 µl plazmidu a 1 µl fosfátového tlmivého roztoku. Pozitívna kontrola obsahovala 1 µl FeSO₄·7H₂O (0,125 mM), 5 µl destilovanej vody, 3 µl plazmidu a 1 µl fosfátového tlmivého roztoku. Vzorka s pridaným blokátorom obsahovala 1 µl látky eliminujúcej ROS/RNS (Tab. 1), 5 µl destilovanej vody, 3 µl plazmidu a 1 µl fosfátového tlmivého roztoku. Topológia plazmidu

bola analyzovaná pomocou 1 % agarózovej elektroforézy v 0,5 x TBE (90 min, 100 V) metódou DNA *topology assay*.

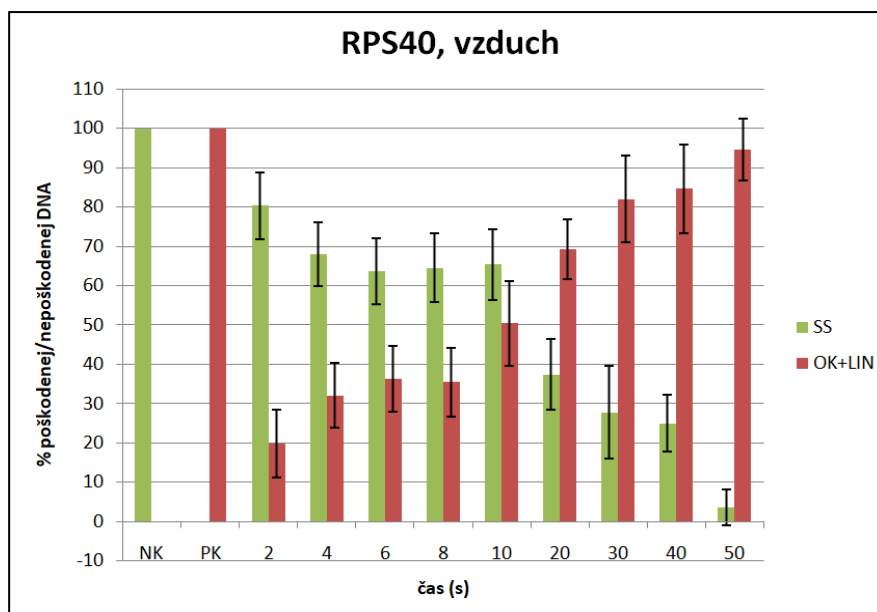
Tab. 1. Vybrané látky a ROS/RNS, ktoré eliminujú

ROS/RNS	Blokátor	Koncentrácia	Referencie
H ₂ O ₂	pyruvát sodný	100 mM	[5]
ONOO ⁻ , ONOOH, H ₂ O ₂	ebselén	10 mM	[7 – 8]
NO, •NO	carboxy-PTIO	1 mM	[5, 9]
•OH, O ₃	DMSO	99 %	[10 – 11]

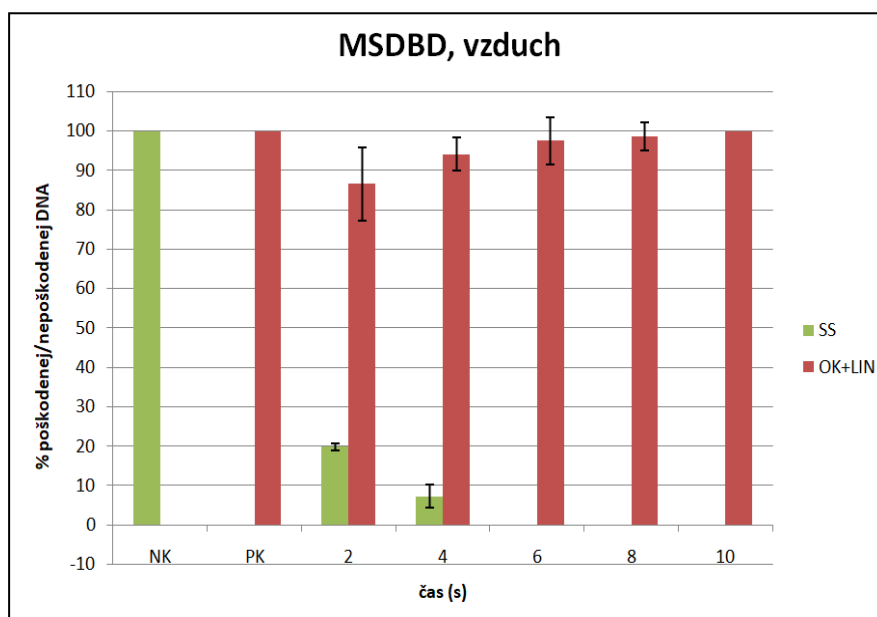
DNA *topology assay* je metóda založená na elektroforetickej detekcii topologických zmien v molekule plazmidu, ktoré vznikajú v dôsledku tvorby zlomov v DNA. Nepoškodený plazmid je v superšpiralizovanom stave a pohybuje sa v géle najrýchlejšie. Pri jednovláknovom zlome vzniká otvorená kruhová forma, ktorá sa v géle pohybuje najpomalšie, a pri dvojvláknovom zlome vzniká lineárna forma [12]. Mieru poškodenia DNA sme kvantifikovali pomocou programu ImageJ. Zmeraním intenzity signálu z prúžkov reprezentujúcich všetky tri formy plazmidu v jednotlivých dráhach sme získali celkové množstvo plazmidovej DNA v danej dráhe, ktorá symbolizovala 100 %. Následne sme na základe intenzity prúžkov vypočítali ich percentuálne zastúpenie z celkovej DNA.

Výsledky a diskusia

Naším prvým cieľom bolo pozorovať vplyv NTP generovanej vo vzduchu pri atmosférickom tlaku na plazmidovú DNA. Použili sme dva typy zdrojov (RPS40 a MSDBD) a pozorovali sme nasledovné rozdiely medzi pomermi poškodenej a nepoškodenej DNA. Pri ošetrovaní zdrojom RPS40 sme pozorovali tvorbu jednovláknových zlomov už po 2 s a tvorbu dvojvláknových zlomov pri vyšších časoch. Množstvo nepoškodenej DNA začalo výrazne klesať po 10 s a množstvo poškodenej DNA začalo prevažovať (Obr. 1). Plazma generovaná zdrojom MSDBD poškodzovala DNA výrazne viac oproti plazme generovanej zdrojom RPS40. Po 4 s sme nepozorovali žiadnu nepoškodenú DNA a množstvo poškodenej DNA prevažovalo nepoškodenú DNA už pri 2 s. Pri vyšších časových expozíciách sme pozorovali zvýšený výskyt dvojvláknových zlomov DNA (Obr. 2).



Obr.1. Grafické znázornenie percenta poškodenéj a nepoškodenéj DNA vo vzorkách ošetrovaných nízkoteplotnou plazmou vo vzduchu 2 až 50 s zdrojom RPS40 Negatívna kontrola – 0 s (NK), pozitívna kontrola (PK – 0,125 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), SS (superšpiralizovaná forma pBR322, ktorá reprezentuje nepoškodenú DNA), OK (otvorená kruhová forma pBR322, ktorá reprezentuje jednovláknové zlomy), LIN (lineárna forma pBR322, ktorá reprezentuje dvojitáknové zlomy). Experiment bol uskutočnený dvanásťkrát. Dáta sú prezentované ako priemer $\pm$ SD



Obr. 2. Grafické znázornenie percenta poškodenéj a nepoškodenéj DNA vo vzorkách ošetrovaných nízkoteplotnou plazmou vo vzduchu 2 až 10 s zdrojom MSDBD Negatívna kontrola – 0 s (NK), pozitívna kontrola (PK – 0,125 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), SS (superšpiralizovaná forma pBR322, ktorá reprezentuje nepoškodenú DNA), OK (otvorená kruhová forma pBR322, ktorá reprezentuje jednovláknové zlomy), LIN (lineárna forma pBR322, ktorá reprezentuje dvojitáknové zlomy). Experiment bol uskutočnený šesťkrát. Dáta sú prezentované ako priemer $\pm$ SD

Naším druhým cieľom bolo otestovať schopnosť vybraných látok eliminovať ROS

a RNS a pozorovať ich účinok na pomer poškodenej a nepoškodenej DNA plazmidu po ovplyvnení NTP. Pri oboch zdrojoch došlo vo všetkých časoch k zníženiu množstva poškodenej DNA po ovplyvnení reakčnej zmesi NTP. Výnimkou bola vzorka s carboxy-PTIO, ktorá mala po 8 a 10 s ovplyvnenia zdrojom MSDBD rovnaké množstvo poškodenej DNA ako pri vzorke bez blokátora (Tab. 2 a 3). Z našich výsledkov predpokladáme, že plazmou ovplyvnená voda má rôzne koncentrácie rozpustených reaktívnych častíc, pričom ich koncentrácia je vyššia pri zdroji MSDBD. Za tvorbu zlomov DNA sú pravdepodobne zodpovedné hydroxylové radikály, kyselina peroxodusitá, dusitany a dusičnany. Ebselén a DMSO sú najúčinnnejšie z použitých blokátorov, pravdepodobne kvôli tomu, že samotná kyselina peroxodusitá môže byť zdrojom hydroxylových radikálov, dusitanov a dusičnanov [6].

Tab. 2. Percentuálny podiel poškodenej DNA po pridaní blokátorov do reakčnej zmesi pri ošetrovaní zdrojom RPS40 vo vzduchu 2 až 50 s Dáta sú prezentované ako priemer $\pm$ SD

RPS40 (vzduch)	0 s	2 s	4 s	6 s	8 s	10 s	20 s	40 s	50 s
bez blokátora	0	19,72 $\pm$ 8,60	32,03 $\pm$ 8,20	36,22 $\pm$ 8,36	35,49 $\pm$ 8,71	50,36 $\pm$ 10,87	69,19 $\pm$ 7,63	84,59 $\pm$ 11,36	94,54 $\pm$ 7,82
pyruvát sodný	0,63 $\pm$ 0,89	8,95 $\pm$ 2,09	11,18 $\pm$ 4,62	11,35 $\pm$ 4,39	15,61 $\pm$ 9,56	16,43 $\pm$ 6,76	24,86 $\pm$ 9,56	33,10 $\pm$ 9,77	30,67 $\pm$ 5,94
ebselén	0	0,20 $\pm$ 0,41	0	0,36 $\pm$ 0,72	0,68 $\pm$ 0,85	0,43 $\pm$ 0,75	0,39 $\pm$ 0,11	1,45 $\pm$ 1,18	2,59 $\pm$ 3,36
carboxy-PTIO	0,50 $\pm$ 0,79	3,45 $\pm$ 1,51	4,33 $\pm$ 2,73	4,68 $\pm$ 3,26	8,39 $\pm$ 2,31	5,78 $\pm$ 1,76	8,92 $\pm$ 2,87	7,02 $\pm$ 1,70	8,65 $\pm$ 1,19
DMSO	0	1,67 $\pm$ 1,90	0,75 $\pm$ 0,97	1,33 $\pm$ 0,95	0,55 $\pm$ 0,90	1,31 $\pm$ 1,86	1,86 $\pm$ 1,61	23,08 $\pm$ 5,86	38,04 $\pm$ 2,20

Tab. 3. Percentuálny podiel poškodenej DNA po pridaní blokátorov do reakčnej zmesi pri ošetrovaní zdrojom MSDBD vo vzduchu 2 až 10 s Dáta sú prezentované ako priemer $\pm$ SD

MSDBD (vzduch)	0 s	2 s	4 s	6 s	8 s	10 s
bez blokátora	0	86,59 $\pm$ 9,33	94,14 $\pm$ 4,14	97,51 $\pm$ 6,09	98,55 $\pm$ 3,52	99,99 $\pm$ 0,01
pyruvát sodný	0,63 $\pm$ 0,89	43,95 $\pm$ 5,42	55,85 $\pm$ 4,71	57,37 $\pm$ 8,11	77,43 $\pm$ 4,45	63,92 $\pm$ 5,21
ebselén	0	2,30 $\pm$ 3,00	14,56 $\pm$ 6,30	29,41 $\pm$ 5,32	27,68 $\pm$ 8,36	53,12 $\pm$ 8,08
carboxy-PTIO	0,50 $\pm$ 0,79	40,14 $\pm$ 8,48	52,85 $\pm$ 8,23	70,25 $\pm$ 7,79	93,48 $\pm$ 4,61	100 $\pm$ 0,01
DMSO	0	0	3,99 $\pm$ 2,59	32,85 $\pm$ 3,01	61,80 $\pm$ 11,37	63,53 $\pm$ 9,60

Záver

V našich experimentoch sme potvrdili genotoxický účinok NTP generovanej zdrojmi

RPS40 a MSDBD. Pri zdroji MSDBD sme pozorovali silnejší genotoxický účinok v porovnaní so zdrojom RPS40, pričom NTP bola generovaná v rovnakom pracovnom plyne. Po pridaní látok, ktoré eliminujú špecifické ROS/RNS sme pozorovali znížené množstvá poškodenej DNA. Keďže najvýraznejšie zníženie množstva poškodenej DNA sme pozorovali po pridaní ebselénu a DMSO do reakčnej zmesi, predpokladáme, že kyselina peroxodusitá je veľmi dôležitou molekulou v chemických reakciách prebiehajúcich vo vode ovplyvnenej NTP. Za vzniknuté poškodenia je teda pravdepodobne zodpovedná kyselina peroxodusitá a jej produkty (hydroxylový radikál, dusitany a dusičnany). Hoci sa DNA v bunkách nachádza v bunkových kompartmentoch a bunky tiež disponujú rôznymi opravnými a antioxidačnými mechanizmami, predpokladáme, že tieto výsledky prispievajú k pochopeniu vplyvu NTP na DNA v živých organizmoch s cieľom aplikácie NTP v medicíne, poľnohospodárstve a sterilizačných procesoch.

PodĎakovanie

Táto práca bola finančne podporená grantmi APVV-21-0147, VEGA 1/0460/21 a VEGA 1/0688/22.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Czapka T., Maliszewska I., Olesiak-Bañska J. (2018) Plasma Chem. Plasma Process. 38(6), p. 1181
- [2] Nehra V., Kumar A., Dwivedi H. K. (2008) Int. J. Eng. 2(1), p. 53
- [3] Bruggeman P. J., Kushner M. J., Locke B. R., et al. (2016) Plasma Sourc. Sci. Tech. 25(5), p. 053002
- [4] Machala Z., Tarabová B., Sersenová D., et al. (2018) J. Phys. Appl. Phys. 52(3), p. 034002
- [5] Aboubakr H. A., Gangal U., Youssef M. M., et al. (2016) J. Phys. Appl. Phys. 49(20), p. 204001
- [6] Watson N. (1988) Gene70(2), p. 399
- [7] Sies H. (1993) Free Radic. Biol. Med. 14(3), p. 313
- [8] Fujisawa S., Kadoma Y. (2005) Anticancer Res. 25(6B), p. 3989
- [9] Nishibayashi S., Asanuma M., Kohno M., et al. (1996) J. Neurochem. 67(5), p. 2208
- [10] Zhang X., Rosenstein B. S., Wang Y., et al. (1997) Free Radic. Biol. Med. 23(7), p. 980
- [11] Willach S., Lutze H. V., Eckey K., et al. (2017) Water Res. 122, p. 280
- [12] Arjunan K. P., Sharma V. K., Ptasińska S. (2015) Int. J. Mol. Sci. 16(2), p. 2971

α -Amylázová rodina GH119 – *in silico* analýza zameraná na identifikáciu sekvenčno-štruktúrnych črt, evolúciu a príbuznosť s rodinou GH57

Adam Poláček, Štefan Janeček

*Ústav molekulárnej biológie Slovenskej akadémie vied, v.v.i., Laboratórium evolúcie proteínov, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovenská republika;
adam.polacek@savba.sk*

Abstract

α -Amylase family GH119 – *in silico* analysis focused on identification of sequence-structural features, evolution and its relatedness to family GH57

The α -amylase family GH119 has been established in the CAZy database in 2006 based on the study describing the α -amylase IgtZ from *Bacillus circulans*. With only ~40 members it belongs to one of the smallest glycoside hydrolase families. Apart from a partial biochemical characterization of the α -amylase of *B. circulans*, nothing has been published in this family as yet, except for the single *in silico* study in 2012 that predicted the catalytic domain structure with potential catalytic machinery and conserved sequence regions (CSRs) shared with the other α -amylase family GH57. This work delivers a detailed bioinformatics analysis of the entire family GH119 in terms of domain organization of its members, exact location of all five CSRs and identification of unique sequence features that could distinguish between members of families GH119 and GH57. The set of 80 studied proteins consisted of all 42 available GH119 sequences completed by 38 characterized family GH57 members. Phylogenetic relationships indicated that taxonomy could be a major factor in the evolution of the family GH119.

Keywords: *α -amylase family GH119; bioinformatics analysis; evolutionary relationships*

Úvod a formulácia cieľa

Rodina GH119, definovaná v roku 2006 na základe štúdie opisujúcej α -amylázu IgtZ z *Bacillus circulans* [1] – v súčasnosti preklasifikovanej ako *Niallia circulans*, predstavuje jednu z najmenších α -amylázových rodín v databáze CAZy [2, 3]. Spomedzi niečo viac ako 40 členov, ktorí sú v CAZy v súčasnosti klasifikovaní v rodine GH119, spomínaná α -amyláza IgtZ predstavuje doteraz jediný charakterizovaný enzým [2]. Hoci pri hydrolýze glykozidových väzieb využíva retenujúci reakčný mechanizmus podobne ako je to v α -amylázových rodinách GH13 a GH57 [4], z maltooligozyltrehalóz je schopná produkovať trehalózu [1], a preto existuje dôvod považovať IgtZ z *N. circulans* skôr za „amylolytický“ enzým ako za striktnú α -amylázu (EC 3.2.1.1) [3]. K dispozícii nie sú žiadne ďalšie experimentálne nadobudnuté poznatky ohľadom rodiny GH119, s výnimkou jedinej *in silico* štúdie z roku 2012 [5], ktorá odhalila možnú príbuznosť rodiny GH119 s tzv. druhou α -amylázovou rodinou GH57. Podobnosť sa týkala najmä priestorového usporiadania katalytickej domény (tzv. nekompletný TIM-barel) a katalytickej mašínérie v oboch rodinách, ako aj zdieľania konzervovaných sekvenčných regiónov (KSR). Samotná α -amyláza IgtZ

okrem katalytickej domény obsahuje aj tri škrob-viažuce domény (SBD) a jednu doménu fibronektínového typu III (FN-III) [6].

Predkladaná *in silico* štúdia bola zameraná predovšetkým na rodinu GH119 v snahe aspoň čiastočne vyplniť medzery v jej celkovom poznaní, ako aj dôkladnejšie ozrejmiť jej príbuznosť s rodinou GH57 pomocou využitia najnovších sekvenčno-štruktúrnych údajov a pokročilých bioinformatických nástrojov. Podrobná analýza sekvencií oboch rodín GH119 a GH57 bola využitá na: (i) jednoznačné definovanie hraníc a pozícií všetkých piatich KSR v sekvenciách (a štruktúrach) členov rodiny GH119; (ii) správne rozlišovanie medzi potenciálnymi členmi GH119 a GH57 v prípade hypotetických proteínov; a (iii) zistenie doménového usporiadania a evolučných vzťahov v rodine GH119.

Materiál a metódy

Skúmané sekvencie pochádzajúce z oboch rodín GH57 a GH119 boli zozbierané na základe informácií v databáze CAZy podľa aktualizácie v novembri 2022 [2]. Z databáz GenBank [7] a/alebo UniProt [8] bolo získaných 80 sekvencií, t.j. 42 sekvencií z rodiny GH119 (jediná experimentálne charakterizovaná bola len α -amyláza IgtZ z *N. circulans* [1]) doplnených o 38 sekvencií členov rodiny GH57 (35 sekvencií charakterizovaných ôsmich definovaných enzýmových špecifít a 3 rôzne hypotetické proteínové homológy s nekompletnou katalytickou mašinériou) [9, 10, 11, 12, 13, 14].

So sekvenciami boli celkovo spravené tri rôzne zrovnania v programe Clustal-Omega [15]: (i) všetkých 80 študovaných sekvencií – segment pokrývajúci úsek od začiatku KSR-1 po koniec KSR-5 [9, 11, 13]; (ii) 42 sekvencií rodiny GH119 so zameraním na ich C-konce – segment od konca KSR-5 po reálny koniec sekvencie; a (iii) 42 sekvencií rodiny GH119 – celé sekvencie s cieľom rozdeliť zrovnanie na dve časti, ktoré by sa mohli navzájom evolučne porovnať: (a) N-koncová časť – neúplný TIM-barel s nasledujúcim zväzkom α -helixov; a (b) C-koncová časť – časť sekvencií, ktorá nasleduje po vyššie uvedenej katalytickej oblasti. Pre KSR oboch rodín boli vytvorené sekvenčné logá pomocou servera WebLogo 3.0 [16].

Na základe zrovnaní boli pomocou programu MEGA (tzv. metódou „maximálnej vierohodnosti“) [17] vypočítané tri evolučné stromy – spoločný strom oboch rodín GH57 a GH119 (všetky sekvencie od začiatku KSR-1 po koniec KSR-5) a dva stromy rodiny GH119 (strom N-koncov a strom C-koncov sekvencií).

Štruktúrne porovnanie dvoch študovaných GH rodín bolo robené pre experimentálne stanovenú terciárnu štruktúru GH57 4- α -glukanotransferázy z *Thermococcus litoralis* [18] (z databázy Protein Data Bank [19]; PDB kód: 1K1Y) a model trojrozmernej štruktúry GH119

α -amylázy IgtZ z *N. circulans* [1] (z databázy AlphaFold [20] prostredníctvom UniProt čísla: A0P8X0). Štruktúry boli preložené v programe MultiProt [21] a preloženie zobrazené v programe UCSF Chimera [22].

Výsledky a diskusia

Príbuznosť rodín GH119 a GH57 bola prvýkrát naznačená v roku 2012 na základe úspešného modelovania podstatnej časti katalytickej domény neúplného TIM-barelu α -amylázy IgtZ z *N. circulans*, v ktorej bolo možné identifikovať aj dva potenciálne aminokyselinové zvyšky zodpovedajúce katalytickej mašinérii z rodiny GH57 [5].

Snahou predloženej práce bolo definitívne potvrdiť navrhnutú príbuznosť α -amylázovej rodiny GH119 s rodinou GH57. Analyzovaných bolo 42 dostupných členov klasifikovaných v rodine GH119 s cieľom identifikovať všetkých päť KSR v ich sekvenciách. Na porovnanie – z rodiny GH57 – bola použitá len skupina experimentálne charakterizovaných enzýmov s tromi tzv. enzýmom podobnými proteínovými homológmi [10, 14] – spolu 38 sekvencií. Zrovnanie všetkých 80 sekvencií preukázalo, že KSR etablované pre rodinu GH57 [9] sa dajú využiť aj pre identifikáciu KSR v sekvenciách členov rodiny GH119; t.j. obe GH rodiny sú vzájomne homologické aspoň v rámci katalytickej oblasti, ktorá pokrýva celú katalytickú (β/α)₇-barelovú doménu a nasledujúci zväzok α -špirál [5, 13]. Okrem toho platí, že pozície oboch katalytických zvyškov z rodiny GH57 – Glu123 a Asp214 (katalytický nukleofil a donor protónov v oblastiach KSR-3 a KSR-4; číslovanie pre 4- α -glukanotransferázu z *T. litoralis*) [18] – sú invariantne konzervované aj v rámci celej rodiny GH119.

Napriek spoločnej sekvenčnej podobnosti medzi oboma rodinami, vrátane ich KSR, celá rodina GH119 jasne preukázala svoju evolučnú nezávislosť od rodiny GH57. Fylogenetická analýza samostatnej rodiny GH119 však poukázala na zoskupenia sekvencií jej členov v rámci separátnych klastrov, čo do budúcnosti naznačuje možnosť existencie GH119 podrodín, a prípadne aj rôznych enzýmových špecifícít v tejto rodine.

Spomínaná evolučná príbuznosť oboch α -amylázových rodín GH119 a GH57, ktorá je evidentná vďaka ich jasnej sekvenčnej podobnosti v KSR, môže byť podporená aj porovnaním ich terciárnych štruktúr. Superpozícia celých katalytických oblastí (katalytická doména neúplného TIM-barelu a nasledujúci zväzok α -helixov; 263 korešpondujúcich C α -atómov s hodnotou RMSD 1,72 Å) zástupcov oboch rodín GH119 a GH57 (α -amyláza IgtZ z *N. circulans* [1] a GH57 4- α -glukanotransferáza z *T. litoralis* [18]) jednoznačne podporila aj zdieľanie katalytickej mašinérie v oboch rodinách. Na definitívne potvrdenie katalytických

zvyškov v rodine GH119 je však nevyhnutné priniesť experimentálne dôkazy potvrdzujúce zapojenie zvyškov Glu231 a Asp373 α -amylázy z *N. circulans* do katalytickej aktivity.

Súčasnité porovnávanie terciárnych štruktúr prinieslo aj ďalšie výhody, týkajúce sa overenia, resp. definovania presných pozícií jednotlivých KSR v sekvenciách členov rodiny GH119. Do určitej miery obmedzená presnosť štruktúrneho modelu α -amylázy IgtZ z *N. circulans* z roku 2012 [5] spôsobovala neistotu pri predikciách presných hraníc piatich KSR v sekvenciách rodiny GH119, najmä KSR-5 nachádzajúceho sa na jednom z troch α -helixov lokalizovaných za katalytickou doménou neúplného TIM-barelu. Spresnené pozície všetkých piatich KSR v rodine GH119 umožnili vypočítať sekvenčné logo celej rodiny GH119, ktoré však bude vhodné v budúcnosti aktualizovať, najmä ak bude k dispozícii viac sekvencií členov rodiny. V súčasnosti sekvenčné logo rodiny GH119 naznačuje, že zatiaľ v rámci tejto rodiny by mohla existovať len jedna enzýmová špecificita, t.j. α -amyláza, pretože koniec KSR-5 obsahuje dva takmer invariantné tyrozínové zvyšky, čo je črta typická pre α -amylázovú špecificitu v rodine GH57 [10, 11, 12]. Tento predpoklad v rodine GH119 je ale potrebné brať s určitou rezervou, pretože logo rodiny GH119 je založené len na 42 sekvenciách.

Predkladaná bioinformatická analýza priniesla aj podrobné informácie o ďalších doménach na C-koncoch nasledujúcich po N-koncovej katalytickej oblasti GH119. Väčšina členov GH119 disponuje aspoň jednou dobre rozpoznatelnou doménou umiestnenou na C-konci, ako je doména FN-III a/alebo SBD (klasifikované v CAZy databáze ako rodiny CBM20, CBM25 a CBM26), prípadne dockerínová doména. V rodine GH119 však môžu existovať aj proteíny, ktorým chýba akákoľvek dobre známa dodatočná C-terminálna doména.

Prítomnosť rôznych C-koncových domén a ich čiastočne odlišné zloženie u väčšiny členov rodiny GH119 na prvý pohľad nezodpovedá sekvenčne podobným N-koncovým častiam, ktoré nesú potenciálnu katalytickú oblasť. Preto boli evolučné vzťahy v rámci rodiny GH119 študované aj oddelene pre N-terminálne a C-terminálne segmenty sekvencií (hranica medzi N- a C-segmentom bola medzi zvyškami Asp608 a Lys609; podľa α -amylázy IgtZ z *N. circulans*). Zaujímavým zistením je, že fylogenetická analýza C-koncových segmentov sekvencií preukázala skôr iba nepatrné zmeny v klastrovaní jednotlivých členov oproti analýze N-koncov. Toto naznačuje, že napriek variabilným dĺžkam a rôznemu zloženiu domén v C-terminálnych častiach proteínov, dominantný faktor je reprezentovaný taxonómiou, ktorá v súčasnosti riadi klasifikáciu enzýmov do rodiny GH119.

Záver

α -Amylázová rodina GH119 bola podrobená detailnej *in silico* analýze s cieľom

potvrdiť jej príbuznosť s rodinou GH57. Bolo preukázané, že KSR definované v rodine GH57 sú použiteľné aj pre členov GH119, ako aj to, že obe rodiny sú vzájomne homologické minimálne v rámci katalytickej oblasti svojich sekvencií. Pozície katalytických zvyškov rodiny GH57 sú invariantne konzervované aj v rodine GH119, avšak tento predpoklad je potrebné experimentálne potvrdiť. Porovnanie zástupcov GH119 s rodinou GH57 umožnilo tiež overiť a spresniť pozície KSR v sekvenciách členov rodiny GH119, čo následne umožnilo vypočítať jej sekvenčné logo, naznačujúce zatiaľ existenciu len jednej enzýmovej špecificity. Bioinformatická analýza tiež odhalila, že členovia rodiny GH119 disponujú aspoň jednou dobre rozpoznateľnou C-terminálnou doménou (napr. FN-III, SBD, apod.). Fylogenetické vzťahy poukázali na taxonómiu ako na dominantný faktor riadiaci evolúciu enzýmov v súčasnosti zaradených do rodiny GH119.

PodĎakovanie

Táto práca bola finančne podporená grantom č. 2/0146/21 od Slovenskej grantovej agentúry VEGA.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Watanabe H., Nishimoto T., Kubota M., et al. (2006) Biosci. Biotechnol. Biochem. 70(11), p. 2690
- [2] Drula E., Garron M. L., Dogan S., et al. (2022) Nucleic Acids Res. 50(D1), p. D571
- [3] Janecek S., Svensson B. (2022) Amylase 6(1), p. 1
- [4] Janecek S., Svensson B., MacGregor E. A. (2014) Cell. Mol. Life Sci. 71(7), p. 1149
- [5] Janecek S., Kuchtova A. (2012) FEBS Lett. 586(19), p. 3360
- [6] Janecek S., Marecek F., Macgregor E.A., et al. (2019) Biotechnol. Adv. 37(8), Art. No. 107451
- [7] Sayers E. W., Cavanaugh M., Clark K., et al. (2021) Nucleic Acids Res. 49(D1), p. D92
- [8] UniProt Consortium. (2021) Nucleic Acids Res. 49(D1), p. D480
- [9] Zona R., Chang-Pi-Hin F., O'Donohue M.J., et. al. (2004) Eur. J. Biochem. 271(14), p. 2863
- [10] Janecek S., Blesak K. (2011) Protein J. 30(6), p. 429
- [11] Blesak K., Janecek S. (2012) Extremophiles. 16(3), p. 497
- [12] Blesak K., Janecek S. (2013) Microbiology. 16(3), p. 497
- [13] Martinovicova M., Janecek S. (2018) 3Biotech. 8(7), Art. No. 307
- [14] Janecek S., Martinovicova M. (2020) Genetica. 148(2), p. 77

- [15] Sievers F., Wilm A., Dineen D., et al. (2011) *Mol. Syst. Biol.* 7(1), Art. No. 539
- [16] Crooks G. E., Hon G., Chandonia J. M., et al. *Genome Res.* 14(6), p. 1188
- [17] Kumar S., Stecher G., Li M., et al. (2018) *Mol. Biol. Evol.* 35(6), p. 1547
- [18] Imamura H., Fushinobu S., Yamamoto M., et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278(21), p. 19378
- [19] Burley S. K., Bhikadiya C., Bi C., et al. (2021) *Nucleic Acids Res.* 49(D1), p. D437
- [20] Varadi M., Anyango S., Deshpande M., et al. (2022) *Nucleic Acids Res.* 50(D1), p. D439
- [21] Shatsky M., Nussinov R., Wolfson H.J. (2004) *Proteins* 56(1), p. 143
- [22] Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C. (2021) *Protein Sci.* 30(1), p. 70

Vplyv nízko-teplotnej plazmy na kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*

Juliana Poráziková¹, Mária Petřková¹, Ivana Ďurovcová¹, Martin Kuťka², Michal Stano²,
Andrea Ševčovičová¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; porazikova3@uniba.sk

²Univerzita Komenského v Bratislave, Fakulta matematiky, fyziky a informatiky, Katedra experimentálnej fyziky, Mlynská dolina F1, 842 48 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Effect of non-thermal plasma on yeasts *Schizosaccharomyces pombe*

Nowadays, microbiological contamination represents a challenge for many fields of human life, such as medicine, food industry or environment. For this reason, new alternatives of decontamination are still needed. Non-thermal plasma represents a promising tool for elimination of various microorganisms, but it is necessary to know the exact mechanisms how non-thermal plasma affects the cells for its safe use in the future. In this study, we focused on the effect of non-thermal plasma treatment on survival of yeasts *Schizosaccharomyces pombe* and also on its ability to trigger oxidative stress in treated cells. We found out that with increasing exposure time the survival of yeasts decreases and also that plasma is able to trigger the production of reactive oxygen species in yeast cells.

Keywords: non-thermal plasma; yeasts; *S. pombe*; survival; oxidative stress; ROS

Úvod a formulácia cieľa

Nízko-teplotná plazma (NTP) je čiastočne ionizovaný plyn obsahujúci rôzne aktívne častice [1]. NTP disponuje rôznymi vlastnosťami, ktoré našli potenciálne využitie vo viacerých odvetviach biológie, medicíny alebo napríklad potravinárskeho priemyslu [2]. V oblasti biológie zaujala najmä svojimi antimikrobiálnymi účinkami. Preukázalo sa, že nízko-teplotná plazma dokáže eliminovať rôzne formy baktérií, húb a takisto vírusov [3], pričom sa predpokladá, že za tieto účinky NTP sú zodpovedné najmä reaktívne formy kyslíka a dusíka (RONS), ktoré pri jej generovaní vznikajú [4]. Dodnes však nie je podrobne preskúmaný jej priamy vplyv na bunky, najmä eukaryotické, čo je pre jej bežné používanie v budúcnosti kľúčové. Rozhodli sme sa preto študovať pôsobenie NTP na eukaryotický modelový organizmus, kvasinku *Schizosaccharomyces pombe*.

Cieľom práce bolo zistiť, ako NTP vplýva na bunky kvasiniek, pričom sme sa zamerali aj na jej oxidačný charakter. Zaujímalo nás, či a v akom rozsahu je NTP schopná vyvolať v bunkách kvasiniek oxidačný stres, teda tvorbu reaktívnych foriem kyslíka (ROS).

Materiál a metódy

V našich experimentoch sme používali kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*, kmeň

972h-.

Príprava vzoriek

Z rozpestovanej kultúry *S. pombe* na pevnom médiu sme si pripravili nočnú kultúru, ktorú sme následne inkubovali v tekutom YES médiu cez noc v termostate na trepačke pri teplote 32°C a 180 rpm. Kultúru sme centrifugovali 3 min pri 3000 g a 25°C. Po centrifugácii sme pelet rozsuspendovali v 10 ml sterilnej ddH₂O a udržiavali v ľade.

Ošetrovanie NTP

Takto pripravené vzorky boli následne ošetrované NTP v čase 1, 3, 5 alebo 10 min. Vzorky sme ošetrovali pomocou plazmového jetu umiesteného 1,5cm od hladiny ošetrovanej vzorky, ktorá sa nachádzala v malej plastovej Petriho miske. NTP bola generovaná pri napätí 10 kV a frekvencii 7,7 kHz. Prietok plynu bol nastavený na 3 l/min a priemerný výkon na 5 W. Ako pracovný plyn bol použitý argón. Ošetrovanie vzoriek prebiehalo na Katedre experimentálnej fyziky FMFI UK v Bratislave.

Stanovenie prežívania

Ošetrované bunky sme vysiali na pevné YES médium v koncentrácii 10³ buniek/ml 0, 1 a 2 h po ošetrovaní, pričom medzitým sme bunky inkubovali vo vode, v ktorej boli ošetrované. Po dvoj-dňovej kultivácii sme spočítali vyrastené kolónie a prežívanie prepočítali na percentá. Výsledky sme normalizovali na prežívanie negatívnej kontroly.

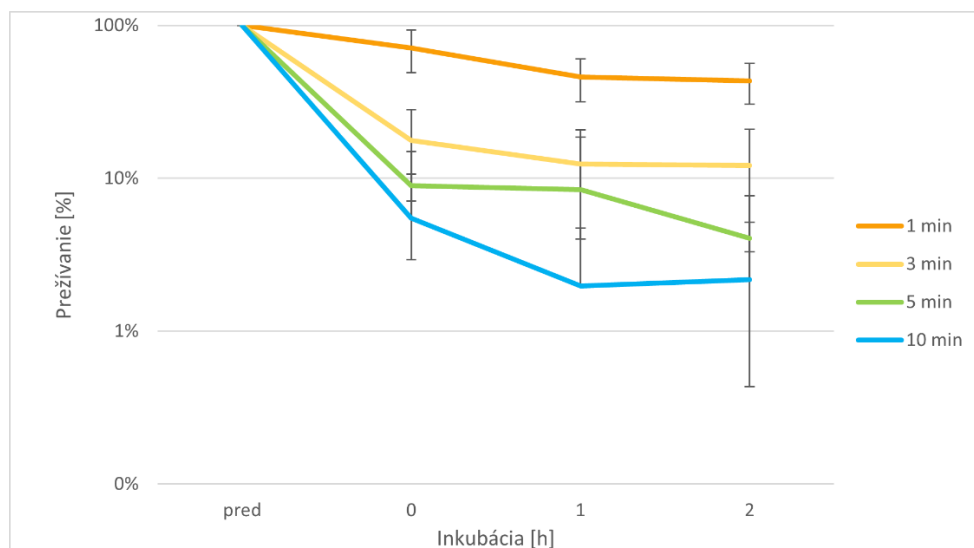
Prietoková cytometria

Zo vzoriek ošetrovaných NTP nachádzajúcich sa v 10 ml sterilnej ddH₂O sme odpipetovali po 1 ml do mikroskúmaviiek a centrifugovali 90 s pri 1677 g. Supernatant sme odpipetovali a bunky premyli fosfátovým tlmivým roztokom (50 mM, pH 7,6). Následne sme pridali 500 µl 10µM H₂DCFDA. Vzorky sme ďalej inkubovali v termobloku pri 30°C 45 min. Po uplynutí času inkubácie sme vzorky opäť centrifugovali 90 s pri 1677 g. Odpipetovali sme supernatant, pridali 500 µl fosfátového tlmivého roztoku (50 mM, pH 7,6) a 2 µl 7-AAD a analyzovali na prietokovom cytometri (CytroFLEX). V každom vykonanom experimente bolo pomocou prietokovej cytometrie analyzovaných 20000 buniek.

Výsledky a diskusia

V prvej časti štúdie sme sledovali prežívanie kvasiniek po ovplyvnení NTP. Kvasinky sme ovplyvňovali v štyroch rôznych časoch (1, 3, 5 a 10 min) a vysievali na misky hneď po ošetrovaní, resp. po 1 alebo 2-hodinovej inkubácii vo vode, v ktorej boli ošetrované. Na základe spočítaných kolónií vyrastených po rôznych časoch ošetrovania NTP na Petriho miskách sme vytvorili graf normalizovaný na prežívanie negatívnej kontroly (Obr. 1). Pri 1-minútovom

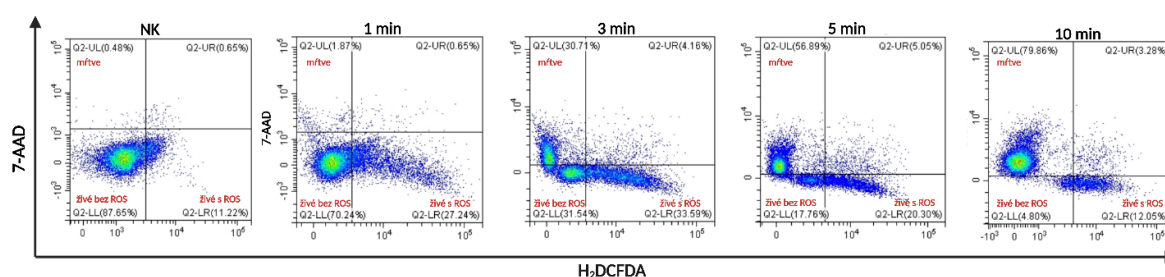
ošetrení kvasiniek sme pozorovali pokles prežívania o 28,89 %, Prežívanie so zvyšujúcim sa inkubačným časom klesalo, až na hodnotu 43,48 % dve hodiny po ošetrení. Po 3-minútovom ošetrení sme pozorovali výrazný pokles prežívania až na hodnotu 17,63 %, ale so zvyšujúcim sa inkubačným časom prežívanie kleslo len o 5,27 % a následne zostalo stabilné na hodnote 12,12 %. Pri 5-minútovom ošetrení sa prežívanie vo všetkých časoch pohybovalo od 4,05 % do 8,98 %. Pri 10-minútovom ošetrení prežívanie ani v jednom čase nestúplo nad hodnotu 5,49 %. Na základe výsledkov môžeme skonštatovať, že prežívanie kvasiniek klesalo so zvyšujúcim sa expozičným aj inkubačným časom. Toto pozorovanie je v súlade s výsledkami štúdie Siadati a kol. [5], v ktorej sledovali prežívanie *S. pombe* a ďalších kvasiniek po ošetrení NTP pomocou rovnakého plazmového jetu a tiež pracovného plynu.



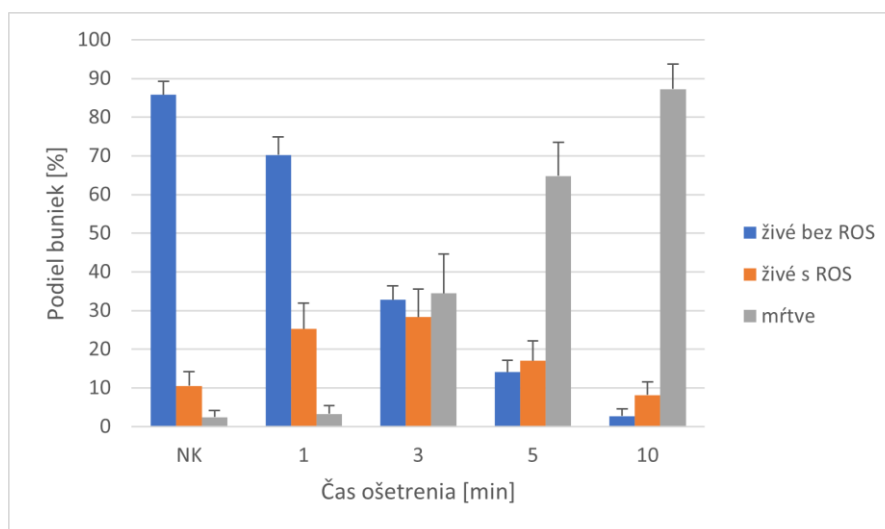
Obr. 1. Prežívanie buniek *S. pombe* po ošetrení NTP 1, 3, 5 alebo 10 min

V experimentoch, v ktorých sme pomocou prietokovej cytometrie sledovali úroveň intracelulárnych ROS v bunkách ošetrených NTP, negatívna kontrola (NK) vykazovala 87,65 % živých buniek bez prítomnosti ROS a 11,22 % živých buniek s intracelulárnymi ROS. To, že aj NK obsahovala bunky pozitívne na intracelulárne ROS pripisujeme tomu, že aj tieto boli umiestnené v ddH₂O, ktorá nie je ich prirodzeným prostredím. Po 1 min ošetrení NTP sme pozorovali nárast buniek obsahujúcich intracelulárne ROS na hodnotu 27,24 %, teda viac ako 16 %-ný nárast tejto hodnoty môžeme pripísať pôsobeniu NTP. Podiel mŕtvych buniek vo vzorke sa medzi NK a 1 min ošetrením významne nezmenil (0,48 % a 1,87 %). Po 3 min ošetrenia sa už podiel mŕtvych buniek vo vzorke zvýšil na 30,71 %, pričom percento buniek s ROS sa medzi 1 a 3 min ošetrením zvýšilo o 6,35 %. Po 5 min ošetrení predstavovali mŕtve

bunky viac ako polovicu všetkých buniek vo vzorke (56,89 %), po 10 min ošetrení až 79,86 % (Obr. 2). Priemerné hodnoty z viacerých experimentov sú zobrazené na Obr. 3. Výsledky experimentov prietokovej cytometrie sú v súlade s výsledkami stanovenia prežívania buniek po ošetrení NTP, nakoľko sme v oboch prípadoch pozorovali zníženie prežívania so stúpajúcim expozičným časom. Z týchto výsledkov tiež vyplýva, že ošetrenie NTP zvyšuje v bunkách *S. pombe* prítomnosť intracelulárnych ROS. Zvýšenie úrovne intracelulárnych ROS v bunkách po ošetrení NTP pozorovali aj Ryu a kol. [6] vo svojej štúdii, v ktorej používali rovnaký zdroj NTP aj pracovný plyn, no skúmali jeho vplyv na iný kvasinkový modelový organizmus, konkrétne *Saccharomyces cerevisiae*.



Obr. 2. Dáta z experimentu prietokovej cytometrie- NK a bunky ošetrené NTP 1, 3, 5 alebo 10 min
Experiment bol zopakovaný 3-krát, prezentované sú výsledky z 1 experimentu. Priemerné hodnoty sú znázornené na Obr. 3



Obr. 3. Zmeny v zastúpení živých (bez a s ROS) a mŕtvych buniek po ošetrení NTP 1, 3, 5 alebo 10 min sledované pomocou prietokovej cytometrie

Výsledky získané v tejto štúdii potvrdzujú antimikrobiálne účinky NTP, ktoré by bolo možné využiť na dekontamináciu rôznych povrchov. Väčšina štúdií, ktoré dodnes skúmali tieto účinky NTP sa zameriavala na jej vplyv na bakteriálne bunky [7 – 8], a to najmä kvôli ich

stúpajúcej rezistencii voči antibiotikám. Vplyv NTP na baktérie je teda dnes pomerne preskúmaný, zatiaľ čo ohľadom účinku NTP na eukaryotické bunky nie je k dispozícii také množstvo relevantných štúdií. Z už existujúcich ale vyplýva, že eukaryotický model reprezentovaný rôznymi druhmi kvasiniek, vrátane nami využitej *S. pombe*, je odolnejší voči účinkom NTP v porovnaní s baktériami, nakoľko pre ich elimináciu je potrebný dlhší čas ošetrovania NTP ako v prípade bakteriálnych buniek [9]. Dôležité je ale zdôrazniť, že čas potrebný pre elimináciu rôznych mikroorganizmov závisí od použitého plazmového zdroja, plynu, z ktorého je NTP generovaná, a ďalších podmienok ošetrovania [10].

Záver

Z našich výsledkov vyplýva, že so zvyšujúcim sa expozičným časom klesá prežívanie buniek *S. pombe* po ošetrovaní NTP. Zvyšujúci sa inkubačný čas vo vode po ošetrovaní NTP takisto pôsobí na bunky *S. pombe* cytotoxicky. NTP je schopná v bunkách *S. pombe* vyvolať oxidačný stres. Pre lepšie pochopenie vplyvu NTP na bunky *S. pombe* by v budúcich štúdiách bolo vhodné otestovať ako NTP vplýva na expresiu vybraných génov, napríklad antioxidačných enzýmov zapojených do odpovede buniek na oxidačný stres.

PodĎakovanie

Táto práca bola finančne podporená grantami APVV-21-0147 a VEGA 1/0460/21.

Zoznam použitej literatúry

- [1] von Woedtke T., Reuter S., Masur K., et al. (2013) Phys. Rep. 530(4), p. 291
- [2] Scholtz V., Pazlarova J., Souskova H., et al. (2015) Biotechnol. Adv. 33(6 Pt 2), p. 1108
- [3] Scholtz V., Julák J., Kříha V. (2010) Plasma Proc. Polym. 7(3), p. 237
- [4] Nicol M. J., Brubaker T. R., Honish B. J., et al. (2020) Sci. rep. 10(1), p. 3066
- [5] Siadati S., Peťková M., Kenari A. J., et al. (2020) J. Phys. D. Appl. Phys. 54, p. 025204
- [6] Ryu Y. H., Kim Y. H., Lee J. Y., et al. (2013) Plos One 8(6), p. e66231
- [7] Mazandarani A., Goudarzi S., Jafarabadi M., et al. (2022) J. Family Reprod. Health 16(3), p. 212
- [8] Yahaya A. G., Okuyama T., Kristof J., et al. (2021) Molecules 26(9), p. 2523
- [9] Galassi A., Ferrucci L., Costanzi M., et al. (2022) Ital. J. Food Saf. 11(4), p. 10043
- [10] Peťková M., Ďurčányová S., Ďurovcová I., et al. (2022) Študentská vedecká konferencia 2022, Zborník recenzovaných príspevkov, Bratislava, SR, p. 491

Two novel variants associated with *PMPCA* related disease

Vibhuti Rambani¹, Martina Skopkova¹, Michal Cagalinec¹, Miriam Kolnikova², Daniela Gasperikova¹

¹*Biomedical Research Center of the Slovak Academy of Sciences, v. v. i., Institute of Experimental Endocrinology, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovak republic; vibhuti.rambani@savba.sk*

²*Department of Neurology, Medical Faculty of Comenius University and National Institute of Children's Diseases, Limbova 1, 833 40, Bratislava, Slovak republic*

Abstract

Primary mitochondrial diseases (MTDs) form a clinically and genetically heterogeneous group of inherited disorders that arise as a result of a defect in mitochondrial energetic metabolism. The proband carried novel compound heterozygous mutations in the *PMPCA* gene that encodes for α -mitochondrial processing peptidase (α -MPP), a protein likely involved in the processing of mitochondrial proteins. *PMPCA* gene encodes the alpha subunit of mitochondrial processing peptidase (α MPP), a heterodimeric enzyme responsible for the cleavage of nuclear-encoded mitochondrial precursor proteins after import in the mitochondria. The patient fibroblasts showed decreased α -MPP level and reduction and fragmentation of mitochondrial network although the lactate level was increased only once during illness.

Keywords: *mitochondrial diseases; PMPCA; whole exome sequencing; functional studies*

Introduction and objective

Primary mitochondrial diseases (MTDs) form a clinically and genetically heterogeneous group of inherited disorders that arise as a result of a defect in mitochondrial energetic metabolism. The incidence of MTDs is estimated to 1:5000, which makes them one of the most recurrent groups of inherited disorders with an important burden for the society [1]. MTDs are progressive with variable severity of a wide range of symptoms and can emerge congenitally or anytime in life [2]. An MTD can be caused by mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) or nuclear DNA genes. Mutations in the nuclear DNA resulting in MTDs were found in more than 338 genes and can be inherited in autosomal recessive, dominant, and X-linked pattern [3].

Majority of mitochondrial proteins are encoded from nuclear DNA, synthesized in the cytosol, and then transported into the mitochondria as precursor proteins. These precursors proteins contain targeting peptides (TPs) [amino-terminal extensions] that function as import signals and are recognized by import receptors present on the mitochondrial membrane. Once imported into the mitochondria, the TP is separated, and protein can fold and mature, allowing for optimal protein function. These essential cleavage reactions are catalyzed by MPP (mitochondrial processing peptidase), soluble heterodimer of α -MPP and β -MPP subunits,

encoded by *PMPCA* and *PMPCB* respectively [4]. The limited studies available on *PMPCA* and *PMPCB* have suggested that the catalytic activity of MPP is confined to the β -MPP subunit, whereas the α -MPP subunit involved in substrate recognition [5]. The glycine-rich loop within the α -MPP subunit is largely responsible for substrate affinity and MPP functionality [6]. This loop is a key structural element of MPP that moves the precursor protein substrate toward the active site through a multistep process [4]. Here we describe one patient with a complex multisystem mitochondrial disease carrying novel compound heterozygous missense variants in *PMPCA* gene.

Material and Methods

DNA analysis. Blood samples from proband and his mother were collected and processed for DNA extraction in the laboratory. DNA from the proband and mother was sent for whole-exome sequencing (WES) to Theragen Etex, South Korea. DNA library was prepared using Illumina sequencing library kit (SureSelect XT V6). The captured libraries were sequenced using Illumina HiSeq 2000 Sequencers. The resulting VCF (variant call format) files were filtered to include nonsynonymous, splice site, and indel variants with an allele frequency <0.01 in 1000 Genomes Project, phase 3 [7]. Polymerase chain reaction (PCR) was performed to amplify the *PMPCA* mutations using the primers *PMPCA_F*: GAGAACACAGTTGGCCTCCA and *PMPCA_R*: TTCCCGCTACTTCACCTTGG, in order to perform Sanger sequencing. The results were analyzed using the SeqScanner 2 software.

Western blot. was performed to study the level of *PMPCA* protein on the fibroblasts isolated from the patient skin and two controls. Anti-*PMPCA* antibody (NBP1-89126, 1:1000 dilutions, Novus Biologicals) was used to probe the specific protein band at 53 kDa.

Immunostaining. The fibroblasts were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min and 10% Triton-X was used to permeabilize the cells before staining. The fixed slides were stored and used up to a week. Rabbit anti-*PMPCA* from Novus Biologicals (NBP1-89126) at a ratio of 1:100 and OXPHOS Rodent antibody cocktail from Abcam (ab110413) for staining of mitochondria at a dilution of 1:500 were used as a primary antibodies for double-staining of *PMPCA* and mitochondria, respectively.

Mitochondrial morphology. In ImageJ, we analyzed 200 fixed cells immunostained with the OXPHOS Rodent antibody cocktail (Abcam ab110413) for each the patient and a control sample. The morphometric parameters were counted using modified Image J macro [8]. The patient and control cells were statistically compared using t-test.

Results and discussions

The proband is an 8-yr-old male of Slovakia origin who was hospitalized at the age of 16 months with failure to thrive, delayed psychomotor development, development of spastic quadriparesis with minimal independent walking (Fig. 1). The MRI on the age of patient showed significant cortical and cerebellar atrophy and Leigh-like white matter and striatum changes. Laboratory tests revealed elevated levels of lactate in plasma only once during illness.

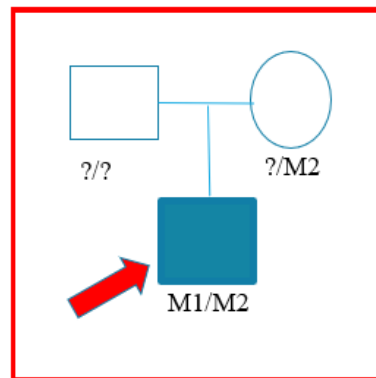


Fig. 1. Pedigree of the family carrying PMPCA mutations, arrow indicates the proband. Pedigree shows mother is a carrier of M2 mutation, the sample for DNA isolation from father is not available

Using whole exome sequencing two novel variants in the *PMPCA* gene were identified in the proband. The proband was confirmed to be compound heterozygous for the two missense *PMPCA* mutations (Chr 9: 139311491; p.Tyr241Ser and Chr 9: 139311520; p.Met251Val (Fig. 2B) by Sanger sequencing (Fig. 2). Mother is heterozygous for a single variant (p.Met251Val) (Fig. 2C). The *In silico* missense variant prediction methods such as PolyPhen-2, MutationTaster, and SIFT, identified these missense variants as likely to be deleterious (Tab. 1). Whole exome sequencing data visualization reveals the variants in the *PMPCA* gene are located in *trans* (they are at different reads) (Fig. 2C).

Tab. 1. *In silico* predictions and ACMG classification criteria
(PM or PP: Pathogenic moderate or supporting, VUS: Variant of uncertain significance)

Gene	Protein change	GERP Score	SIFT	POLYPHEN	PROVEAN	CADD Scale	Revel Score	ACMG [9]	ACMG Class
<i>PMPCA</i>	p.Tyr241Ser	5.81	Damaging	Probably Damaging	Damaging	25.7	0.51	PM2, PP3	VUS
<i>PMPCA</i>	p.Met251Val	5.81	Damaging	Benign	Damaging	15.21	0.606	PM2, PP3	VUS

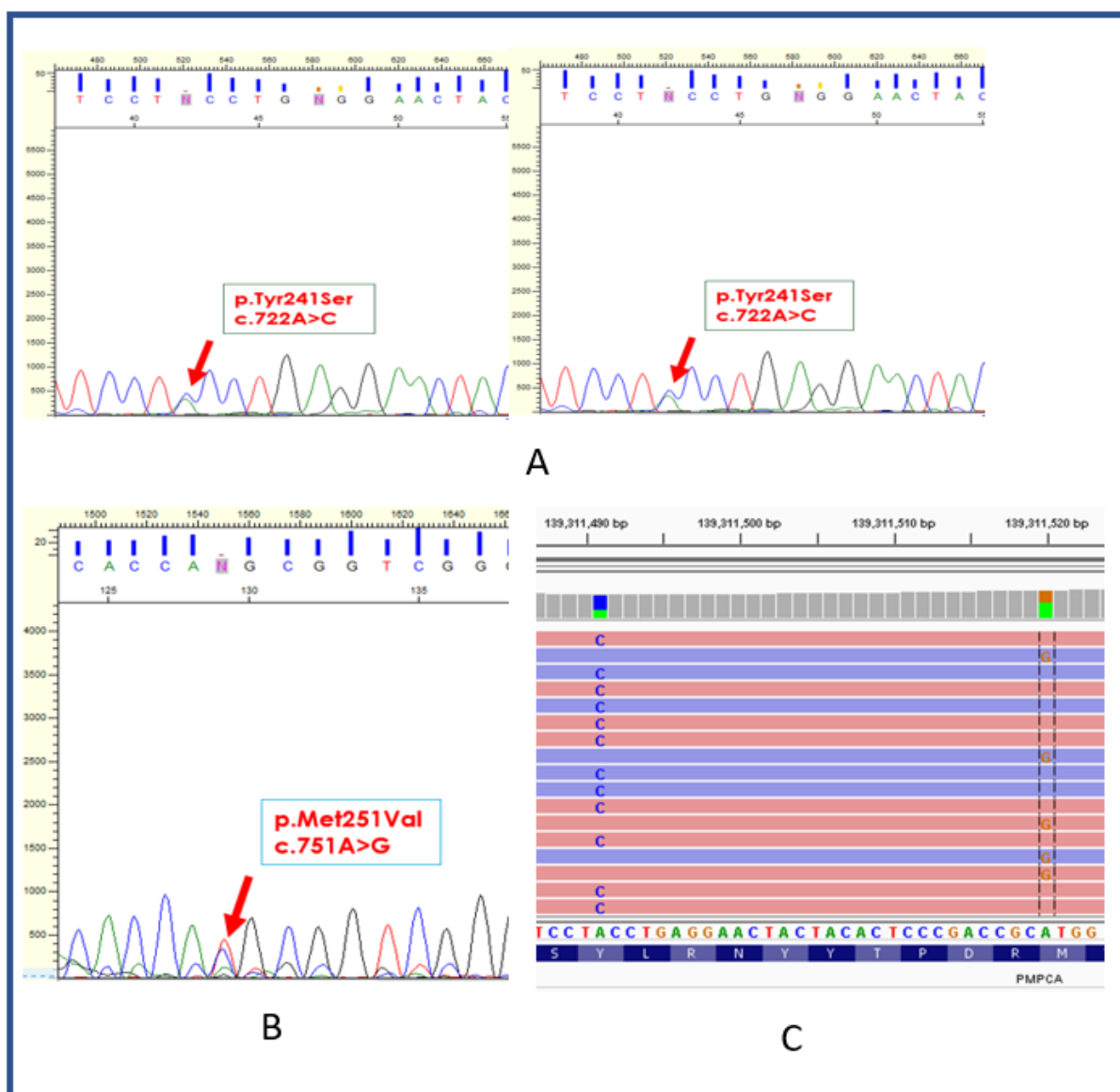


Fig. 2. DNA analysis (A) Electrophoregrams showing both heterozygous mutations p.Tyr241Ser and p.Met251Val in the proband. (B) Mother is carrying only a single variant p.Met251Val. (C) Visualization of individual reads carried out using IGV software shows that *PMPCA* gene variants are located in *trans*

To evaluate the functional effects of *PMPCA* variants, skin fibroblasts from the proband and two controls were obtained. Patient fibroblasts contained lower amount of α -MPP than control fibroblasts in western blot (Fig. 3). Immunofluorescence staining results suggest abnormal mitochondrial α -MPP distribution as compared to control (Fig. 4). Mitochondrial morphology is statistically different, confirming increased fragmentation of mitochondria in the patient cells (Fig. 5).

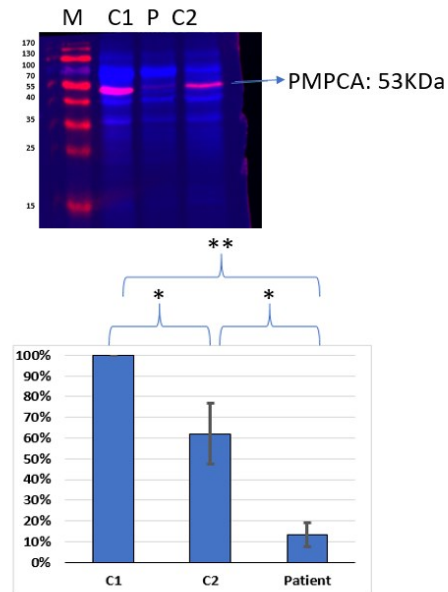


Fig. 3. Effects of *PMPCA* mutations on the α -MPP level in fibroblasts cultured from the proband (P) and 2 control samples (C1 and C2) Immunostaining with PMPCA antibody (red) and total protein staining (blue). The mean of the three technical replicates is plotted as ratio of intensity of the PMPCA signal normalized to total protein and relative to C1 sample. Statistically significant differences between control and patient cells ($p < 0.05$)

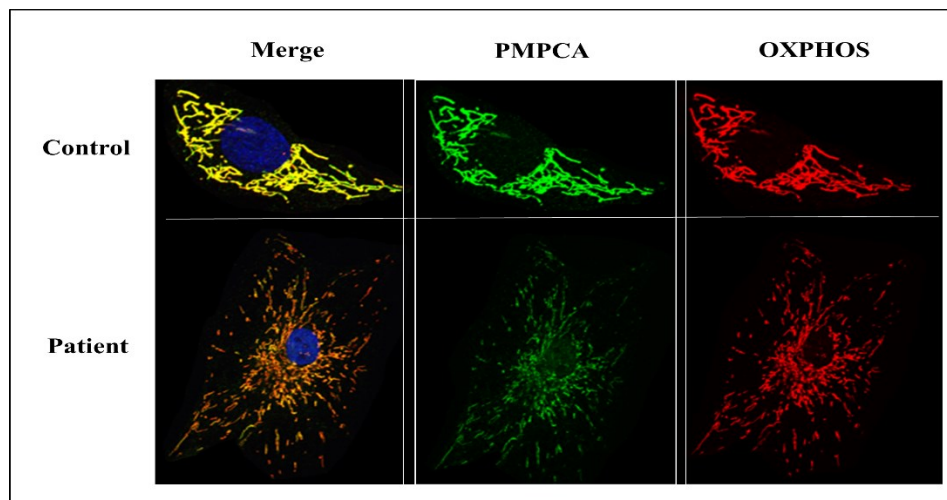


Fig. 4. Immunofluorescence staining pointed to abnormal mitochondrial α -MPP distribution in the patient fibroblasts (lower panel) as compared to a control

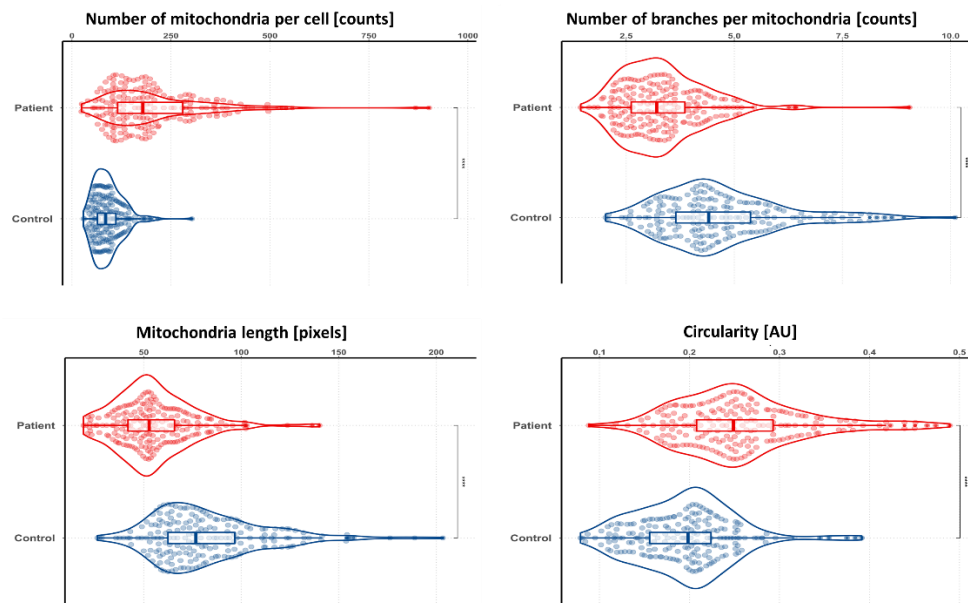


Fig. 5. Mitochondrial morphology Differences between control and patient cells were statistically significant ($p < 0.05$)

Conclusion

We have identified two novel variants in the *PMPCA* gene, that is responsible for the clinical picture of the patient. The *in vitro* functional studies we have performed up to now suggest the quantity as well as distribution of the α -MPP and mitochondrial morphology are impaired in the patient fibroblasts.

Financial supported by: APVV-17-0296.

References

- [1] Hopper R. K., Carroll S., Aponte A. M., et al. (2006) *Biochemistry* (45), p. 2524
- [2] Duchon M. R. (2004) *Mol. Aspects Med.* (25), p. 365
- [3] Mayr J. A., Haack T. B., Freisinger P., et al. (2015) *J. Inherit. Metab. Dis.* (38), p. 629
- [4] Egger J., Wilson J. (1983) *N. Engl. J. Med.* (309), p. 142
- [5] Kučera T., Otyepka M., Matušková A., et al. (2013) *PloS One* 8, p. e74518
- [6] Luciano P., Geoffroy S., Brandt A., et al. (1997) *J. Mol. Biol.* (272), p. 213
- [7] The International genome sample resource [Cited: 04 June, 2023]
<<http://www.1000genomes.org>>
- [8] Merrill R. A., Flippo K. H., Strack S. (2017) *Springer Protoc. Handb.*, p. 31
- [9] Richards, S., Aziz, N., Bale, S., et al., (2015) *Genet. Med.* 17(5), p. 405

Veľká neopísaná diverzita podrodu *Hystricochaetonotus* (Gastrotricha, Chaetonotidae, *Chaetonotus*) v strednej Európe

Františka Rataj Križanová, Peter Vďačný

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra zoológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; krizanova66@uniba.sk

Abstract

A huge undescribed diversity of the subgenus *Hystricochaetonotus* (Gastrotricha, Chaetonotidae, *Chaetonotus*) in Central Europe

The subgenus *Hystricochaetonotus* Schwank, 1990 is one of the most species-rich subgenera of *Chaetonotus* Ehrenberg, 1830. It has a worldwide distribution and encompasses 37 species predominantly living in the benthos and periphyton of limnetic habitats. We have discovered further nine new species in running and stagnant waters in Slovakia (Central Europe): *Ch. (H.) arcanus*, *Ch. (H.) avarus*, *Ch. (H.) gulosus*, *Ch. (H.) iratus*, *Ch. (H.) luxus*, *Ch. (H.) mirabilis*, *Ch. (H.) optabilis*, *Ch. (H.) slavicus*, and *Ch. (H.) superbus*. The present barcoding analyses revealed that nuclear ITS2 sequences represent a powerful DNA barcode in addition to the mitochondrial COI gene. According to the multi-gene phylogenetic analyses, the lineage leading to the last common ancestor of the *Hystricochaetonotus* clade is the longest internal branch within the family Chaetonotidae Gosse, 1864. Members of the subgenus *Hystricochaetonotus* are morphologically highly heterogeneous and parallel evolution of *Chaetonotus*-like and/or *Hystricochaetonotus*-like characters of scales and spines occurred during its radiation.

Keywords: CBC; cytochrome c oxidase; ITS2; rDNA cistron; RNA secondary structure

Úvod a formulácia cieľa

Kmeň brušnobrvice (Gastrotricha) zahŕňa predovšetkým kozmopolitne rozšírené mikroskopické bezstavovce, ktoré sa vyskytujú vo väčšine akvatických biotopov. Aj napriek svojmu častému výskytu boli dlho zaznávanou skupinou organizmov a len v posledných rokoch vzbudili vyšší záujem vedeckej obce [1, 2]. V recentnej minulosti sa pomocou kombinácie morfológického a molekulárneho prístupu podarilo poskytnúť celistvé informácie o novom druhu sladkovodného brušnobrvice čeľade Chaetonotidae z územia Bratislavy ako aj o jeho fylogenetickú pozíciu [3]. V nadväznosti na predchádzajúce zistenia sme sa preto zamerali na integračnú taxonómiu jedného z druhovo najbohatších podrodov v rámci tejto taxonomicky komplikovanej čeľade. Našimi hlavnými cieľmi bolo: (i) využiť CBC analýzy a sekundárne štruktúry jadrového génu kódujúceho rRNA molekuly malej ribozomálnej podjednotky (18S rRNA molekula), veľkej ribozomálnej podjednotky (5.8S a 28S rRNA molekuly), prepisovaných medzerníkov ITS1 a ITS2, ako aj primárnu štruktúru mitochondriálneho génu kódujúceho enzým cytochróm c oxidázu (COI gén) na zhodnotenie skrytej diverzity sladkovodných Gastrotricha podrodu *Hystricochaetonotus* na vybraných lokalitách na Slovensku, (ii) určiť fylogenetickú pozíciu izolovaných druhov pomocou

konkatenovaných dátových súborov obsahujúcich sekvencie jadrového 18S rRNA génu, 28S rRNA génu a mitochondriálneho génu kódujúceho enzým cytochróm *c* oxidázu a v neposlednom rade (iii) morfo-molekulárne charakterizovať nedostatočne známe, prípadne doposiaľ neopísané druhy podrodu *Hystricochaetonotus* zaznamenané na vybraných lokalitách na Slovensku.

Materiál a metódy

Vzorky s nálezom brušnobrvcov pochádzali zo šiestich sladkovodných telies zo Slovenska. Obsahovali vrchnú vrstvu detritu (1–2 cm) a približne 0,5 litra vody nabratej spolu so sedimentom. Po prevoze do laboratória boli uskladnené na tmavom mieste pri izbovej teplote jeden mesiac. Pozorovanie vrchných vrstiev detritu prebiehalo pod mikroskopom Zeiss Axio Imager A2. Jednotlivé jedince boli po jednom zbierané zo vzorky s prispôbenou Pasteurovou mikropipetou.

Následne sa vkladali do kvapky 0,5% roztoku $MgCl_2$ s cieľom narkotizácie a obmedzenia mobility brušnobrvca [4]. Premyté a uspaté jedince boli pozorované pomocou imerzného objektívu a diferenciálneho interferenčného kontrastu na 1000–2500× zväčšení. Habitus a taxonomicky dôležité znaky boli zaznamenané fotoaparátom Canon EOS 80D. Jedince sa po dôkladnej morfolologickej analýze odobrali do lyzačného pufru. Z brušnobrvcov bola izolovaná DNA a následne sa amplifikovali jej požadované úseky pomocou PCR univerzálnych eukaryotických primerov, v prípade mitochondriálneho COI génu bol použitý špecifický primer pre *Gastrotricha*. Primery a PCR protokoly sú podrobne uvedené v práci Križanová & Vďačný [3]. Ak boli pri elektroforéze rozoznané aj nešpecifické amplifikácie, cieľové PCR produkty sa ešte pred procesom sekvenovania vyrezali z gélu.

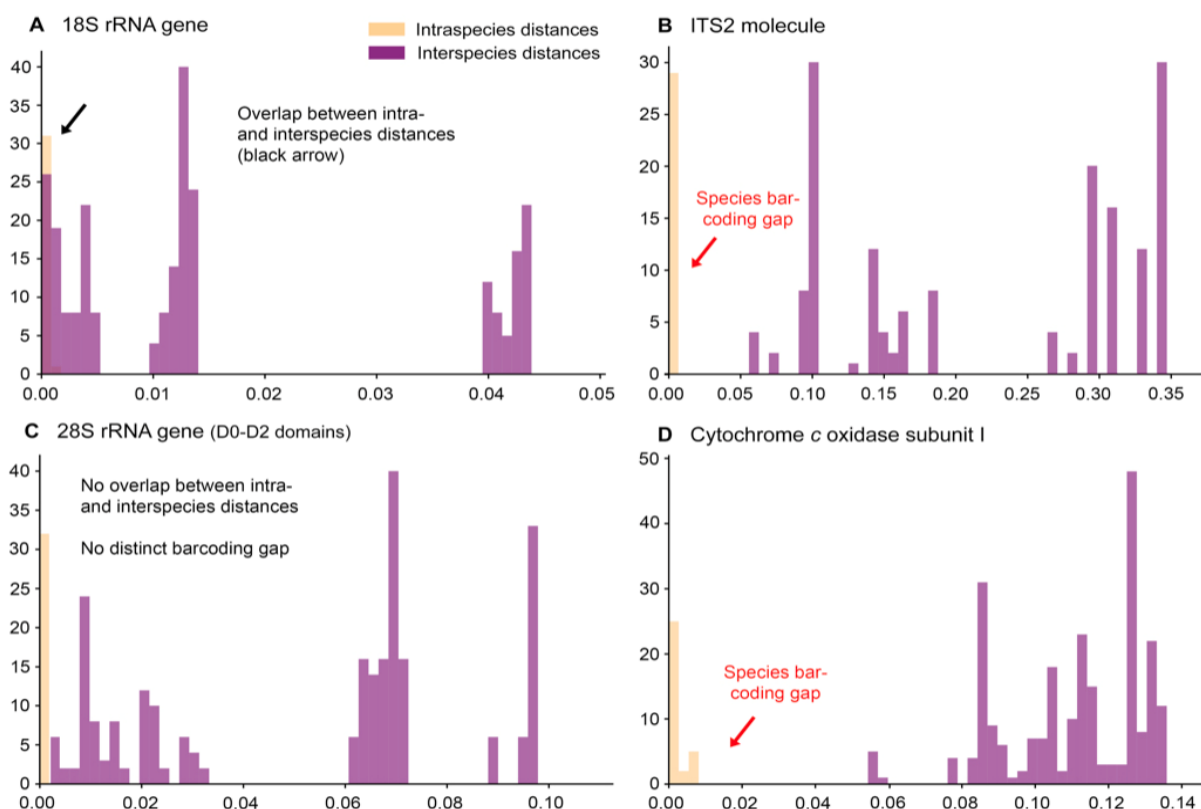
Získané sekvencie sa posudzovali pomocou CBC analýzy (hľadanie kompenzačných nukleotidových zámien v helixoch medzi dvomi taxónmi) implementovanej v programe 4SALE [5]. Fylogenetické analýzy sa vyhodnotili pomocou metódy maximálnej vierohodnosti (program IQTREE [6] dostupný na <http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) a Bayesiánskeho štatistického prístupu (program MrBayes ver. 3.2.7) [7].

Výsledky a diskusia

Podrod *Hystricochaetonotus* Schwank, 1990 je jedným z druhovo najbohatších podrodov rodu *Chaetonotus* Ehrenberg, 1830. Má celosvetové rozšírenie a zahŕňa 37 druhov žijúcich prevažne v bentose a perifytóne limnických biotopov. V tečúcich a stojatých vodách Slovenska sme objavili a opísali deväť nových druhov: *Ch. (H.) arcanus*, *Ch. (H.) avarus*, *Ch.*

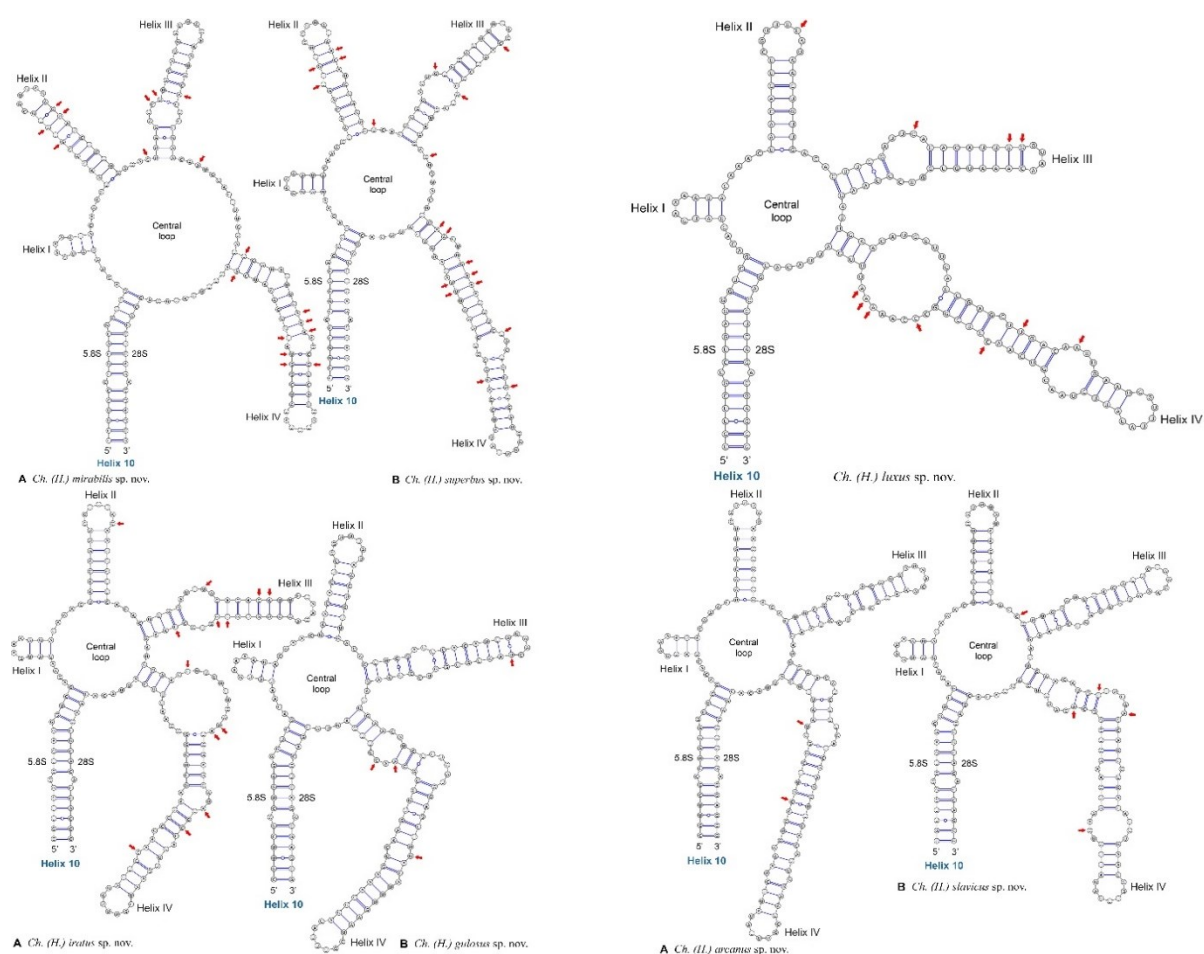
(*H. gulosus*, *Ch. (H.) iratus*, *Ch. (H.) luxus*, *Ch. (H.) mirabilis*, *Ch. (H.) optabilis*, *Ch. (H.) slavicus* a *Ch. (H.) superbus*.

Pomerne nedávno sme hodnotili užitočnosť rôznych molekúl pri identifikácii druhov radu Chaetonotida [3]. Súčasná barkódovacia analýza (Obr. 1) veľmi dobre potvrdzuje naše predchádzajúce zistenia. Konkrétnejšie vnútro- a medzidruhové *p*-vzdialenosti 18S sekvencií sa môžu prekryvať, t. j. dva odlišné druhy môžu zdieľať identické 18S rDNA sekvencie. Tento jav je spojený s vysokou konzervatívnosťou 18S rRNA génu a/alebo relatívne nedávnou divergenciou druhov. Niekoľko pozícií nukleotidov však môže byť zriedkavo polymorfných, čo vedie k vnútrodruhovým vzdialenostiam až do 0,11 % (súčasná štúdia). Vďaka kombinácii vysokej konzervatívnosti a zriedkavého polymorfizmu nie je 18S rRNA gén vhodný na to, aby sa stal DNA barkódom alebo pre-barkódom v molekulárnej taxonómii radu Chaetonotida. Na druhej strane 28S sa môže použiť ako prebarkód DNA, pričom helixy 25es7–25es7c sú taxonomicky najdôležitejšie, pretože práve v nich sa majú tendenciu hromadiť druhovo špecifické mutácie.



Obr. 1. Histogramy znázorňujúce vnútro- a medzidruhové *p*-vzdialenosti štyroch molekulárnych markerov študovaných v deviatich nových druhoch brušnobračcov
Čierna šípka označuje prekrytie medzi vnútrodruhovými a medzidruhovými *p*-vzdialenosťami (A); červené šípky označujú zreteľné barkódovacie medzidruhové medzery (B, D)

V neposlednom rade je COI gén taktiež ideálny mitochondriálny DNA barkód umožňujúci jednoznačnú identifikáciu v rámci tohto naozaj bohatého rodu. V tejto štúdii sme pridali ITS2 ako ďalší spoľahlivý barkód jadrovej DNA (Obr. 3). Každý študovaný druh podrodu *Hystricochaetonotus* má jedinečnú primárnu a sekundárnu štruktúru ITS2 molekuly. Okrem toho sa medzidruhové *p*-vzdialenosti pohybujú od 5,88 % až do 34,76 % a medzi druhmi sú až štyri CBC (kompenzátorne zámény báz). Je dôležité poznamenať, že v študovaných ITS2 molekulách nebola zistená žiadna vnútrodruhová variabilita. Podľa Müllera et al. [8] jedna kompenzátorna zámena báz (CBC) v helixe môže rozlíšiť dva druhy s pravdepodobnosťou 0,93. Je zaujímavé, že sme zistili aspoň jednu CBC zámenu v rDNA cistróne medzi takmer všetkými párami druhov. Ak sme nedetegovali žiadne CBC zámény v ITS2, tak jednotlivé druhy mohli byť dobre oddelené primárnou štruktúrou 18S, 28S a/alebo COI. Tieto zistenia dokumentujú, že rDNA cistrón spolu s COI sú užitočnými nástrojmi na vymedzenie a identifikáciu druhov kmeňa *Gastrotricha*.



Obr. 2. Sekundárne štruktúry ITS2 molekuly v rámci podrodu *Hystricochaetonotus*
ITS2 molekula má zreteľné odlišnú štruktúru naprieč všetkými novoopísanými druhmi zo Slovenska

Diverzita a evolučné vzťahy sa nemusia nevyhnutne odrážať aj v morfolologickej rozdielnosti či podobnosti. Nesúlad medzi morfológickou podobnosťou a fylogenezou sa častokrát vyskytuje v mikroskopickom svete. Napríklad znaky kutikulárnych štruktúr, ktoré sa tradične používajú v taxonómii Chaetonotida [9], vznikli viackrát paralelne na základe fylogenetických stromov odvodených z niekoľkých tisícok nukleotidových znakov [10]. Morfologicky definovaný rod *Chaetonotus* a jeho podrody *Chaetonotus*, *Hystricochaetonotus* a *Primochaetus* Kisielewski, 1997 sú tak na základe molekulárnych analýz poly/parafyletické (napr. [3]; [11]; [12]). Na vyriešenie týchto problémov, ktoré sa ukázali už v prvých kladistických analýzach založených na morfológii [13], je priam nutné do systematiky Gastrotricha použiť a plne integrovať molekulárne údaje. Na základe multigénových fylogenetických analýz bola línia vedúca k poslednému spoločnému predkovi podrodu *Hystricochaetonotus* najdlhšou vnútornou vetvou v rámci čeľade Chaetonotidae Gosse, 1864. Keďže členovia podrodu *Hystricochaetonotus* sú morfologicky vysoko heterogénni, s najväčšou pravdepodobnosťou došlo počas radiácie tohoto rozmanitého podrodu k paralelnej evolúcii kutikulárnych znakov (najmä šupín a ostňov), ktorých časť je typická aj pre podrod *Chaetonotus*.

Záver

Druhy kmeňa Gastrotricha sú výsledkom miliónov rokov evolúcie, ktorá sa zapísala nielen do ich morfológie, ale aj do ich molekúl. Tento fakt sa doteraz neprejavil v druhových diagnózach, ktoré tradične obsahujú len morfologické znaky. Preto navrhujeme úplnú integráciu molekúl do taxonómie a klasifikácie brušnobrcov a zasadzujeme sa za ich miesto pri rozpoznávaní, identifikácii a diagnostike druhov. Molekuly by sa tiež mali stať spoľahlivými diagnostickými znakmi kryptických alebo takmer kryptických druhov, pretože obsahujú kľúčové znaky, ktoré ich umožňujú spoľahlivo rozlíšiť. Pomocou integratívneho morfo-molekulárneho taxonomického prístupu sme objavili a charakterizovali deväť nových druhov brušnobrcov zozbieraných z kontinentálnych vôd strednej Európy.

PodĎakovanie

Táto práca bola podporovaná Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaŠ SR a SAV (projekt VEGA 1/0013/21) a Univerzitou Komenského v Bratislave (grant UK/210/2022).

Zoznam použitej literatúry

[1] Kolicka M. (2020) Systematics of the Gastrotrichs from the family Chaetonotidae

(Gastrotricha, Chaetonotida) Based on the Integrative Taxonomy Approach. (PhD thesis)
Adam Mickiewicz University, Poznań

- [2] Kårneby T. (2011) *Zootaxa* 3115(1), p. 29
- [3] Križanová F., Vďačný P. (2021) *Zool. Anz.* 292, p. 207
- [4] Todaro M. A., Sibaja-Cordero J. A., Segura-Bermúdez O. A., et al. (2019) *Diversity*. 11(7), p. 1
- [5] Seibel P. N., Müller T., Dandekar T., et al. (2006) *BMC Bioinform.* 7, p. 1
- [6] Nguyen L. T., Schmidt H. A., von Haeseler A., et al. (2015) *Mol. Biol. Evol.* 32(1), p. 268
- [7] Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., et al. (2012) *Systematic Biology* 61(3), p. 539
- [8] Müller T., Philippi N., Dandekar T., et al. (2007) *Distinguishing species. RNA* 13(9), p. 1469
- [9] Kisielewski J. (1997) *Ann. Zool. (Wars.)* 46, p. 145
- [10] Kieneke A., Schmidt-Rhaesa A. (2015) *Gastrotricha*. In: Schmidt-Rhaesa A. (ed.) *Handbook of Zoology 3. Gastrotricha and Gnathifera: 1–134*. De Gruyter, Berlin, Boston, p. 87
- [11] Kårneby T., Todaro M. A., Jondelius U. (2013) *Zool. Scr.* 42(1), p. 88
- [12] Kolicka M., Dabert M., Olszanowski Z., et al. (2020) *Cladistics* 36 (5), p. 458
- [13] Kieneke A., Riemann O., Ahlrichs W. H. (2008) *Zool. Scr.* 37(4), p. 429

Cielená mutagenéza ťažko exprimovateľných proteínov v bakteriálnych systémoch

Oliver Ripka¹, Júlia Šarkanová², Stanislav Voško¹, Martin Šafránek⁴, Viktor Demko^{3,4},
Zdenko Levarski^{1,2}, Stanislav Stuchlík^{1,2}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; ripka2@uniba.sk

²Univerzita Komenského v Bratislave, Vedecký park, Ilkovičova 8, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

³Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyziológie rastlín, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

⁴Centrum biológie rastlín a biodiverzity Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Oddelenie experimentálnej biológie rastlín, Botanický ústav, Dúbravská cesta 9, 845 23 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Targeted mutagenesis of proteins difficult to express in bacterial systems

DEK1 calpain is a highly conserved plant protein containing 21 to 23 transmembrane segments. DEK1 plays a key role in the formation of a layer of epidermal cells in a plant embryo. In our work we have focused to create mutation in CysPc-C2L gene to increase its solubility by using prediction server Aggrescan 2.0. Mutations were inserted by site directed PCR mutagenesis and the mutated gene was supposed to be inserted into pOpinM plasmid to allow testing of solubility in *E. coli* cells.

Keywords: DEK1 calpain, CysPc-C2L domain, targeted mutagenesis, in silico analysis

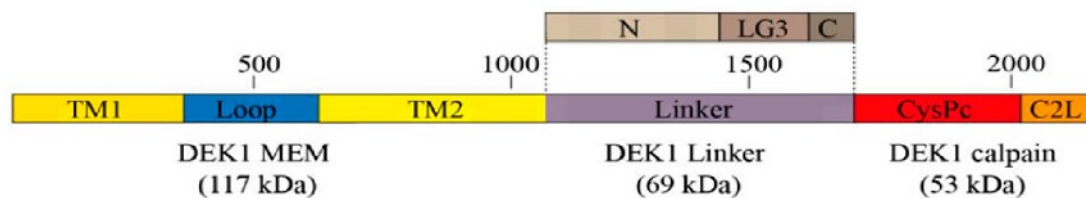
Úvod a formulácia cieľa

Kalpaíny patria do skupiny cysteínových proteáz ktoré sú závislé od vápnikových kationov. Sú vysoko konzervované v evolúcii. Boli identifikované vo viacerých známych organizmoch okrem archeónov, kde doteraz neboli zaznamenané.

Defective kernel 1 (DEK1) je vysoko konzervovaný kalpaín s veľkosťou 240 kDa. Považuje sa za rozhodujúci regulátor priestorovej orientácie suchozemských rastlín. Keď došlo k cielenej mutácii v géne pre DEK1 kalpaín, nedochádzalo k diferenciácii protodermálnej vrstvy. Z toho vyplýva, že DEK1 kalpaín hrá kľúčovú úlohu v globulárnom štádiu vývinu embrya rastlín [1].

Proteín DEK1 je to transmembránový proteín tvorený 23 úsekmi, spojenými cytoplazmatickou slučkou (Obr. 1.). Na C-konci transmembránového úseku sa nachádza samotná proteázová doména CysPc aj s regulačnou doménou C2L. 600 aminokyselinový linker, ktorý spája membránovú časť s kalpaínovou doménou, je vysoko konzervovaný v líniiach suchozemských rastlín. DEK1 linker je tvorený z troch častí. Predpokladá sa, že LG3

doména je zodpovedná za reguláciu aktivácie celého komplexu. Transmembránová oblasť presne reguluje aktivitu C-terminálnej kalpainovej proteázy [2].



Obr. 1. Schématická štruktúra DEK1 kalpainu [2].

Aggrescan 2.0 je webový softvér, ktorý vyhľadá miesta záujmu pre mutáciu- Hot Spots v polypeptidovej sekvencii. Analyzuje vplyv zmien v sekvencii na agregračné vlastnosti proteínu a hodnotí rozdiely medzi jednotlivými variantmi [3]. Prekonáva algoritmy založené na sekvenciách pri analýze proteínov v ich natívnych stavoch [4,5] a využíva CABS-Flex algoritmus, ktorý dokáže analyzovať proteíny o dĺžke až 4000 aminokyselinových zvyškov. Zároveň nám umožňuje tvoriť automatické mutácie, na základe ktorej vieme vyhľadávať APS (Aggregation Prone Spots) miesta podliehajúce agregácii a predkladá vhodné mutácie pre zvýšenie solubility proteínu [3].

Cieľom našej práce je *in silico* nadizajnovanie mutácie za účelom zvýšenia solubility s dôrazom na využitie metódy site-directed PCR za cieľom zvýšenia solubility produkovanej domény CysPc-C2L.

Materiál a metódy

Na zvýšenie solubility produkovanej domény sme zvolili metódu cielenej mutagenézy, ktorú sme overovali pomocou Aggrescan 2.0, kde sme sa snažili pomocou mutácií mimo aktívneho centra dosiahnuť c. skóre 0 alebo nižšie ako 0.

Pre amplifikáciu a mutagenézu jednotlivých úsekov proteínu sme využili špecifickú PCR reakciu. Pomocou navrhnutých primerov (Tab. 1), ktoré obsahovali vybranú mutáciu, sme amplifikovali jednotlivé úseky proteínu. PCR sme pripravovali na objem 50 μ l. Teplotný program ako aj koncentrácia jednotlivých zložiek boli použité podľa protokolu výrobcu polymerázy (Q5 High Fidelity DNA Polymerase, NEB). Anelačná teplota programu bola nastavená na 67 °C a ako templát nám slúžil plazmid pOpinM-MBP-CysPc-C2L.

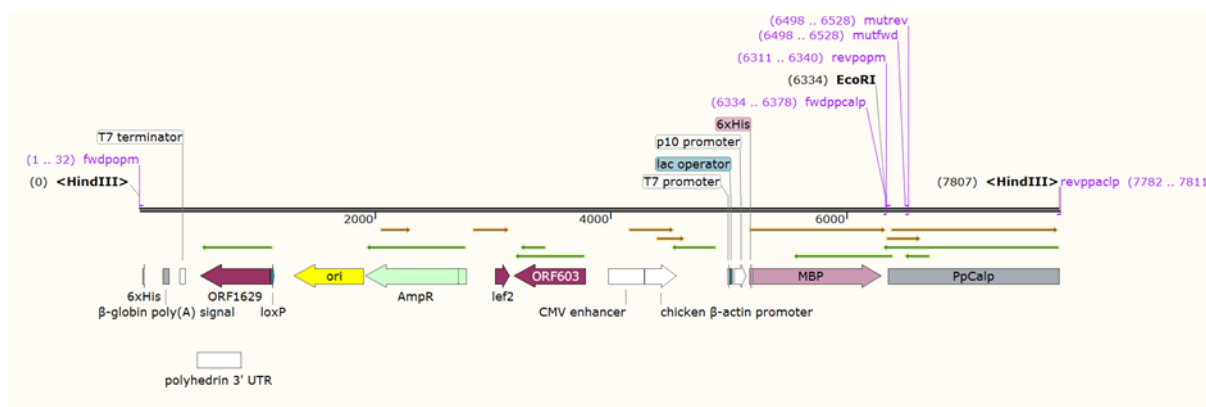
Tab. 1. Primery použité v PCR

fwppcalp	GGCCGAATTCGATGATGATGATAAAAAAGAAGAAGTTCTGCAGCG TATG
revppaclp	GGCCAAGCTTCTACAGCGGTTCCAGAATAATACTG
mutrev	GCGGCTCCACTTATTTGCAACCTGCAGTTTG
mutfwd	CAAACCTGCAGGTTGCAAATAAGTGGAGCCGC
fwdpopm	GGCCAAGCTTAGCTTTCTAGACCAGTTTAAACATCAC
revpopm	GGCCGAATTCCCTGAAACAGAACTTCCAGACCG

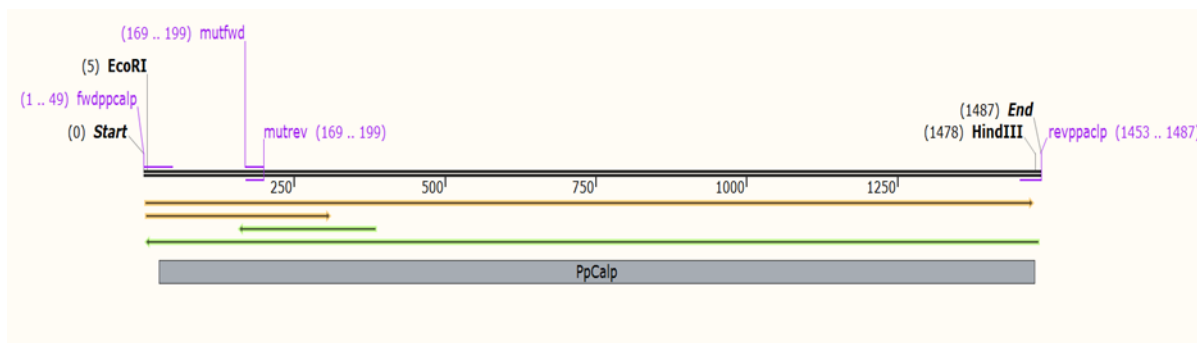
Na vytvorenie inzertu bolo treba spraviť fúziu PCR ktorá slúžila na vytvorenie inzertu s vloženou mutáciou. Templát na túto reakciu nám slúžil pôvodný gén (CysPC-C2L).

Výsledky a diskusia

Podarilo sa nám nadizajnovať mutáciu V59A v CysPC-C2L doméne ktorá vykazuje c. score -0,544217 v Aggrescan 2.0 (Obr. 2.) a vďaka tomu sme nadizajnovali 6 primerov, ktoré nám umožnili zvýšiť solubilitu (Tab.1.). Na základe *in silico* analýzy sa nám podarilo amplifikovať 2 fragmenty ktoré sme navzájom spojili použitím ligácie a vďaka tomu na nám podarilo pripraviť inzert s vloženou mutáciou (Obr. 3.).



Obr. 2. Finálny konštrukt (7807 bp).



Obr. 3. Inzert fúzneho fragmentu (1487 bp).

Záver

V práci sa zameriavame na cieleňú mutagenézu CysPc-C2L domény *in silico* analýzou v Aggrescane 2.0, za cieľom zvýšiť jej mieru solubility pri heterologickej produkcii rastlinného DEK1 kalpaínu. Zo získaných výsledkom môžeme konštatovať, že *in silico* analýza bola úspešná a boli schopní zvýšiť solubilitu. Použitý postup a PCR reakcií expresie je optimálny.

PodĎakovanie

Príspevok je výsledkom realizácie projektov APVV-17-0570, APVV-21-0227 a LISPER (ITMS2014:313011V446) na základe podpory operačného programu Integrovaná infraštruktúra financovaného z ERDF. Táto práca bola taktiež čiastočne podporená zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja v rámci projektu USCCCORD (ŽoNFP: NFP313020BUZ3), OP Integrovaná infraštruktúra.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Johnson K. L., Degan K. A., Walker J. R., et al. (2005) Plant. J. 44, p. 114
- [2] Johansen W., Ako E., Demko V., et al. (2016) Plant. Physiol. 172, p. 1089
- [3] Kuriata A., Iglesias V., Pujols J., et al. (2019) Nucleic Acids Res. 47 (W1), p. W300
- [4] Zambrano R., Jamroz M., Szczasiuk A., et al. (2015) Nucleic Acids Res. 43, p. W306
- [5] Pujols J., Pena-Díaz S., Ventura S. (2018) Methods Mol. Biol. 1762, p. 427

Kvantitatívne hodnoty radiálnych a ulnárnych kľučiek a ich využitie vo forenzej praxi

Ivana Salaková, Mária Chovancová, Petra Švábová

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra antropológie,
Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
ivana.salakova97@gmail.com*

Abstract

Quantitative values of radial and ulnar loops and their use in forensic practice

Both types of loops, radial and ulnar are important characteristics used in fingerprint identification because they can help to differentiate one individual from another. The accurate pattern and positioning of these loops are unique to each person and are used in forensic practice, such as in criminal investigations or in establishing the identity of missing persons. The measured set consisted of 154 fingerprints (loops on the left and right index fingers) of which 56 were radial loops (10 males and 18 females) and 98 were ulnar loops (23 males and 26 females). As a result, significant differences were only in VJSIR parameter in both groups (Lu-Lu, Lr-Lr). In Lu-Lu there were bilateral differences in both biological sexes: males ($p = 0.037$), females ($p = 0.019$). Intersexual differences were statistically significant in Lr-Lr: left hand ($p = 0.007$) and right hand ($p = 0.028$).

Keywords: *dermatoglyphics; radial loop; ulnar loop; fingerprint; pattern.*

Úvod a formulácia cieľa

Už takmer 100 rokov sa odtlačky prstov používajú na identifikáciu podozrivých a obetí. S rastúcou potrebou spoľahlivej identifikácie osôb sa zvýšilo aj používanie odtlačkov prstov vo vládných a civilných oblastiach, ako je kontrola hraníc, previerky do zamestnania a bezpečnostný prístup k zariadeniam [1].

Osobná identifikácia znamená určenie identity jedinca, môže byť úplná (absolútna) alebo neúplná (čiastočná). Pre najúspešnejší spôsob sa využíva kombinácia viacerých metód identifikácie. Odhaduje sa, že pravdepodobnosť, že dve osoby budú mať identické odtlačky prstov je asi 1 : 64 000 mil. svetovej populácie. Dokonca ani odtlačky prstov jednovaječných dvojčiat nie sú rovnaké [2].

Existuje viacero typov dermatoglyfických útvarov, pričom medzi základne tri patria oblúček, kľučka a vír. Najčastejšie sa vyskytujúce dermatoglyfické útvary v populácii sú kľučky (u 60 – 65 % jedincov). Práve odtlačky prstov môžu poskytnúť rozhodujúci dôkaz, vďaka ktorému sa získajú základné informácie o obetiach a podozrivých použitím rôznych dermatoglyfických prvkov, do ktorých spadajú typy vzorov, počet papilárnych línií, ich hustota a rôzne iné znaky dermatoglyfických vzorov na odtlačkoch prstov. Kľučky sa delia na dva typy: radiálne a ulnárne kľučky. Radiálne a ulnárne kľučky sa nevyskytujú s rovnakou frekvenciou. Prevažnú väčšinu kľučiek predstavujú ulnárne kľučky, ktoré sú veľmi hojné

na všetkých prstoch. Naopak, radiálne kľučky sa vyskytujú s oveľa nižšou frekvenciou, väčšinou na ukazovákoch a ich frekvencia na ostatných prstoch je nižšia, s prakticky nulovou frekvenciou na malíčkoch [3,4].

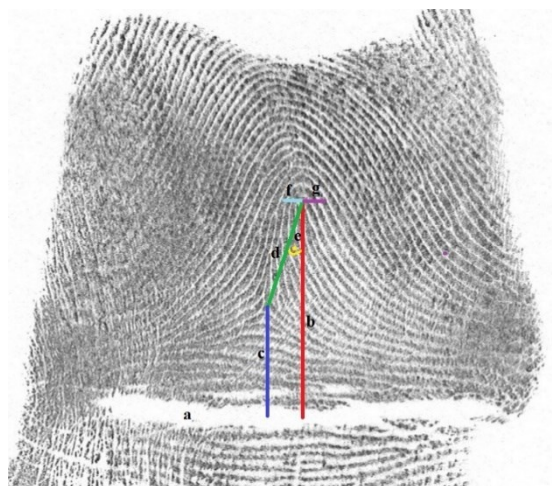
V súčasnosti sa z dôkazov získaných z miesta činu nedá jasne určiť, či sa jedná o kľučky radiálne alebo ulnárne. Radiálne kľučky z pravej ruky a ulnárne kľučky z ľavej ruky majú rovnakú orientáciu (s kaudou orientovanou vľavo) a naopak. V dôsledku toho musí byť každá kľučka porovnaná so všetkými kľučkami rovnakej orientácie kaudy bez ohľadu na pôvod ich laterality [5].

Naším cieľom bolo zistenie rozdielov v kvantitatívnych hodnotách medzi radiálnymi a ulnárnymi kľučkami, určenie bilaterálnych a intersexuálnych rozdielov radiálnych a ulnárnych kľúčiek na konkordantných ukazovákoch, teda zistiť, či existujú medzi radiálnymi a ulnárnymi kľučkami také veľkostné alebo tvarové rozdiely, ktoré by umožňovali na základe nájdeného odtlačku prsta zistiť, z ktorej ruky pochádza, a tým prispieť k zjednodušeniu individuálnej identifikácie.

Materiál a metódy

Meraný súbor predstavovalo 154 konkordantných odtlačkov prstov (kľúčiek na ukazovákoch ľavej a pravej ruky) z toho bolo 56 radiálnych kľúčiek (10 mužov a 18 žien) a 98 ulnárnych kľúčiek (23 mužov a 26 žien). Súbor odtlačkov prstov bol poskytnutý katedrou antropológie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave. Do hodnoteného súboru boli zaradené iba tie odtlačky prstov, ktoré dosahovali potrebnú kvalitu a obsahovali všetky náležitosti a body potrebné pre ich vyhodnotenie. Odtlačky, ktoré nebolo možné použiť sme zo súboru museli vyradiť. Dôvodom vyradenia bola nízka kvalita odtlačkov a zle viditeľné (rozmazané) papilárne línie. Vyhodnotenú parametre znázorňuje Obr. 1.

Metóda sa zakladá na kvantitatívnej analýze odtlačkov prstov vo zvolenej skupine jedincov. Odtlačky boli odobraté pomocou čiernej daktyloskopickéj farby valivou metódou na papier. Neskôr boli naskenované do digitálnej podoby pri rozlíšení 1200 dpi. Na meranie jednotlivých rozmerov odtlačkov prstov bol použitý program Digimizer 6. Získané rozmery sa merali v pixeloch. Výsledky merania boli spracované v programe Microsoft Excel 2016 a následne štatisticky spracované v IBM SPSS Statistics 24. Normalita rozdelenia dát bola testovaná Shapiro-Wilkovým testom. Bilaterálne rozdiely boli v prípade normálneho rozloženia dát zisťované párovým t-testom. Pri dátach, ktoré nemali normálne rozloženie dát bol použitý Wilcoxonov test. Dáta boli testované na hladine významnosti $\alpha = 0,05$.



Obr. 1. Hodnotené rozmery na radiálnej kľučke ľavej ruky

a interfalangálna ryha; b spojnica jadro – stred interfalangálnej ryhy; c spojnica trirádus – stred interfalangálnej ryhy; d spojnica jadro – trirádus a RC (ridge count); e uhol zvierajúci spojnicu jadro – stredová interfalangálna ryha a spojnicu jadro – trirádus; f vzdialenosť jadra (od distálnej radianty trirádia) po ulnáry okraj vo výške samotného jadra; g vzdialenosť jadra (od distálnej radianty trirádia) po radiálny okraj vo výške samotného jadra

Výsledky a diskusia

Výsledky tejto štúdie ukázali viaceré rozdiely v nameraných hodnotách radiálnych a ulnárych kľúčiek pochádzajúcich z ukazovákov. Napriek obmedzenej veľkosti vzorky v oboch skupinách (definovaných kombináciou biologického pohlavia a laterality kľúčiek) boli hodnotené rozmery kľúčiek významne vyššie u mužov ako u žien (tab. 1, 2).

Tab. 1. Bilaterálne a intersexuálne rozdiely radiálnych kľúčiek (Lr) na konkordantných ukazovákoch

N – počet jedincov, SD – smerodajná odchýlka, p – hodnota významnosti, VJSIR – výška jadro – stredová interfalangálna ryha, VTSIR – výška trirádus – stredová interfalangálna ryha, DSJT – dĺžka spojnice jadro – trirádus, U – uhol, VJUG – vzdialenosť jadro – ulnáry gradient, VJRG – vzdialenosť jadro – radiálny gradient, RC – ridge count (počet línií) na spojnici jadro – trirádus

Lr-Lr	Muži (N = 10)				Ženy (N = 18)				Intersexuálne rozdiely		Bilaterálne rozdiely	
	Ľavá ruka		Pravá ruka		Ľavá ruka		Pravá ruka		Ľavá ruka	Pravá ruka	Muži	Ženy
	Priemer	SD	Priemer	SD	Priemer	SD	Priemer	SD	p	p	p	p
VJSIR	666,42	93,32	662,21	106,02	546,90	72,60	522,74	61,24	0,007	0,028	0,799	0,143
VTSIR	401,35	86,41	388,56	87,59	377,19	72,48	346,10	78,68	0,878	0,203	0,445	0,165
DSJT	335,21	213,69	358,24	186,10	203,99	77,88	221,57	86,17	0,169	0,241	0,799	0,494
U	32,82	17,65	36,29	25,87	23,44	13,07	29,43	15,79	0,445	0,445	0,799	0,089
RC	10,20	9,78	10,30	9,92	5,28	4,04	6,17	4,62	0,312	0,384	0,726	0,456
VJUG	145,98	151,66	180,06	205,52	68,81	54,26	89,02	82,37	0,333	0,508	0,646	0,313
VJRG	159,51	149,39	162,29	169,42	72,18	62,40	101,29	99,98	0,333	0,575	0,959	0,158

Signifikantné bilaterálne rozdiely radiálnych kľúčiek neboli významné ani u jedného biologického pohlavia. Intersexuálne rozdiely boli štatisticky významné iba pri jednom meranom parametri (výška jadro – stredová interfalangálna ryha) na ľavej aj pravej ruke.

Tab. 2. Bilaterálne a intersexuálne rozdiely ulnárných (Lu) kľúčiek na konkordantných ukazovákoch

N – počet jedincov, SD – smerodajná odchýlka, p – hodnota významnosti, VJSIR – výška jadro – stredová interfalangálna ryha, VTSIR – výška trirádus – stredová interfalangálna ryha, DSJT – dĺžka spojnice jadro – trirádus, U – uhol, VJUG – vzdialenosť jadro – ulnáry gradient, VJRG – vzdialenosť jadro – radiálny gradient, RC – ridge count (počet línií) na spojnici jadro – trirádus

Lu-Lu	Muži (N = 23)				Ženy (N = 26)				Intersexuálne rozdiely		Bilaterálne rozdiely	
	Ľavá ruka		Pravá ruka		Ľavá ruka		Pravá ruka		Ľavá ruka	Pravá ruka	Muži	Ženy
	Priemer	SD	Priemer	SD	Priemer	SD	Priemer	SD	p	p	p	p
VJSIR	622,49	84,75	591,59	87,82	575,46	65,08	551,80	64,62	0,061	0,077	0,037	0,019
VTSIR	395,94	88,08	376,03	96,51	381,08	55,39	376,69	55,50	0,503	0,725	0,132	0,728
DSJT	314,38	113,67	306,94	109,36	267,53	90,67	263,55	116,01	0,132	0,148	0,598	0,859
U	39,35	12,85	40,10	14,61	41,39	11,64	42,67	14,97	0,680	0,722	0,797	0,699
RC	10,48	4,69	10,43	5,35	9,15	4,26	9,15	5,07	0,366	0,361	0,951	1,000
VJUG	141,58	81,65	167,95	76,51	125,04	49,97	150,26	73,35	0,377	0,395	0,169	0,091
VJRG	160,00	77,87	176,98	79,78	144,57	72,38	157,24	81,21	0,461	0,320	0,228	0,480

Signifikantný bilaterálny rozdiel môžeme pozorovať iba pri jednom parametre (výška jadro – stredová interfalangálna ryha), a to u oboch biologických pohlaví.

V štúdií Králik et al. (2015) zistili signifikantné rozdiely vo veľkosti ulnárných a radiálnych kľúčiek pochádzajúcich z ukazovákov, pričom radiálne kľúčky boli vo všeobecnosti väčšie ako ulnárne kľúčky. Najväčšie rozdiely vo veľkosti medzi radiálnou a ulnárnou kľúčkou boli zistené: vo vzdialenosti medzi jadrom a koncom distálnej línie, medzi jadrom a koncom proximálnej línie, v šikmom priečnom priemere kľúčky, a vo vzdialenosti medzi koncovými bodmi proximálnej a distálnej línie [3]. Na základe našich meraní očakávame rozdielne výsledky v porovnaní s touto štúdiou.

V štúdií Cummins a Midlo (1961) zistili rozdiely v počte línií medzi jadrom a trirádiom (RC). Podľa ich výsledkov majú radiálne kľúčky v priemere nižší počet línií a preto tvrdia, že by mali byť menšie [8].

Počet línií (RC) však nemusí byť vhodným meradlom absolútnej veľkosti vzoru pretože línie v rôznych kľúčkách sa môžu líšiť svojou šírkou/hrúbkou. Okrem toho, počet papilárnych línií opisuje iba časť vzoru medzi jadrom a trirádiom, na rozdiel od iných parametrov, ktoré

opisujú veľkosť celého vzoru (dĺžka spojnice medzi jadrom a trirádiom, vzdialenosť jadro – ulnárny gradient vo výške jadra, vzdialenosť jadro – radiálny gradient vo výške jadra).

Hoci naše výsledky nepreukázali štatisticky signifikantné rozdiely pri všetkých parametroch, odporúčame pokračovať vo výskume na väčšej hodnotenej vzorke.

Záver

Výsledky tejto štúdie nepotvrdili takmer žiadne štatisticky významné výsledky u konkordantných prstov nesúcich identický dermatoglyfický útvar, s výnimkou parametra VJSIR. V prípade radiálnych kľúčiek sa tento parameter odlišoval vzhľadom na lateralitu a v prípade ulnárnych kľúčiek boli hodnoty tohto parametra signifikantne odlišné medzi mužmi a ženami. Jedným z vysvetlení je, že výsledky mohli byť skreslené kvôli malému počtu vyhodnotených odtlačkov distálnych článkov prstov nesúcich hodnotený dermatoglyfický útvar. Vzhľadom na nedostatok štúdií týkajúcich sa bilaterálnych a intersexuálnych rozdielov ulnárnych a radiálnych kľúčiek z odtlačkov prstov, je nutné získané dáta overiť v ďalších štúdiách a na väčšej vzorke pred možným využitím v praxi.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Kazemi M., Fayyazi-Bordbar M. R., Mahdavi-Shahri N. (2017) Iran. J. Med. Sci. 42(4), p. 392
- [2] Bhat G. M., Mukhdoomi M. A., Shah B. A., et. al. (2014) Int. J. Res. Med. Sci. 2(1), p. 31
- [3] Králik M., Kováčová V., Hupková A., et al. (2015) Austin J. Forensic Sci. Criminol. 2(1), p. 1
- [4] Yoon S., Feng J., Jain A. K. (2012) IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence 34(3), p. 451
- [5] Kücken M. (2007) Forensic Sci. Int. 171(2-3), p. 85
- [6] Subhashree S. (2017) Int. J. of Forens. Sci. 2(1), p. 1
- [7] Singh I., Chattopadhyay P. K., Garg R. K. (2004) Forensic Sci. Int. 152(2-3), p. 205
- [8] Cummins H., Midlo C. (1961) Finger prints, palms and soles. An introduction to dermatoglyphics. Dover publications, New York, p. 77

Výskyt dermatoglyfických útvarov v oblasti mediálnych a proximálnych článkoch II. – V. prsta u slovenských detí v predškolskom veku

Diana Samborská¹, Martin Mokošák², Miriam Kirchmayerová², Lenka Vandáková², Filip Babiak³, Eva Neščáková¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra antropológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; samborska1@uniba.sk

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra telesnej výchovy, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Malá Hora 4, 036 01 Martin

Abstract

Occurrence of dermatoglyphic patterns in the medial and proximal phalanges of the 2nd to 5th fingers in Slovak preschool children

In dactyloscopy we encounter different levels of identification of dermatoglyphic characters. Most frequently, dermatoglyphic patterns are used on the distal phalanges, but only a few authors study dermatoglyphic formations on the medial and proximal phalanges. The collected material consisted of the fingerprints of 103 (52 girls and 51 boys) Slovak preschool children aged between 3.00 to 5.99. We found that there is a greater variability in the occurrence of dermatoglyphic formations on the medial phalanges than on the proximal phalanges. Statistically significant bilateral differences were found on each finger on the medial phalanges and on 2nd and 4th finger on the proximal phalanges. We also observed intersexual differences on both hands. On the right hand there was a statistically significant difference only on the 5th finger of the medial phalanges. On the left hand, there were statistically significant differences on the medial phalanges of the 4th finger and on the proximal phalanges of the third finger.

Keywords: dermatoglyphics; fingerprints; medial phalanges; proximal phalanges

Úvod a formulácia cieľa

Dermatoglyfické vzory, počty papilárnych línií na rukách a nohách sa natrvalo tvoria do druhého trimestra tehotenstva. Považujú sa za trvalé dôkazy prenatálneho obdobia. Vysoká frekvencia dermatoglyfických anomálií alebo vysoká miera dermatoglyfickej asymetrie je znakom vývojovej nestability (prenatálnych porúch) pred 24. týždňom tehotenstva [1].

Vzorom, ktoré sa nachádzajú na mediálnych a proximálnych článkoch prstov rúk sa venuje stále málo pozornosti oproti vzorom vyskytujúcim sa na distálnych článkoch prstov. A to aj napriek tomu, že tvoria spojovací element medzi distálnymi článkami a dlaňami. Na I. prste (palci) je malá variabilita vo výskyte útvarov, preto sa odporúča ho pri vyhodnocovaní dermatoglyfických útvarov vynechať a využívať len II. – V. prst [2].

V oblasti mediálnych a proximálnych článkoch neboli pozorované rovnaké ani podobné vzory ako sa vyskytujú na distálnych článkoch. Klasifikácia útvarov na mediálnych a proximálnych článkoch podľa Ploetz-Radmanna [3] sa delí na dve skupiny, a to na základné

typy, medzi ktoré patria priame línie, hákovite zakrivené línie, vlnovité línie, oblúkovité línie a zložité typy, kde patria uhlové línie, oblúk-uhol, dvojité uhol, dvojité oblúk-uhol, dvojité oblúk, uzavreté línie, perovité línie, zriedkavé línie. V útvaroch sa sleduje aj smerovanie papilárnych línií a v dôsledku toho vzniklo až 29 podtypov jednotlivých dermatoglyfických útvarov v oblasti mediálnych a proximálnych článkoch na prstoch rúk.

Rovnako ako vzory na distálnych článkoch aj na mediálnych a proximálnych článkoch sa tieto dermatoglyfické útvary vyznačujú jedinečnosťou a stálosťou, to znamená, že sa od narodenia nemenia. Taktiež na odtlačkoch môžeme pozorovať aj určité charakteristiky ako sú minúcie alebo potné póry [4].

Cieľom tejto práce bolo určenie typu a frekvencie výskytu dermatoglyfických útvarov v oblasti mediálnych a proximálnych článkoch na II. – V. prste u zdravých detí predškolského veku a stanoviť referenčný súbor jedincov z hľadiska výskytu jednotlivých útvarov. Tento súbor by mohol mať uplatnenie v klinickej praxi pri vrodených syndrómoch (napr. Downov, Edwardsov, Patauov) alebo pri psychiatrických ochoreniach (porucha autistického spektra, schizofrénia). Taktiež sme sa zaoberali aj intersexuálnymi a bilaterálnymi rozdielmi vo výskyte dermatoglyfických útvarov.

Materiál a metódy

Sledovaný súbor pozostával z odobraných odtlačkov dlaní a prstov detí v predškolskom veku z Bratislavského kraja. Odtlačky boli deťom odobraté v spolupráci s Katedrou antropológie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave. Súbor pozostával zo 103 detí, pričom bolo 52 dievčat a 51 chlapcov. Vek detí bol od 3,00 do 5,99. Pred odoberaním odtlačkov dlaní a prstov zákonní zástupcovia detí museli vyplniť a podpísať informovaný súhlas. Deti, ktorým boli odobrané odtlačky museli mať zdravotný stav bez ochorení a poškodení, ktoré by mohli ovplyvniť kvalitu odtlačkov.

Na odoberanie odtlačkov sme využili daktyloskopický valček a daktyloskopickú čerň. Odtlačky boli odobrané valivou metódou, kedy vzniká odtlačok rolovaním z jednej strany na druhú pri prstoch a pri dlaniach rolovaním od končekov prstov k zápästiu.

Vyhodnocovanie dermatoglyfických útvarov na mediálnych a proximálnych článkoch prebiehalo podľa klasifikácie Ploetz-Radmann [3] a Pospíšila [5], ktorí sledovali priebeh papilárnych línií v týchto oblastiach.

Dermatoglyfické útvary na mediálnych a proximálnych článkoch boli vyhodnocované pomocou digitálnej lupy pri päťnásobnom zväčšení. Všetky údaje boli zapísané v programe Microsoft Office Excel 2010 a ďalej štatisticky spracované v programe IBM SPSS Statistics

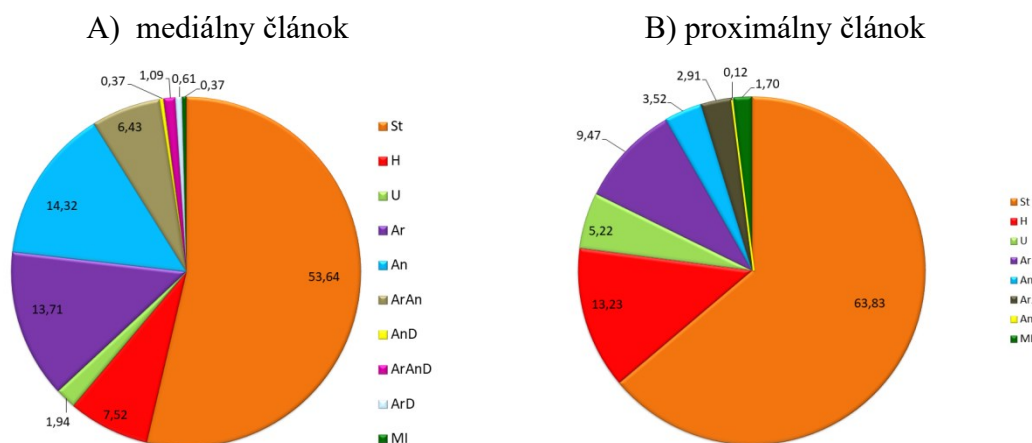
24, kde sme využili Fisherov exaktný test. Zvolili sme testovaciu hladinu významnosti $\alpha = 0,05$.

Výsledky a diskusia

Výskyt dermatoglyfických útvarov v súbore

Na mediálnych článkoch, v nami sledovanom súbore 103 jedincov, boli najviac zastúpené jednoduché vzory, konkrétne priame línie, hákovite zakrivené línie a oblúkovité línie, ktoré tvorili až 74,87 % zo všetkých dermatoglyfických útvarov. Na mediálnych článkoch boli výrazne zastúpené aj dva zložitejšie dermatoglyfické útvary, a to uhlové línie 14,32 % a oblúk-uhol 6,43 %. Na proximálnych článkoch prevládali všetky štyri jednoduché dermatoglyfické útvary, a to priame línie, hákovite zakrivené línie, vlnovité línie a oblúkovité línie, ktoré tvorili až 91,75 % zo všetkých útvarov (obr. 1.).

Podľa štúdie od Ponsa [6] dermatoglyfické útvary na mediálnych článkoch vykazujú väčšiu variabilitu vo výskyte rôznych útvarov. Na proximálnych článkoch zistil, že sú vo väčšej miere zastúpené základné dermatoglyfické útvary. V našej štúdii bol zistený rovnaký trend vo výskyte dermatoglyfických útvarov.



Obr. 1. Zastúpenie jednotlivých dermatoglyfických útvarov bez ohľadu na pohlavie a lateralitu (N = 103)
A) na mediálnych článkoch B) na proximálnych článkoch

Legenda: St – priame línie, H – hákovite zakrivené línie, U – vlnovité línie, Ar – oblúkovité línie, An – uhlové línie, ArAn – oblúk-uhol, AnD – dvojitý uhol, ArAnD – dvojitý oblúk-uhol, ArD – dvojitý oblúk, MI – uzavreté línie

Bilaterálne rozdiely

Výskyt a frekvencia dermatoglyfických útvarov na mediálnych článkoch II. – V. prsta v našom súbore bez ohľadu na pohlavie sú uvedené v tabuľke 1. Na mediálnych článkoch sme zistili štatisticky významné rozdiely ($p = < 0,05$) na každom prste. Na II. prste sme zistili

štatisticky významný rozdiel pri útvare oblúkovité línie ($p = 0,017$) a pri útvare oblúk-uhol ($p = 0,033$). Na III. prste sme zistili štatisticky významné rozdiely pri útvaroch: hákovite zakrivené línie ($p = 0,009$), oblúkovité línie ($p = 0,035$) a oblúk-uhol ($p = 0,019$). Na IV. prste sme signifikantné rozdiely zistili pri útvare oblúk-uhol ($p = 0,032$) a na V. prste pri útvare priame línie ($p = 0,007$). Pri ostatných útvaroch sme nezistili štatisticky významné rozdiely ($p > 0,05$).

Tab. 1. Výskyt a frekvencia dermatoglyfických útvarov podľa laterality v celom súbore (N = 103) na mediálnom článku Legenda: N – počet jedincov, f – frekvencia výskytu, „/“ – chýbanie daného útvaru, vyznačenie žltou farbou – štatisticky významné rozdiely, St – priame línie, H – hákovite zakrivené línie, U – vlnovité línie, Ar – oblúkovité línie, An – uhlové línie, ArAn – oblúk-uhol, AnD – dvojité uhlo, ArAnD – dvojité oblúk-uhol, ArD – dvojité oblúk, MI – uzavreté línie

Ú T V A R	Mediálny článok															
	II.				III.				IV.				V.			
	pravá		ľavá		pravá		ľavá		pravá		ľavá		pravá		ľavá	
	N	f %	N	f %	N	f %	N	f %	N	f %	N	f %	N	f %	N	f %
St	78	75,73	66	64,08	28	27,18	32	31,08	43	47,76	43	41,76	67	65,05	85	82,52
H	5	4,85	2	1,94	19	18,45	6	5,82	8	7,76	17	16,50	5	4,85	/	/
U	/	/	2	1,94	4	3,88	3	2,91	2	1,94	4	3,88	1	0,97	/	/
Ar	3	2,91	13	12,63	25	24,28	40	38,84	18	17,46	14	13,59	/	/	/	/
An	15	14,57	9	8,73	16	15,49	5	4,85	14	13,60	17	16,50	26	25,25	16	15,54
ArAn	2	1,94	10	9,70	7	6,82	9	8,73	15	14,57	5	4,85	3	2,91	2	1,94
AnD	/	/	/	/	/	/	2	1,94	/	/	/	/	1	0,97	/	/
ArAnD	/	/	/	/	2	1,94	3	2,91	1	0,97	3	2,91	/	/	/	/
ArD	/	/	/	/	/	/	3	2,91	2	1,94	/	/	/	/	/	/
MI	/	/	1	0,97	2	1,94	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

V tabuľke 2 sú uvedené početnosti a frekvencie výskytu dermatoglyfických útvarov na proximálnych článkoch II. – V. prsta v našom súbore bez ohľadu na pohlavie. Na proximálnych článkoch sme zistili štatisticky významné rozdiely na dvoch prstoch. Na II. prste sme zistili štatisticky významné bilaterálne rozdiely pri útvare priame línie ($p < 0,001$) a aj pri útvare uhlové línie ($p = 0,001$). Na IV. prste sme štatisticky významný rozdiel zistili len pri dermatoglyfickom útvare priame línie ($p = 0,007$). Na ostatných prstoch na proximálnych článkoch sme nezistili signifikantné rozdiely, nakoľko $p > 0,05$.

Nakoľko žiadne doterajšie štúdie sa nevenovali bilaterálnym rozdielom výskytu dermatoglyfických útvarov na mediálnych a proximálnych článkoch u detí ani u dospelaj populácie, naše zistenia sme nemali s čím porovnať, a preto by bolo vhodné vykonať ďalšie štúdie, ktoré by sa zaoberali aj touto problematikou.

Tab. 2. Výskyt a frekvencia dermatoglyfických útvarov podľa lateralít v celom súbore (N = 103) na proximálnom článku Legenda: N – počet jedincov, , f – frekvencia výskytu, „/“ – chýbanie daného útvaru, vyznačenie žltou farbou – štatisticky významné rozdiely, St – priame línie, H – hákovite zakrivené línie, U – vlnovité línie, Ar – oblúkovité línie, An – uhlové línie, ArAn – oblúk-uhol, AnD – dvojité uhol, ArAnD – dvojité oblúk-uhol, ArD – dvojité oblúk, MI – uzavreté línie

Ú T V A R	Proximálny článok															
	II.				III.				IV.				V.			
	pravá		ľavá		pravá		ľavá		pravá		ľavá		pravá		ľavá	
	N	f %	N	f %	N	f %	N	f %	N	f %	N	f %	N	f %	N	f %
St	84	81,55	56	54,36	34	33,01	31	30,09	49	47,57	69	67,00	10 1	98,06	10 3	100,00
H	13	12,63	22	21,35	24	23,28	20	19,41	13	12,63	14	13,59	2	1,94	/	/
U	/	/	1	0,97	10	9,71	8	7,76	15	14,57	9	8,73	/	/	/	/
Ar	4	3,88	3	2,91	19	18,45	26	25,24	17	16,50	9	8,73	/	/	/	/
An	1	0,97	14	13,64	6	5,82	4	3,88	3	2,91	1	0,97	/	/	/	/
ArAn	1	0,97	5	4,85	7	6,82	9	8,73	2	1,94	/	/	/	/	/	/
AnD	/	/	/	/	1	0,97	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
MI	/	/	2	1,94	2	1,94	5	4,85	4	3,88	1	0,97	/	/	/	/

Intersexuálne rozdiely

V tabuľke 3 sú znázornené početnosti a frekvencie výskytu na článkoch a prstoch, na ktorých sme zistili štatisticky významné rozdiely v našom súbore. Pri vzájomnom porovnávaní sme na pravej ruke zistili štatisticky významný rozdiel, a to na mediálnom článku V. prsta pri útvare priame línie ($p = 0,040$). Na ľavej ruke sme zistili signifikantné rozdiely na mediálnom článku IV. prsta pri útvare priame línie ($p = 0,016$) a na proximálnom článku III. prsta pri útvare uzavreté línie ($p = 0,027$). Na ostatných prstoch na mediálnych a proximálnych článkoch neboli zistené signifikantné intersexuálne rozdiely ($p > 0,05$).

Tab. 3. Výskyt a frekvencia dermatoglyfických útvarov, na ktorých boli signifikantné rozdiely v celom súbore (N = 103) vzhľadom na lateralitu a pohlavie Legenda: N – počet jedincov, , f – frekvencia výskytu, „/“ – chýbanie daného útvaru, vyznačenie žltou farbou – štatisticky významné rozdiely, St – priame línie, H – hákovite zakrivené línie, U – vlnovité línie, Ar – oblúkovité línie, An – uhlové línie, ArAn – oblúk-uhol, AnD – dvojité uhol, ArAnD – dvojité oblúk-uhol, MI – uzavreté línie

Ú T V A R	PRAVÁ RUKA				ĽAVÁ RUKA							
	Mediálny článok				Mediálny článok				Proximálny článok			
	V. prst				IV. prst				III. prst			
	žena		muž		žena		muž		žena		muž	
	N	f	N	f	N	f	N	f	N	f	N	f
St	39	75,00	28	54,91	28	53,86	15	29,42	18	34,61	13	25,49
H	2	3,85	3	5,88	5	9,61	12	23,52	12	23,08	8	15,69
U	/	/	1	1,96	2	3,85	2	3,92	4	7,69	4	7,84
Ar	/	/	/	/	5	9,61	9	17,65	12	23,08	14	27,46
An	9	17,30	17	33,33	8	15,38	9	17,65	2	3,85	2	3,92
ArAn	2	3,85	1	1,96	3	5,77	2	3,92	4	7,69	5	9,80
AnD	/	/	1	1,96	/	/	/	/	/	/	/	/
ArAnD	/	/	/	/	1	1,92	2	3,92	/	/	/	/
MI	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	5	9,80

Šefčáková [2] poukázala na intersexuálne rozdiely vo výskyte dermatoglyfických útvaroch u dospelých jedincov. Zistila, že ženy mali na pravej ruke na mediálnych a proximálnych článkoch častejšie hákovite zakrivené línie, uhlové línie a oblúk-uhol, u mužov zistila najvyšší výskyt priamych línií a dvojité uhlo. Na ľavej ruke na mediálnych a aj na proximálnych článkoch zistila u žien najvyšší výskyt priamych línií a u mužov vlnovitých línií. V našej štúdii sme zistili, zhodný trend výskytu len u žien na pravej ruke pri útvere oblúk-uhol a na ľavej ruke pri útvere priame línie. Pri mužoch sme nezistili ani na jednej ruke rovnaký trend výskytu.

Pons [6] vo svojej štúdii v súbore 200 dospelých Španielov nezistil významné intersexuálne rozdiely vo výskyte útvarov ani na pravej ani na ľavej ruke, čo sa v našej štúdii nepotvrdilo.

Záver

V našom súbore zdravých jedincov sme zistili, že v oblasti mediálnych a proximálnych článkoch prevládajú skôr základné útvary nad zložitejšími. Zistili sme, že na mediálnych a proximálnych článkoch II. – V. prsta sa nachádzajú aj bilaterálne aj intersexuálne rozdiely. Dermatoglyfické útvary na mediálnych a proximálnych článkoch by mohli byť taktiež použité ako nástroje pri diagnostike a zisťovaní prítomnosti chorobných stavov jedincov a využívané v klinickej medicíne. Odporúčame, aby sa v štúdií pokračovalo na väčšom súbore a v rôznych vekových kategóriách, nakoľko štúdií na analýzu dermatoglyfických útvarov na mediálnych a proximálnych článkoch je pomerne málo a ich súbor pozostával len z dospeléj populácie. Vhodné by bolo uskutočniť štúdiu aj na jedincoch s rôznymi zdravotnými anamnézami.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Shakibaei F., Asadollahi G. A., Tabibi A. (2011) J. Res. Med. Sci. 16(8), p. 1055
- [2] Šefčáková A. (1983) Anthropologie 21(2), p. 123
- [3] Ploetz-Radmann M. (1937) Z. Morph. Anthropol. 36(2), p. 281
- [4] Giuliano A. (2016) Lower phalange prints (Lower joints). In: Giuliano A. (ed.) Fingerprint identification handbook. Edizioni Minerva Medica S.p.A., Italy, p. 57
- [5] Pospíšil M. F. (1974) Základy dermatoglyfiky. Univerzita Komenského, Bratislava, p. 49
- [6] Pons T. (1985) Anthropol. Anz. 43(1), p. 69

Modifikácia regulačnej kaskády kontrolujúcej expresiu z maltázového promótoru

Timotej Šándor, Adriána Dusíková, Sabina Houdeková, Bronislava Martinková, Kristína Mižáková, Erik Mokroš, Lea Lukáčová, Berenika Tulipánová, Ján Krahulec

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
sandor25@uniba.sk

Abstract

Modification of a regulatory cascade controlling expression from the maltase promoter

C. utilis carries GRAS (*Generally Recognised as Safe*) status, which allows it to be used safely in the food industry as a flavouring or dietary supplement. Maltose metabolism in the yeast is provided by an inducible maltase promoter and *MAL* loci composed of genes for maltose permease, maltase and *MAL*-activator regulatory protein. In this work, we constructed plasmids carrying a maltase promoter controlling the transcription of *lacZ* as a reporter gene and integrated them into the yeast genome. We were unable to evaluate the effect of mutations in the primary promoter structure on β -galactosidase expression because we did not detect any β -galactosidase activity. This work also focused on increasing the *MAL*-activator gene dosage in the CuA strain to prove that it is a potential master or alternatively the only regulator of transcription from the maltase promoter. We were unable to prove it because our increase of the gene dosage by 1 – 2 copies is not enough for a relevant evaluation.

Keywords: *Candida utilis*; yeast; plasmid; maltase promoter; *MAL*-activator

Úvod a formulácia cieľa

Candida utilis predstavuje významnú kvasinku v biotechnologickom priemysle, ktorá je schopná produkcie širokej škály proteínov a predpokladá sa, že v blízkej budúcnosti bude môcť konkurovať *Saccharomyces cerevisiae* [1]. *C. utilis* nesie status GRAS (*Generally Recognised as Safe*), čo umožňuje jej bezpečné používanie aj v potravinárskom priemysle [2]. Možnosť využitia lacných živných médií, adaptácia na rôzne zdroje uhlíka vrátane maltózy, rafinózy či xylózy, schopnosť rastu v širokom spektre teplôt, odolnosť voči mierne kyslému pH či *Crabtree*-negatívny efekt predurčujú kvasinku *C. utilis* stať sa priemyselne relevantným mikroorganizmom [3]. Pre metabolizmus maltózy v *C. utilis* je nevyhnutná prítomnosť aspoň jedného z piatich *MAL*-lokusov (*MAL1-MAL4* a *MAL6*), z ktorých najlepšie preskúmaným je *MAL6* zložený z génov pre maltózo-permeázu (*MAL61*), maltázu (*MAL62*) a regulačný proteín nazývaný aj *MAL*-aktivátor (*MAL63*) [4]. Cieľom tejto práce bola konštrukcia plazmidov – pML9 s *wild-type* maltázovým promótorom a pML11 s mutovaným maltázovým promótorom vo väzbových miestach pre *Mig1* represorový proteín na minimalizáciu katabolickej represie, porovnanie expresie z týchto promótorov a vyhodnotenie vplyvu mutácií. Taktiež sme sa pomocou plazmidu pPA11 snažili o navýšenie počtu kópií génu *MAL63* v kvasinkovom kmeni

CuA, ako potenciálneho hlavného regulátora expresie z maltázového promótoru.

Materiál a metódy

Tab. 1. Použité bakteriálne a kvasinkové kmene.

Názov	Charakterizácia	Zdroj
<i>Escherichia coli DH5α</i>	F- ϕ 80 <i>lacZΔM15Δ lacZYA-argF U196 endA1 hsdR17(rk-mk+)</i> <i>recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 phoA</i>	Invitrogen, Carlsbad, CA
<i>Candida utilis</i> CuF	Δ agl Δ loxP	KMB
<i>Candida utilis</i> CuA	Δ agl Δ loxP, PPMA, MAL-aktivátor, TTPMA, PGLC, TTGLC, Δ Zeo ^r Δ loxP	KMB

Tab. 2. Použité plazmidy.

Názov	Charakterizácia	Zdroj
pML5	PGLC d3, <i>lacZ</i> , Zeo ^r , <i>HIS3+TT</i>	Táto práca
pML7	PGLC d3, <i>lacZ</i> , Zeo ^r , <i>HIS3+TT</i> , Mut 1+2	Táto práca
pML9	PGLC d3, <i>lacZ</i> , Zeo ^r , <i>HIS3+TT</i>	Táto práca
pML11	PGLC d3, <i>lacZ</i> , Zeo ^r , <i>HIS3+TT</i> , Mut 1+2	Táto práca
pPA11	PPMA, MAL-aktivátor, TTPMA, Zeo ^r , <i>loxP</i> , <i>HIS3+TT</i>	KMB

Tab. 3. Použité enzýmy.

Typ	Názov	Zdroj
DNA polymerázy	KAPA2G Fast ReadyMix with Dye	Kapa Biosystems, USA
	Q5 High-Fidelity DNA polymerase	New England BioLabs, Ipswich, MA
	HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	Solis BioDyne, Estonia
DNA ligázy	T4 DNA Ligase	New England BioLabs, Ipswich, MA
Restričné endonukleázy	<i>KasI</i>	New England BioLabs, Ipswich, MA
	<i>Sall-HF</i>	
	<i>Bsu36I</i>	
	<i>XmnI</i>	
Fosfatázy	Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP)	New England BioLabs, Ipswich, MA

Tab. 4. Parametre amplifikačného programu verifikačných PCR reakcií.

Krok	Počet cyklov	Teplota	Čas
Počiatočná denaturácia	1	95° C	5 minút
Denaturácia	35	95° C	30 sekúnd
Anelácia primerov	35	51° C	30 sekúnd
Polymerizácia	35	74° C	60 sekúnd
Finálna polymerizácia	1	74° C	10 minút

Extrakcia 244 bp fragmentu z agarózového gélu

PCR produkt *lacZ* génu (1031 bp), získaný pomocou primerov lacZ F + RTR lacZ, sme štiepli restriknými endonukleázami (RE) *Sall-HF* a *Bsu36I* a po prezrážaní etanolom

a rozpustení v 10 μl roztoku TE (Tris-HCl 50 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pH 8, EDTA 10 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) separovali v agarózovom géli v dvoch dráhach (1 μl a zvyšok). Fragment s veľkosťou 244 bp následne slúžil ako inzert v ligačnej reakcii. DNA sme izolovali z gélu pomocou kitu (*GeneJET PCR Purification Kit, ThermoFisher*).

Ligácia

Plazmidy pML5 a pML7, ktoré slúžili ako vektory, sme štiepli RE *Sall-HF* a *Bsu36I* a defosforylovali *rSAP*. Vzorky sme prečistili kitom (*GeneJET PCR Purification Kit, ThermoFisher*) a namiešali 50 μl ligačnú reakciu s molárnym pomerom vektora a inzertu 1:5. Reakcia prebiehala cez noc pri laboratórnej teplote. Následne sme ligačnú zmes prečistili kitom (*GeneJET PCR Purification Kit, ThermoFisher*) a elektropórovali *E. coli* (DH5 α) bunky, z ktorých sme plazmidovú DNA izolovali pomocou kitu (*NucleoSpin® Plasmid, MacheryNagel*).

Elektroporácia *C. utilis*

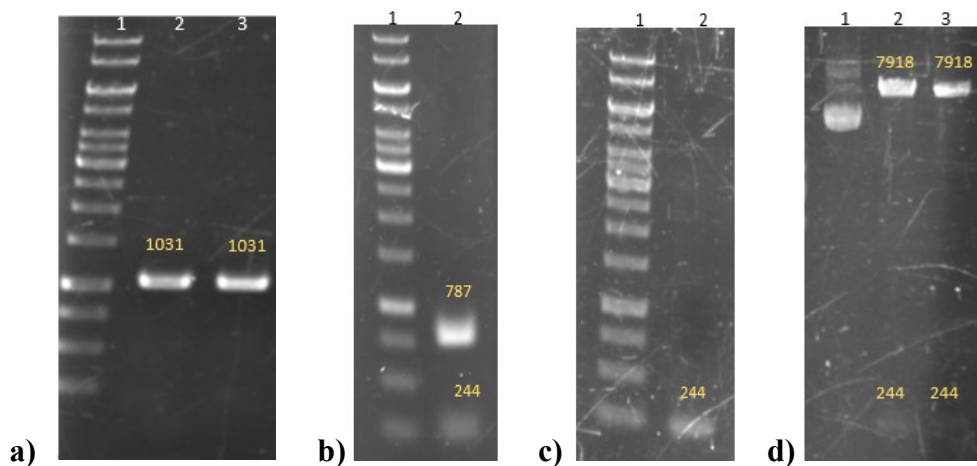
K elektrokompetentným bunkám CuA alebo CuF sme pridali 5 – 10 μg plazmidovej DNA a pomocou elektrického výboja elektroporátoru *GenePulser (BioRad)* bunky transformovali (125 μF , 600 Ω , 1,5 kV). K bunkám sme po elektroporácii pridali 500 μl 1 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ sterilného sorbitolu a inkubovali na trepačke (28° C, 160 RPM, 2 hodiny). Po kultivácii sme bunky premyli fyziologickým roztokom a vysiali na pripravené Petriho misky s YPD médiom so zeocínom (100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Izolácia chromozomálnej DNA z *C. utilis*

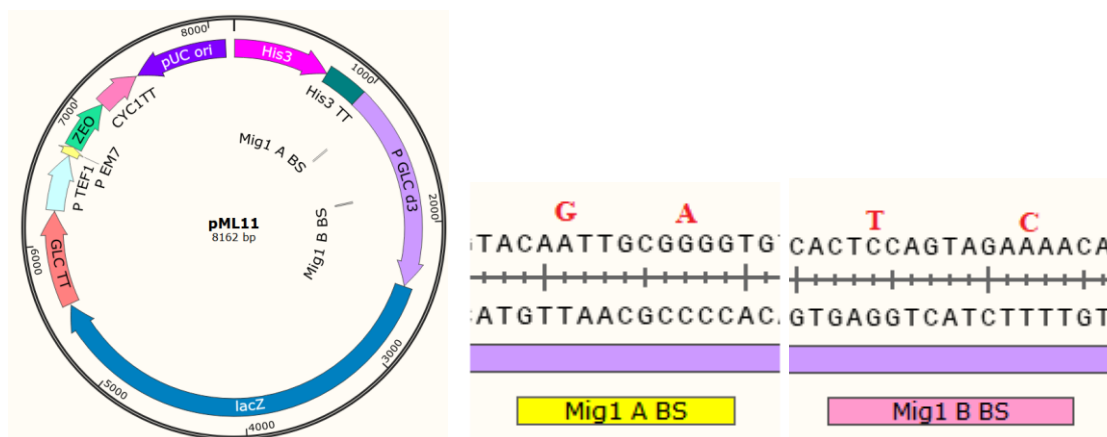
Adekvátne množstvo buniek sme rozsuspendovali v 300 μl SCED roztoku (sorbitol 1 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, citrát sodný 10 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pH 7,5, EDTA 10 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, DTT 10 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) s 2 μl RNázy A (10 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) a 2 μl zymolyázy (10 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) a inkubovali 30 minút pri 37 °C. Potom sme pridali 40 μl SDS roztoku (10 %), premiešali, inkubovali 30 minút pri rovnakých podmienkach, pridali 300 μl octanu draselného (5 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 8,9), dôkladne premiešali a scentrifugovali. Supernatant sme zrážali v 1 ml izopropanolu 30 minút pri -20 °C. Zmes sme opäť scentrifugovali a sediment dvakrát premyli 70 % etanolom. Po vysušení od etanolu sme sediment rozpustili v 200 μl Tris-HCl (10 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 8) predhriateho na 65° C.

Výsledky a diskusia

Podarilo sa nám získať konštrukty, ktoré niesli správnu sekvenciu štart-kodónu génu *lacZ* – plazmidy pML9 a pML11.

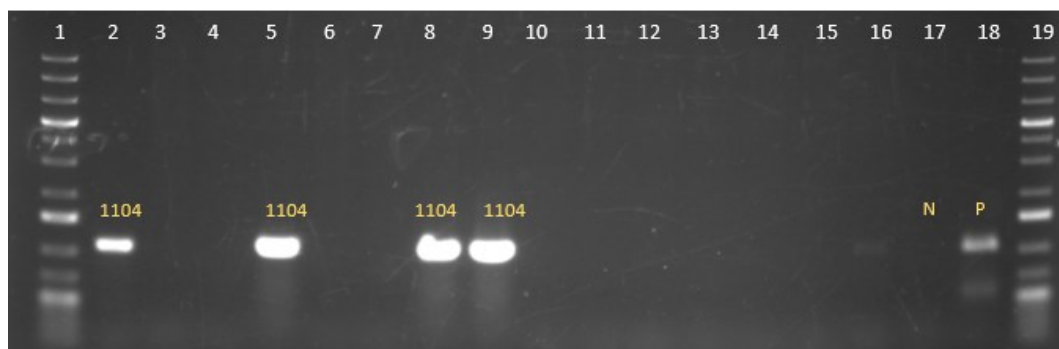


Obr. 1. a) PCR produkt fragmentu *lacZ*. 1. *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, 2., 3.. PCR produkty fragmentu *lacZ*. **b) Štiepenie PCR produktu.** 1. *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, 2. PCR produkt štiepený *Sall*-*HF* + *Bsu36I*. **c) Vyextrahovaný fragment na ligáciu.** 1. *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, 2. fragment 244 bp vyextrahovaný z gélu a prečistený. **d) Štiepenie pML5-8 *Sall*-*HF* + *Bsu36I* + *rSAP*.** 1. pML5, 2. pML5 štiepený *Sall*-*HF* + *Bsu36I*, 3. pML7 štiepený *Sall*-*HF* + *Bsu36I*.



Obr. 2. Mapa plazmidu pML11 nesúceho mutácie v *Mig1*-väzbových miestach. (mutácie vyznačené červenou).

Elektroporáciu plazmidov sme vykonali s predpokladom homologickej rekombinácie do *HIS3* génu kvasinky, ktorého homologickú sekvenciu nesú plazmidy. Integráciu sme overili pomocou PCR s dvomi párami primerov, avšak produkty sme získali iba v reakciách s jedným párom (OvIntL1 + His3P3), kedy vznikali produkty veľkosti 1104 bp.



Obr. 3. PCR overenie integrácie plazmidu pML9 do *HIS3* génu *C. utilis* kmeňa CuA. 1. *GeneRuler 1kb DNA Ladder*, 2.-16. pML9 CuA (OvIntL1+His3P3), 17. neg. kontrola, 18. poz. kontrola (His3P3+His3L3), 19. *GeneRuler 1kb DNA Ladder*.

Integrované klony sme vybrali pre expresiu β -galaktozidázy v minimálnom médiu s celobiózou, ako najlepším induktorom maltázového promótoru z predchádzajúcich skúseností. Cieľom bolo stanovenie aktivity a porovnanie mutovaného (pML11) a *wild-type* (pML9) promótoru. Očakávali sme, že vyššie hodnoty expresie nameriame v klonoch s integrovaným plazmidom pML11, nakoľko nesie mutácie v *Mig1*-väzbových miestach promótoru, na ktoré by sa nemal viazať proteín *Mig1* a represia by mala byť minimalizovaná. Po ukončení 48 h expresie sa nám však v kvasinkových kmeňoch CuA a CuF nepodarilo detegovať aktivitu β -galaktozidázy, kedy reakčná zmes enzýmu β -galaktozidázy so substrátom ONPG nezožltla v žiadnom experimente, pravdepodobne z dôvodu nesprávnej integrácie plazmidov do chromozómu kvasinky.

Simultánne s expresiou β -galaktozidázy sme vykonávali aj pokusy zamerané na navýšenie génovej dózy *MAL63* (*MAL*-aktivátorového génu) v kvasinkovom kmeni CuA, ktorý už má integrované 4 kópie tohto génu, s cieľom vyhodnotenia vplyvu *MAL*-aktivátorového regulačného proteínu na expresiu z maltázového promótoru v ďalších pokusoch. Používali sme plazmid pPA11 nesúci gén *MAL63* pod konštitutívnym PMA (*Plasma membrane ATPase 1*) promótorom, ktorým sme elektropórovali bunky CuA a pomocou RT-PCR sledovali počet integrovaných kópií vzhľadom na 4 už integrované. Zatiaľ sa nám podarilo integrovať 1 – 2 kópie génu navyše, avšak pre relevantné porovnanie a vyhodnotenie vplyvu koncentrácie *MAL*-aktivátorového regulačného proteínu na aktivitu maltázového promótoru v ďalšej práci, potrebujeme integrovať minimálne dvojnásobok, t.j. 4 kópie navyše. Transformácie kmeňa CuA plazmidom pPA11 budeme opakovať s vyšším množstvom plazmidovej DNA. Predpokladáme, že práve vyššia koncentrácia pDNA pri elektroporácii bude rozhodujúcim faktorom.

Tab. 5. Počet integrovaných kópií plazmidu pPA11 v kmeni CuA.

Klon	Relatívny počet	Absolútny vzhľadom na MAL
pPA11 CuA kl. 1	1,13	4,52
pPA11 CuA kl. 2	1,28	5,12
pPA11 CuA kl. 3	1,37	5,48
pPA11 CuA kl. 4	1,22	4,88

Záver

Podarilo sa nám skonštruovať plazmidy pML9 a pML11, integrovať ich do chromozómu *C. utilis*, avšak po expresii β -galaktozidázy sme nedokázali detegovať jej aktivitu, čo bolo pravdepodobne spôsobené nesprávnou integráciou plazmidov do oblasti *HIS3* génu homologickou rekombináciou. V ďalšej práci sa pokúsime použité metódy optimalizovať a experiment zopakujeme.

Úspešne sme integrovali 1 – 2 kópie génu *MAL63* do chromozómu *C. utilis* kmeňa CuA a navýšili tak počet už integrovaných 4 kópií na 5 – 6. Pre relevantné vyhodnotenie vplyvu koncentrácie produktu tohto génu – *MAL*-aktivátorového proteínu na aktivitu maltázového promótoru však potrebujeme počet integrovaných kópií navýšiť minimálne na 8, o čo sa pokúsime v ďalšej práci.

PodĎakovanie

Táto práca bola pripravená vďaka projektu APVV-21-0076.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Martínez E., Santos J., Araujo G., et al. (2018) Production of Single Cell Protein (SCP) from Vinasse. In: Kumar S., Dheeran P., Taherzadeh M., et al. (ed.) Fungal Biorefineries. Springer, Berlin/Heidelberg, Germany, p. 215
- [2] Buerth C., Heilmann C.J., Klis F.M., et al. (2011) Microbiology 157(9), p. 2493
- [3] Riley R., Haridas S., Wolfe K.H., et al. (2016) Proc Natl Acad Sci USA 113(35), p. 9882
- [4] Needleman R.B., Kaback D.B., Dubin R.A., et al. (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81(9), p. 2811

Produkcia neuropeptidu ITP z *D. melanogaster* v expresnom systéme *E. coli*

Alexandra Ščasná¹, Gabriel Zorkócy², Zdenko Levarski^{1,2}, Stanislav Stuchlík^{1,2}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;

scasna19@uniba.sk

²Univerzita Komenského v Bratislave, Vedecký park, Ilkovičova 8, 842 16 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Production of neuropeptid ITP from *Drosophila melanogaster* in expression system *E. coli*

Neuropeptid ITP (ion transport protein) is a protein of *Drosophila melanogaster*. The function of ITP protein is to regulate homeostasis and endocrine system which can be used in genetic studies. The pleiotropic effect of neuropeptides is also a big advantage. Their role is to execute various biological functions like neurotransmitters, hormones or neuromodulators. We are focused on devising pCBM66-DmITP with purpose of making the ITP protein in the most possible soluble form which is viable on the ground of using new fusion tag carbohydrate binding module 66.

Keywords: neuropeptides, ion transport protein, solubility, CBM66

Úvod a formulácia cieľa

Neuropeptidy predstavujú skupinu peptidov, o ktorých je známe, že môžu mať funkciu hormónov, pričom fungujú ako chemické signály endokrinného systému. Taktiež je dokázané, že nervový systém na tieto signály adekvátne reaguje. Neuropeptidy možno označiť za najviac rozmanitú skupinu signálnych molekúl v mozgu, ktoré sa podieľajú na správnom fungovaní viacerých významných fyziologických funkcií, akými sú napríklad pocit smädu či trávenie [1]. Neuropeptid ITP je iónovým transportným proteínom získaným z modelového organizmu *D. melanogaster*. Ide o hormón, ktorý sa podieľa na regulácii pitia. Gén pre ITP kóduje tri peptidy a to ITP a tzv. ITP podobné peptidy 1 a 2. Len ITP má na svojom C-konci amidačný signál, vďaka ktorému sa považuje za aktívny hormón [2].

Cieľom našej práce je produkcia rekombinantného neuropeptidu ITP z *Drosophila melanogaster*, získaného prípravou v expresnom systéme *E. coli* s použitím novej fúznej značky CBM66 (carbohydrate binding module family 66) [3]. Expresii daného proteínu predchádzalo skonštruovanie expresného plazmidu pCBM66-DmITP a taktiež vybratie najvhodnejšieho expresného kmeňa a podmienok expresie s dôrazom na získanie proteínu v solubilnom stave [4,5].

Materiály a metódy

Izolácia plazmidovej DNA – Plazmidová DNA bola získaná pomocou sady QIA Prep Miniprepkit 250 a QIA prep Spin Midiprepkit 250 od spoločnosti QIAGEN. Plazmid pCBM66 je získaný z kórejskej zbierky plazmidov (KCTC#2217, ATCC33234). Plazmid bol skonštruovaný za pomoci hlavného reťazca pET21b. His-tag značka bola pripojená k C-koncu a medzi značkou a proteínom bola vložená linkerova doména (G4S)₂ [3]

Transformácia buniek – Ku chemokompetentným bunkám, ktoré boli opracované CaCl₂ a MgCl₂ bola pridaná plazmidová DNA v objeme 1 µl. Následne boli bunky inkubované na ľade, nasledovalo opracovanie teplotným šokom pri teplote 42 stupňov po dobu 45 sekúnd. Nasleduje inkubácia na ľade 2 minúty. Ďalej sme pridali 450 µl LB média a trepali po dobu 1 hodiny pri 37°C. Na misky sme vyliali LB médium, s prídavkom 1% glukózy a ampicilínu. Po transformácii sme bunky kultivovali v termostate cez noc pri 37°C.

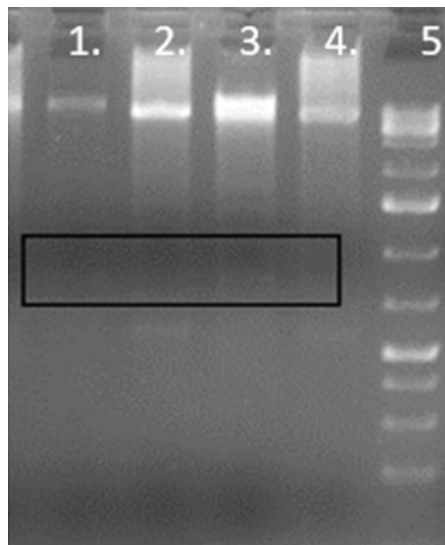
Restrikčné štiepenie – Použité boli restrikčné endonukleázy *Bam*HI, *Xho*I a *Nde*I. Objem reakcie bol 20µl.

Expresia produkčných kmeňov E. coli – Expresia prebehla v bunkách *E. coli* BL21(DE3), v ktorých sa nachádzal plazmid pCBM66. Na indukovanie expresie bolo potrebné pridať IPTG, po tom ako bunky dosiahli hodnotu OD 0,5. Z expresie boli odoberané vzorky v čase 0h-4h. Získané vzorky boli následne použité pri SDS-PAGE.

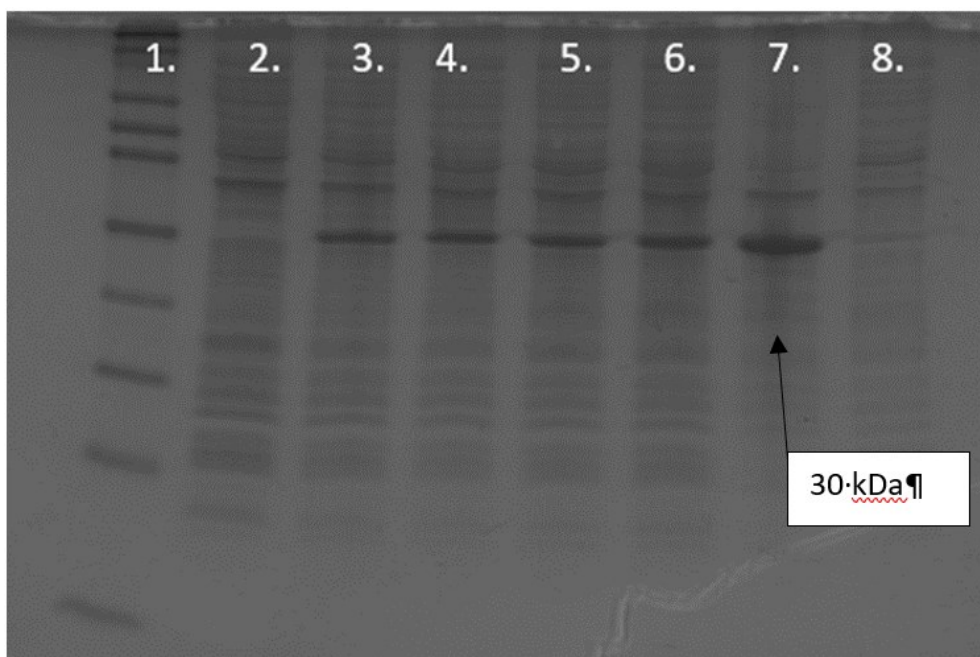
Ultrazvuková homogenizácia – K peletu získaného po expresii bol pridaný ekvilibračný roztok v objeme 20 ml. Bunky boli homogenizované sondou KE 76 na prístroji Bandelin sonopuls HD3100 homogeniser. Amplitúda bola nastavená na hodnotu 30%, celkový čas homogenizácie bol 8 minút, pričom jeden cyklus trval 1 minútu, z toho 15 sekúnd trvala dĺžka pulzu a 45 sekúnd dĺžka chladenia.

Výsledky a diskusia

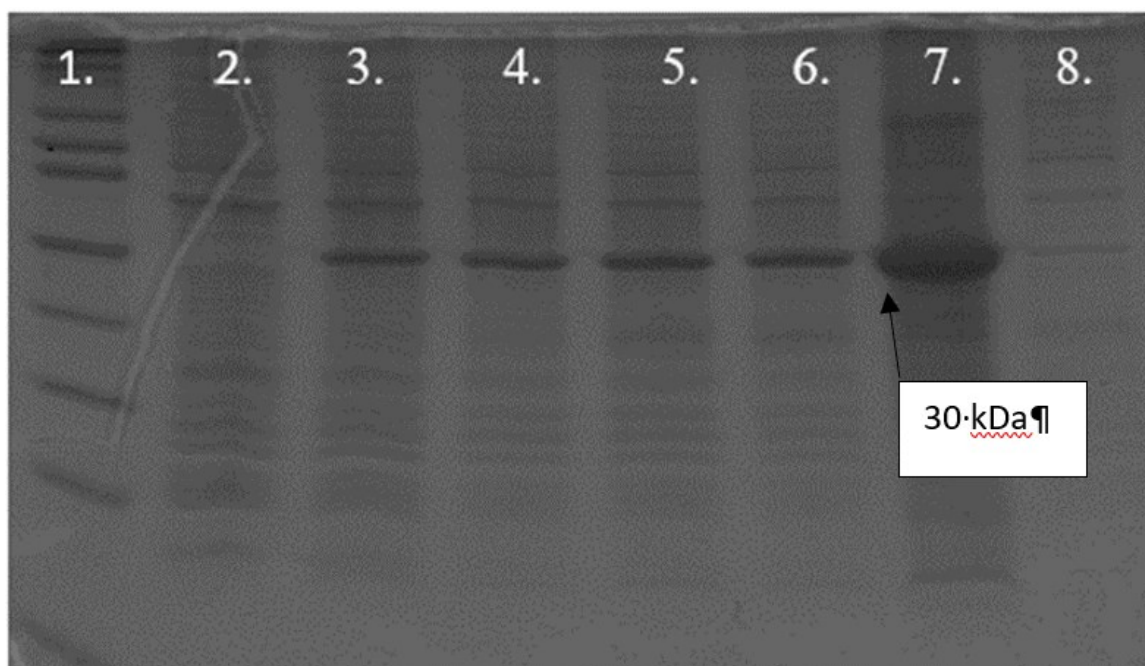
Pripravili sme konštrukt pCBM66-DmITP s novou fúznou značkou CBM66. Ako expresný systém bolo zvolené *E. coli*. Po vzniku konštraktu nasledovalo transformovanie chemokompetentných buniek. Ďalej sme vykonali selekciu kolónií a z nich sme izolovali DNA. Prítomnosť ITP v plazmide pCBM66 a celkového konštraktu sme dokázali pomocou restrikčného štiepenia enzýmami *Xho*I a *Nde*I, (obr.1) PCR, agarózovej elektroforézy a taktiež vykonaním štvorhodinovej expresie Erlenmeyerovej banke (obr.2,3). Pomocou týchto metód sme úspešne potvrdili prítomnosť ITP v plazmide pCBM66 a môžeme tak konštatovať, že sa nám podarilo získať žiadaný produkt.



Obr. 1. Agarózová elektroforéza štiepeného konštrukt pCBM66-DmITP. Dráha č. 1 a 3: konštrukt pCBM66-DmITP. V dráhach č. 2 a 4 konštrukt nevznikol. Dráha č.5: veľkostný štandard molekuly hmotnosti GeneRuler.



Obr.2. Expresia ITP v bunkách *E.coli* s plazmidom pCBM66
 SDS- PAGE elektroforéza po štvorhodinovej Erlenmeyerovej expresii. Zľava: 1.dráha – veľkostný štandard molekuly hmotnosti, 2. dráha – 0.hodina, 3.dráha – 1.hodina, 4.dráha – 2.hodina, 5. dráha – 3. hodina, 6.dráha – 4. hodina, 7. dráha pelet, 8.dráha supernatant.



Obr. 3. Expresia ITP v bunkách *E.coli* OV2, zv. 2. SDS-PAGE elektroforéza zo štvorhodinovej Erlennmeyerovej exprese. Zľava: 1.dráha veľkostný štandard molekulovej hmotnosti– Novex Sharp Pre-stained, 2.dráha - 0. hodina, 3.dráha – 1.hodina, 4.dráha – 2.hodina, 5. dráha – 3. hodina, 6.dráha – 4. hodina, 7. dráha pelet, 8.dráha supernatant.

Záver

Na základe výsledkov získaných pomocou elektroforézy možno tvrdiť, že sa nám úspešne podarilo pripraviť konštrukt pCBM66-DmITP, ktorý obsahuje novú fúznú značku CBM66. Avšak čo sa týka úpravy solubility, bude potrebné vykonať ďalšie experimenty.

PodĎakovanie

Príspevok je výsledkom realizácie projektov APVV-19-0196 a LISPER (ITMS2014:313011V446) na základe podpory operačného programu Integrovaná infraštruktúra financovaného z ERDF.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Burbach J. P. H. (2011). What Are Neuropeptides?. In: Merighi, A. (ed) Neuropeptides. Methods in Molecular Biology, Humana Totowa, NJ ,vol 789. Humana Press. p.1
- [2] Gálíková M., Klepsatel (2022) Genetics, 222:4, p.1
- [3] Ko H., Kang M., Kim M. J., et al. (2021) Microb. Cell Fact 20, p. 232
- [4] Rosano G. L., Ceccarelli E.A. (2014) Front. Microbiol. 5, p.172
- [5] Vihinen M. (2020) ADMET & DMPK, 8(4), p. 391

Towards the identification of plant calpain DEFECTIVE KERNEL DEK1's substrate: Generation of inducible DEK1 down-regulation lines for targeted proteomics studies

Alain Shumbusho¹, Boris Bokor^{1,2}, Martin Šafránek³, Viktor Demko^{1,3}

¹*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Plant Physiology, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak republic; shumbusho1@uniba.sk*

²*Comenius University in Bratislava, Science Park, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava, Slovak republic*

³*Slovak Academy of Science, Plant Science and Biodiversity Center, Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava, Slovak republic*

Abstract

Typical animal calpains are calcium-dependent modulatory cysteine proteases. In contrast, the plant calpain DEFECTIVE KERNEL 1 (DEK1) belongs to the class of atypical calpains, partly because its activity does not necessarily require calcium availability. DEK1 is a membrane-anchored cysteine protease with 23 transmembrane segments and an effector-cytosolic calpain moiety (CysPc-CBSW) domain. A linker connects the cytosolic and membrane-anchored regions. The linker undergoes intramolecular autocatalytic cleavage, resulting in the release of active CysPc-CBSW. Surprisingly, despite over two decades of research on plant calpain DEK1, its substrate remains unknown. As DEK1 post-translationally modifies its substrate, we aim to generate inducible *DEK1* gene expression lines in *Physcomitrium patens* for proteomic analyses and ultimately identify DEK1's in vivo substrate. First, using the GFP reporter line, we show that the induction of expression is achievable in our experimental setup. Finally, targeting DEK1's linker with artificial microRNA reduces *PpDEK1* transcripts to about half.

Keywords: *Plant calpain DEK1; Gene expression induction; artificial microRNA*

Introduction and objectives

Calpains are calcium-dependent modulatory proteases. Structurally, classical calpains consist of a short N-terminal anchoring helix, the calpain proteolytic core domain (CysPc), the calpain activity regulatory domain (CBSW), and a calcium-binding domain (PEF). The CysPc harbors the active site encompassing three amino acid residues: Cysteine, Histidine, and Asparagine (C, H, N). Biochemically inactive cysteine sufficiently puts an end to the entire protein activity. In the presence of calcium, conformation changes allow the formation of the active site cleft. Miss-regulation of calpain activity is embryo lethal in mice. In humans, abnormal calpain activity causes physiological disorders such as cardiotoxicity, skeletal muscle, and retinal degeneration [1].

In contrast, land plant genomes encode a single non-classical calpain protein, the DEFECTIVE KERNEL 1 (DEK1) [2 – 4]. DEK1 protein comprises an extended N-terminal transmembrane domain (MEM) with 19 – 23 membrane-spanning segments and a central loop [5]. The C-terminal harbors the calpain moiety domains (CysPc-CBSW) [2]. A linker segment

connects the C and N terminal domains (Fig. 1) [6]. The activation of DEK1 is calcium-independent [7] and requires a two-step intramolecular autolytic cleavage within the linker segment. The activated CysPc-CBSW harbors active site residues (C, H, N) [6, 8].

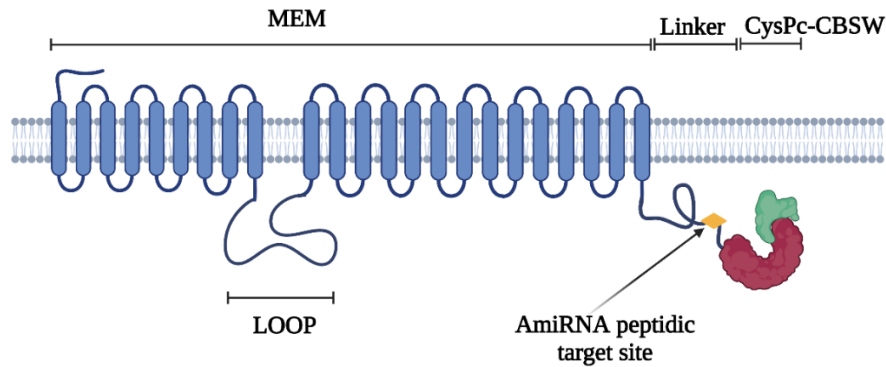


Fig. 1. Schematic representation of DEK1 protein.

DEK1's N-terminus harbors a lengthy transmembrane region (MEM, blue segments), interrupted by a cytosolic loop. The calpain moiety, CysPc (Red) and CBSW (green) is the effector part of the protein located at the C-terminus. A Linker segment connects the MEM and CysPc-CBSW. The mustard-colored diamond shape is the peptidic region targeted by artificial microRNA.

During embryogenesis, *DEK1* transcripts are detectable from the early globular stage in *Arabidopsis thaliana* [6, 8 – 11]. Conversely, *dek1* deletion mutants are embryo-lethal [10, 12]. In mature plants, DEK1 promotes the integrity of the sepal and leaf epidermis at the organ level [13, 14]. At the cellular level, DEK1 supports cell adhesion and cell wall integrity [15]. Furthermore, DEK1 promotes the orientation of the cell division plane [10, 12, 16]. In Bryophyte, *Physcomitrium patens*, DEK1 orients cell division planes and cell specification in a bud that gives rise to leafy shoots (gametophores). The *Ppdek1* deletion mutant produces wildtype-like protonemata filaments but fails to develop gametophores due to misoriented cell division patterns within the bud [6, 16]. Unfortunately, despite over two decades of research on DEK1, its substrate(s) are unknown.

The present study aims to identify DEK1 *in vivo* interactors and substrates. We combined the Beta-estradiol inducible gene expression [17] with an artificial micro-RNA mediated gene silencing strategies to control *PpDEK1* activity (Fig. 2).

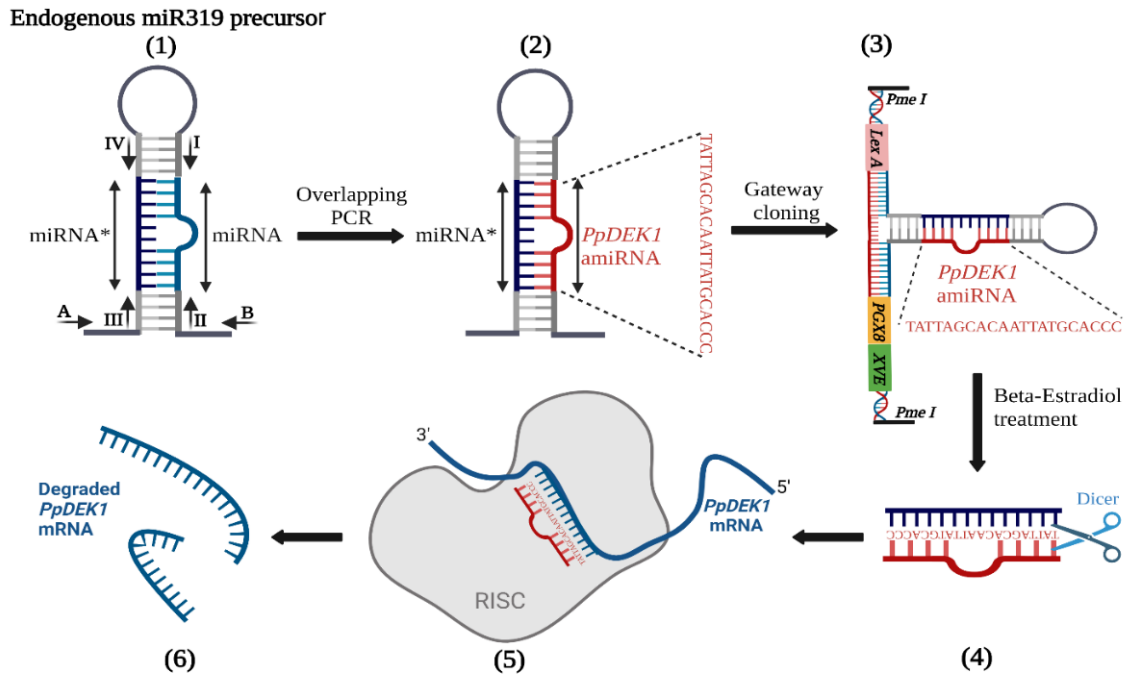


Fig. 2. Schematic representation of *DEK1* amiRNA generation and function.

First, an endogenous-foldable miRNA precursor (1) is used to engineer the *DEK1* amiRNA precursor by overlapping PCR (2). Second, the *DEK1* amiRNA precursor is integrated into the inducible gene expression plasmid via gateway cloning (3). Third, following the plant transformation and beta-estradiol treatment, a duplex of amiRNA*-*DEK1*amiRNA is released and cleaved by the DICER (4). Finally, the *DEK1* amiRNA integrates into the RNAi silencing complex (RISC) (5) to pair and signalize the degradation of *DEK1* mRNA (6) by the RISC. A, B, I, II, III, and IV are primers used in overlapping PCR.

Here we use the GFP reporter line to show that the induction of expression is achievable in our experimental setup. Finally, targeting the short peptidic linker segment of *PpDEK1* with artificial microRNA reduces *PpDEK1* transcripts to about half.

Material and methods

Plant material and growth conditions

The *P. patens* Gransden strain plant material was grown on sterile BCD solid media [18] under long-day photoperiod; 16 hours light/8 hours dark cycle with light intensity $70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ at 24°C . The BCD media was supplemented with either 5 mM diammonium tartrate (Sigma Aldrich) for tissue amplification or 20 mg/L hygromycin (Serva) to select transgenic lines. For gene expression induction, plants were grown on solid BCD media for one week and transferred to liquid media supplemented with 10 μM Beta estradiol (Sigma Aldrich) for three or seven days.

Molecular cloning and plant transformation

We acquired the PGX8 plasmid that induces gene expression activity in protonemata and gametophores [17]. The artificial microRNA targeting putative DEK1 activation site was designed using the Web MicroRNA online tool and engineered using pRS300 (Addgene) plasmid harboring the microRNA precursor, miR319. Gateway technology (Invitrogen) allowed us to integrate *AMIR-DEK1* and Turbo-GFP (Evrogen) into PGX8, thus generating *GX8-DEK1-AMIR* and *GX8-GFP* expression constructs, respectively. Finally, protoplast-mediated plant transformation was performed [18].

Molecular validation of *GX8-AmiR-dek1* lines

The *GX8-DEK1-AMIR* and *GX8-GFP* expression constructs are designed to integrate into the putative neutral inter-genic (PIG) locus by homologous recombination. Therefore, PCR was performed to check strains for the abrogation of the target locus and correct genomic insertions at 5' and 3' ends. In addition, the strains' ability to inducibly express GFP or down-regulate *PpDEK1* was assessed by fluorescence microscopy and quantitative PCR, respectively.

Microscopy

Following plant transformation and selection, the *GX8-DEK1-AMIR* and *GX8-GFP* strains were assessed for normal growth under the LEICA M165 FC stereomicroscope. To validate the gene induction system under our experimental setup, fluorescence microscopy was performed on LEICA DM5000 B Fluorescence microscopy. Images were acquired using LAS X software.

Data analysis and creation of figures

The Livak method was used to analyze the gene expression data, whereas STATGRAPHICS Centurion, Version 19.4.04 software, was used for statistical analyses. The figures (Fig. 1 and Fig. 2) were created using Biorender.com.

Results and discussion

Previous studies on DEK1 pointed to the identification of in-vivo interactors and substrate(s) as the most critical step toward understanding DEK1 molecular functions. Transcriptome analyses were undertaken using stable *dek1* deletion [5] and over-expression [8], but none was conclusive. As DEK1 post-translationally modifies its substrate, it is

reasonable to attempt substrate identification via proteomics approaches. Here we focus on generating *DEK1* inducible expression lines for targeted proteomics studies.

Inducing gene down-regulation reduces *PpDEK1* transcripts

We established controls to monitor and test the system in our experimental setup. To this end, we assessed GFP activity. Following beta-estradiol treatment, GFP fluorescence was observed at the base of young leaves (Fig. 3B). Conversely, no signal was detected in the non-treated plants (Fig. 3A). Furthermore, we assessed the reduction of *PpDEK1* activity after seven days of induction. Approximately two folds reduction in *PpDEK1* transcripts-accumulation was obtained (Fig. 3C – E). Comparable levels were obtained in *A. thaliana* and proved enough for investigating *DEK1* functions in the specification of epidermis [14] and pectin accumulation in the middle lamella [15].

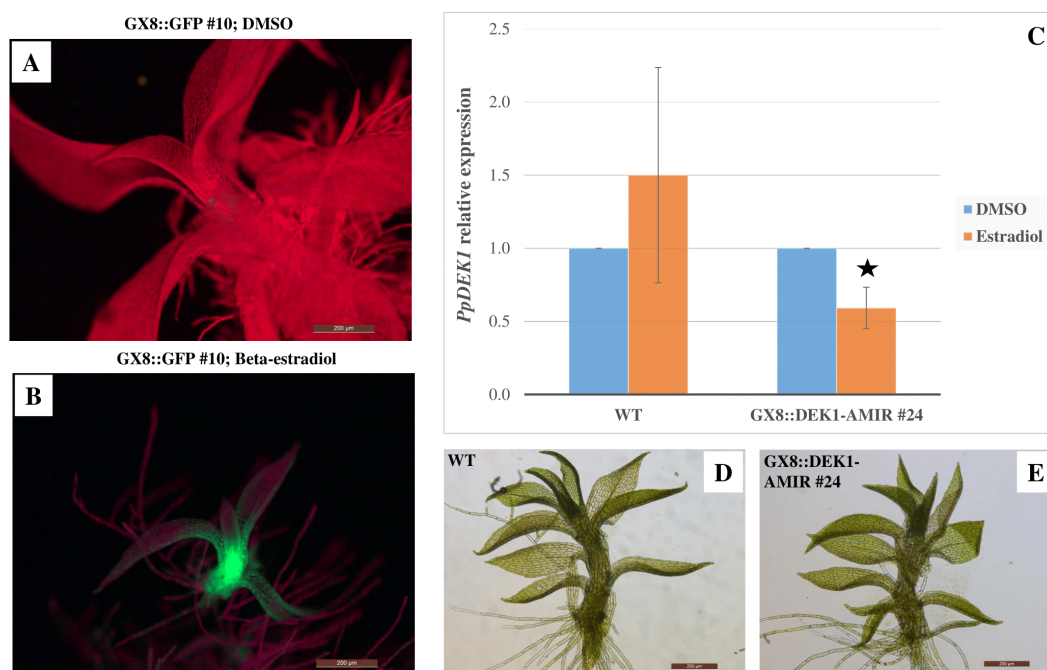


Fig. 3. Inducing and monitoring gene expression in-planta.

A and B: Induction of turbo GFP activity in control (A; DMSO) and treated (B; Beta-estradiol) gametophores. Gene expression analysis of generated inducible *PpDEK1* down-expressing line (C). Under non-inducing conditions, the phenotypic outlook of WT (D) reminisces *PpDEK1* down-expressing line (E). P value = 0.05 in C. Scale bars: 200 μm.

Conclusion

GFP fluorescence proves that the induction works in our experimental setup and plant material. Therefore, this will allow us to fine-tune the induction time and concentration. For a

better proteomic analysis, we initiated the generation of more inducible over- and down-expression lines. Having more strains offers the possibility of variable degrees of induction ability, thus smoothening the analysis of DEK1-associated proteome.

Acknowledgment

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency grants APVV-17-0570, APVV-21-0227, VEGA 1/0352/21, and the Comenius University grants UK/175/2023 and UK/141/2023. Also, we thank Prof. Mitsuyasu Hasebe for gifting us the PGX8 plasmid.

References

- [1] Spinozzi S., Albini S., Best H., et al. (2021) BBA 1869(5), p. 140616
- [2] Lid E. L., Gruis D., Jung R., et al. (2002) PNAS 99(8), p. 5460
- [3] Zhao S., Liang Z., Demko V., et al., (2012) BMC 12, p. 193
- [4] Liang Z., Demko V., Wilson R. C., et al. (2013) Plant J. 75(5), p. 742
- [5] Demko V., Perroud P. F., Johansen W., et al. (2014) Plant Physiol 166(2), p. 903
- [6] Johansen W., Ako A. E., Demko V., et al. (2016) Plant Physiol 172(2), p. 1089
- [7] Wang C., Barry J., Min Z., et al. (2003) J. Biol. Chem 278(36), p. 34467
- [8] Johnson K. L., Faulkner C., Jeffree C., et al. (2008) Plant Cell 20(10), p. 2619
- [9] Lid E. L., Olsen L., Nestestog R., et al. (2005) Planta 221(3), p. 339
- [10] Johnson K. L., Degnan K. A., Walker J. R., et al. (2005) Plant J. 44(1), p. 114
- [11] Liang Z., Brown R., Fletcher J., et al. (2015) Plant cell Physiol. 56(9), p. 1855
- [12] Becraft P. W., Li K., Dey N., et al. (2002) 129(22), p.5217
- [13] Roeder A., Cunha A., Ohno C., et al. (2012) Dev. 139(23), p. 4416
- [14] R. Galletti R., Johnson K. L., Scofield S., et al. (2015) Dev. 142(11), p. 1978
- [15] D. Amanda D., Doblin M. S., MacMillan C. P., et al. (2017) Plant direct. 1, p. 2017
- [16] Perroud P. F., Demko V., Johansen W., et al. (2014) New Phytol 203(3), p. 794
- [17] M. Kubo M., Imai A., Nishiyama T., et al. (2013) PLoS One 8(9), p. e77356
- [18] Cove D. J., Perroud P. F., Charron A. J., et al. (2009) Cold Spring Harb. Protoc 4(2), p.

Porovnanie metód ohraničenia hodnotených oblastí papilárneho terénu: metóda najvyššej kvality vs. metóda založená na dermatoglyfických útvaroch

Stella Sara Sirotová, Mária Chovancová, Petra Švábová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra antropológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; sirotoval4@uniba.sk

Abstract

Comparison of delimitation methods for evaluated areas of papillary terrain: Method of the highest quality vs. method based on dermatoglyphic patterns

The paper focused on the evaluation of minutiae that are level 2 dermatoglyphic markers. The aim of the study was to evaluate which of the two methods (method of the highest quality, method based on dermatoglyphic patterns) is more suitable for fingerprint analysis. The area studied was 1 x 1 cm. The rolled fingerprints of 50 men were evaluated, on which the variability of 13 types of minutiae was observed. The number of minutiae on the fingerprints evaluated by the method based on dermatoglyphic patterns was greater than on the fingerprints evaluated by the highest quality method. Significant differences between the two methods used were found in the number of five types of minutiae. The study confirmed that the method based on dermatoglyphic patterns is more suitable for fingerprint analysis due to the greater frequency of minutiae found.

Keywords: *minutiae; dermatoglyphics; fingerprints*

Úvod a formulácia cieľa

Identifikácia jedincov pomocou odtlačkov prstov je najrozšírenejšia a najpoužívanejšia metóda po celom svete. Odtlačky prstov sú charakterizované tromi úrovňami markerov. Identifikačné markery prvej úrovne opisujú vzory, ktoré sa nachádzajú na koži chiridia. Sú vytvorené striedavým prúdením papilárnych línií [1,2]. Identifikačné markery druhej úrovne sa nazývajú minúcie, sú to odchýlky v lokálnej štruktúre papilárnych línií. Tieto markery sú najpoužívannejšie pri identifikácii jedincov pomocou odtlačkov prstov, sú detegované a porovnávané so známym odtlačkom prstu. Do tretej skupiny identifikačných markerov patria atribúty papilárnej línie, ako potné póry a jazvy, ktoré dopĺňajú unikátnosť detailov druhej úrovne [1].

Existujú rôzne metódy hodnotenia papilárneho terénu, či už pri hodnotení minúcií alebo iných atribútov odtlačkov prstov. V štúdií Gutiérrez et al. (2007) bol hodnotený papilárny terén v oblasti vyznačenej kruhom s priemerom 36 papilárnych línií, ktorého stred sa nachádzal v jadre vzoru. Hodnotená bola oblasť v kruhu aj mimo [2]. Štúdia Gungadin (2007) skúmala počet papilárnych línií v oblasti 5 x 5 mm, ktorá bola umiestnená na radiálnej strane odtlačku prsta [3]. Táto metóda bola taktiež použitá v štúdií Preethi et al. (2012), v ktorej boli skúmané potné póry [4]. Keďže neexistuje jednotná metóda hodnotenia papilárneho terénu, porovnanie

dát zo štúdií využívajúcich rôzne metódy je nepresné.

Cieľom toho výskumu bolo analyzovať vybraný súbor odtlačkov distálnych článkov prstov mužov dvoma metódami ohraničenia – metódou najvyššej kvality a metódou založenou na dermatoglyfických útvaroch. Následné porovnanie týchto dvoch metód a určenie vhodnejšej metódy na antropologickú analýzu odtlačkov prstov.

Materiál a metódy

Databáza hodnotených odtlačkov prstov bola poskytnutá Katedrou antropológie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave. Probandi podpísali informovaný súhlas na odobratie odtlačkov prstov a v prípade nepľnoletých jedincov bol podpísaný rodičom.

Hodnotený súbor bol vybraný na základe kvality vyhotovených odtlačkov prstov z poskytnutej databázy. Vyberané boli odtlačky prstov, na ktorých boli papilárne línie a jednotlivé minúcie dobre viditeľné, odtlačky prstov neboli rozmazané alebo inak poškodené. Vyhodnocované boli valivé odtlačky distálnych článkov prstov 50 jedincov mužského pohlavia. Vek jedincov sa pohyboval v rozmedzí 12 – 55 rokov, priemerný vek bol 25,5 roka.

Vyhodnocovaná oblasť bola v tvare štvorca o rozmere 1 x 1 cm. Na vyznačenie tejto oblasti bol použitý program Adobe Photoshop 2022 (Obr. 1). Na ohraničenie hodnotenej oblasti boli použité dve metódy – metóda najvyššej kvality a metóda založená na dermatoglyfických útvaroch. V prvej metóde bola oblasť vyznačená v mieste, v ktorom mal odtlačok prsta najvyššiu kvalitu. Druhá metóda bola založená na nájdení jadra vzoru na prste, ktorá bola zároveň aj stredom hodnotenej oblasti. Na určenie jadra vzoru bola použitá metodológia podľa Chovancovej et al. (2023, Tab. 1) [6,7].

Tab. 1. Metodológia určovania jadra odtlačku prstu

Typ vzoru	Metodológia
Jednojadrové vzory (kľučka, vír, stredové jadro)	stred oblasti bol v mieste jadra vzoru
Dvojjadrové vzory (dvojkľučka, postranné jadro)	stred bol determinovaný numerickým priemerom počtu papilárnych línií na spojnici dvoch jadier
Bezjadrové vzory (oblúčik)	stred vzoru bol určený na vrchole 15-tej papilárnej línie vypočítanej od distálnej flekčnej ryhy
Stanový oblúčik	stred bol určený na vrchole papilárnej línie vychádzajúcej z trirádia distálnym smerom

Vyznačená oblasť na odtlačkoch prstov bola vyhodnotená v grafickom programe GIMP 2.10.30. Na odtlačkoch prstov boli jednotlivé minúcie vyhodnotené pomocou klasifikácie

Gutiérrez et al. (2007). Minúcie boli označené písmenami a – m podľa klasifikácie a zaznačené do tabuliek, ktoré boli použité na ďalšiu analýzu [2].



Obr. 1. Vyznačená oblasť metódou najvyššej kvality (modrá) a metódou založenou na dermatoglyfických útvaroch (červená) [6,7]

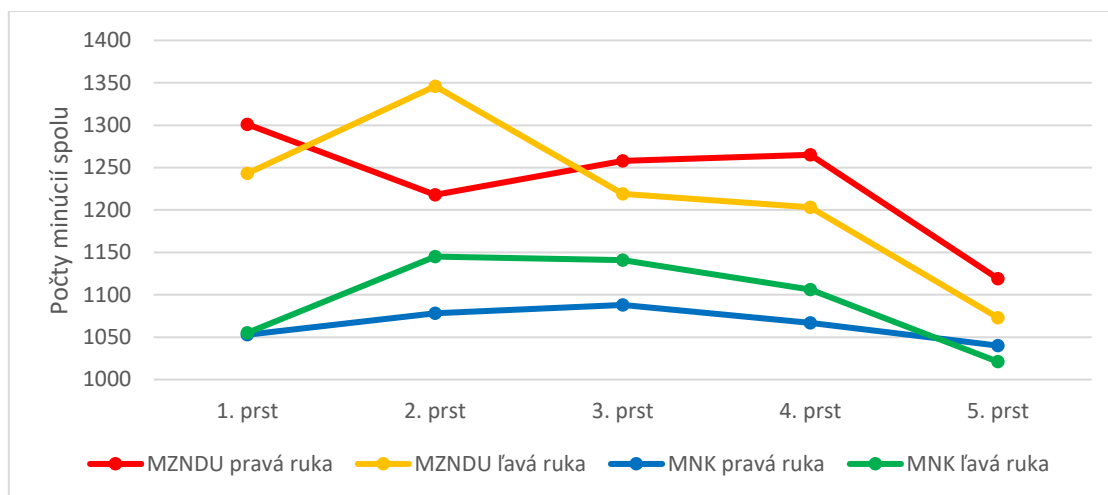
Získané dáta boli štatisticky spracované pomocou programov Microsoft Office Excel 365 a IBM SPSS Statistics 20. Dáta boli spracované pomocou Kolmogorov-Smirnovho testu normality. Výsledkom testu bolo zistené, že dáta nie sú normálne rozdelené, preto na ďalšiu analýzu boli použité neparametrické testy: Kruskal-Wallis test a Dvojvýberový Wilcoxonov test. Hladina významnosti bola určená ako $\alpha = 0,05$.

Výsledky a diskusia

Spolu bolo vyhodnotených 500 odtlačkov distálnych článkov prstov na základe dvoch metód. Celkovo bolo na odtlačkoch prstov vyznačených 23 039 minúcií, pričom 12 243 bolo na odtlačkoch prstov ohraničených metódou založenou na dermatoglyfických útvaroch a 10 794 na odtlačkoch prstov ohraničených metódou najvyššej kvality [6,7].

Pri porovnaní početností minúcií na pravej a ľavej ruke (Obr. 1) bolo v prípade metódy založenej na dermatoglyfických útvaroch (Tab. 4) zistený najväčší počet minúcií na pravej ruke na 1. prste a na ľavej ruke na 2. prste. Najväčší počet minúcií vyhodnotených metódou najvyššej kvality (Tab. 5) bol na pravej ruke na 3. prste a na ľavej ruke na 2. prste [6,7].

Porovnaním počtu minúcií medzi dvoma metódami bolo v každom prípade viac minúcií na odtlačkoch prstov, pri ktorých bola použitá metóda založená na dermatoglyfických útvaroch [6,7].



Obr. 2. Porovnanie počtu minúcií na prstoch pravej a ľavej ruky medzi dvoma metódami ohraničenia (MZNDU – metóda založená na dermatoglyfických útvaroch, MNK – metóda najvyššej kvality [6,7])

Priemerné počty minúcií sa pri metóde najvyššej kvality na pravej ruke pohybovali v rozmedzí medzi 21,76 – 20,80 a na ľavej ruke v rozmedzí medzi 22,90 – 20,42. Pri metóde založenej na dermatoglyfických útvaroch boli priemerné počty minúcií na pravej ruke v rozmedzí medzi 26,02 – 22,38 a na ľavej ruke v rozmedzí medzi 26,92 – 21,46 [6,7].

Tab. 2. Deskriptívna štatistika dát označených metódou založenou na dermatoglyfických útvaroch (1. – 5. – prsty, N – počet, f – frekvencia, Min – minimum, Max – maximum, SD – smerodajná odchýlka)

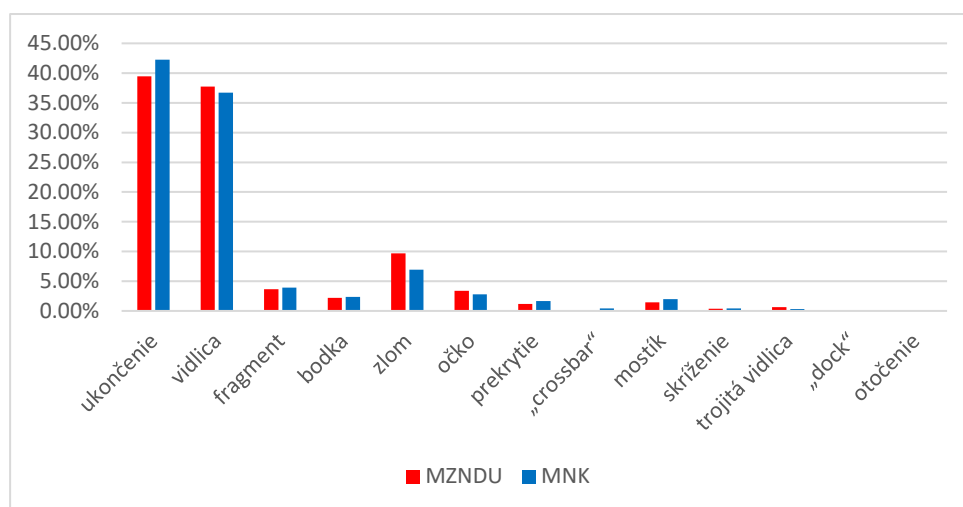
Prst	Pravá ruka					Ľavá ruka				
	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.
N	1 301	1 218	1 258	1 265	1 119	1 243	1 346	1 219	1 203	1 073
f (%)	21,12	19,77	20,42	20,53	18,16	20,43	22,12	20,04	19,77	17,64
Priemer	26,02	24,36	25,16	25,30	22,38	24,86	26,92	24,38	24,06	21,46
Min	5	10	8	11	8	9	13	10	6	11
Max	46	51	47	54	50	48	51	48	44	41
SD	9,27	8,42	7,49	8,13	7,29	8,19	9,35	7,86	8,42	5,89

Tab. 3. Deskriptívna štatistika dát označených metódou najvyššej kvality (1. – 5. – prsty, N – počet, f – frekvencia, Min – minimum, Max – maximum, SD – smerodajná odchýlka)

Prst	Pravá ruka					Ľavá ruka				
	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.
N	1 053	1 078	1 088	1 067	1 040	1 055	1 145	1 141	1 106	1 021
f (%)	19,77	20,24	20,43	20,03	19,53	19,29	20,94	20,87	20,23	18,67
Priemer	21,06	21,56	21,76	21,34	20,80	21,10	22,90	22,82	22,12	20,42
Min	7	8	10	9	9	8	10	8	7	11
Max	45	46	41	35	37	39	46	41	43	31
SD	7,50	7,77	6,87	5,83	5,46	7,06	7,49	7,00	7,91	4,80

Najpočetnejšími minúciami na prstoch ohraničených metódou založenou na dermatoglyfických útvaroch boli ukončenie a vidlica s frekvenciami výskytu 39,45 % a 37,72 %. Ostatné minúcie sa vyskytovali s frekvenciami menšími ako 10 % (Obr. 2). Najmenej početnými boli otočenie (0,08 %) a „dock“ (0,07 %) [7].

Na otláčkoch prstov ohraničených metódou najvyššej kvality boli taktiež najviac frekventované minúcie ukončenie a vidlica s frekvenciou výskytu 42,28 % a 36,72 %. Ostatné minúcie sa v súbore vyskytovali v pomerne malej frekvencii (Obr. 2). Minúcie s najmenšou početnosťou boli „dock“ (0,10 %) a otočenie (0,04 %) [6].



Obr. 3. Frekvencie minúcií hodnotené dvoma metódami ohraničenia
(MZNDU – metóda založená na dermatoglyfických útvaroch, MNK – metóda najvyššej kvality [6,7])

Porovnaním rozdielov celkovej bilaterálnej početnosti minúcií použitím jednotlivých metód neboli zistené signifikantné rozdiely medzi pravou a ľavou rukou. P-hodnota pre celkové hodnoty získané pomocou metódy najvyššej kvality bola 0,116 a pre celkové dáta získané metódou založenou na dermatoglyfických útvaroch 0,398. Pri testovaní rozdielov v počte minúcií spolu na pravej a ľavej ruke medzi dvoma metódami ohraničenia boli zistené signifikantné rozdiely v minúciách: vidlica ($p = 0,014$), zlom ($p = 0,030$), očko ($p = 0,003$), „crossbar“ ($p = 0,003$) a trojitá vidlica ($p = 0,013$) [6,7].

V štúdií Rivaldería et al. (2017) porovnávali odtlačky prstov dvoch Argentínskych populácií, pričom určovali minúcie vnútri a vonku kruhu, ktorý bol vycentrovaný v jadre vzoru. Najviac frekventovanými minúciami u mužov boli ukončenie (43,09 – 57, 82 %) a vidlica (28, 31 – 41,53 %) či už mimo alebo vnútri kruhu. Ostatné minúcie sa vyskytovali s pomerne nízkou frekvenciou [8]. Tieto pozorovania sa zhodovali s našimi výsledkami v prípade odtlačkov prstov označených dvoma metódami. Vo výskume bol potvrdený rozdiel

v početnostiach minúcií medzi dvoma metódami, pričom ich bolo viac pozorovaných metódu založenou na dermatoglyfických útvaroch. Tento fakt ju robí vhodnejšiu na analýzu odtlačkov prstov, aj keď je metóda najvyššej kvality viac používaná.

Záver

Analýzou odtlačkov prstov boli zistené počty a frekvencie minúcií na distálnych článkoch prstov na základe hodnotenia dvoma metódami. Najviac frekventovanými minúciami boli ukončenie a vidlica na odtlačkoch prstov ohraničených obidvomi metódami. Výskyt ostatných 11 typov minúcií bol značne nižší. Počty minúcií boli väčšie pri ohraničení odtlačkov metódou založenou na dermatoglyfických útvaroch. Štatisticky významné rozdiely v počte minúcií medzi dvoma metódami boli zistené pri minúciách vidlica, zlom, očko, „crossbar“ a trojitá vidlica. Bolo zistené, že existujú rozdiely medzi metódami použitými na analýzu papilárneho terénu. Vhodnejšou metódou na analýzu odtlačkov prstov bola metóda zložená na dermatoglyfických útvaroch, ktorou bol vyhodnotený väčší počet minúcií.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Zhu E., Yin J., Zhang G. (2005) Pattern Recognit. 38, p. 1685
- [2] Gutiérrez E., Galera V., Martínez J. M., et al. (2007) Forensic Sci. Int. 172, p. 98
- [3] Gungadin S. (2007) IJMU 2(2), p. 4
- [4] Preethi D. S., Nithin M. D., Manjunatha B., et al. (2012) J. Forensic. Sci. 57(2), p. 449
- [5] Bensal R., Seghal P., Bedi P. (2011) IJCSI 8(5), p. 74
- [6] Singh R. K., Sachdeva M. P. (2013) Indian J. Phys. Anthropol. Hum. Genet. 32(2), p. 343
- [7] Chovancová M., Beňuš R., Švábová P., et al. (2023) J. Forensic Leg. Med. 94, p. 102487
- [8] Rivaldería N., Gutiérrez-Redomero E., Alonso- Rodríguez C., et al. (2017) Sci. Justice 57(3), p. 199

Vplyv akustických a vizuálnych podnetov na správanie nosníc z rôznych chovných systémov v teste skreslenia pozornosti

Zuzana Skalná, Katarína Pichová, Ľubor Košťál

*Ústav biochémie a genetiky živočíchov Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Centrum biovied,
Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika; zu.skalna@gmail.sk*

Abstract

The influence of acoustic and visual stimuli on the behaviour of laying hens from different housing systems in the attention bias test

Environment, affective states and cognitive abilities influence each other. In our study, 20 adult laying hens (9 housed in enriched cages, 11 in deep litter pens) were habituated to the test arena and the reward (mealworms). Then they were presented with 5 different types of acoustic or 5 types of visual stimuli (8 s) with potentially different affective contexts for hens, that could bias their attention. Each stimulus was presented twice – 1st time upon entering the arena and 2nd time after the first peck at the reward. Latency to start consuming the reward after the 1st stimulus presentation and the latency to continue in reward consumption after the 2nd stimulus presentation were analysed. Attention was influenced only by the type of acoustic stimulus after its 2nd presentation ($F_{4,72} = 3.75$, $P < 0.01$). The latency to continue in reward consumption was longer after the presentation of the alarm call of a group of hens to an aerial predator compared to the silence ($P < 0.05$), the white noise ($P < 0.05$), and the alarm call of a group of hens to a terrestrial predator ($P < 0.05$).

Keywords: *laying hens; attention bias test; auditory stimuli; visual stimuli*

Úvod a formulácia cieľa

Je našou morálnou povinnosťou zabezpečiť hospodárskym zvieratám „pohodu“ / welfare a dopriať im život hodný žitia aj v podmienkach intenzívneho chovu. Na to je potrebné zabezpečiť pre zvieratá dobré životné podmienky [1] a minimalizovať výskyt negatívnych skúseností, ale aj zabezpečiť príležitosti na získanie tých pozitívnych [2].

Kura domáca (*Gallus gallus domesticus*) patrí medzi intenzívne chované hospodárske zvieratá pre jej mäso a produkciu vajec. Vo väčšine vyspelých krajín sveta je chovaná v dobre kontrolovaných veľmi umelých podmienkach chovu, napr. nosnice, sliepky vyšľachtené na vysokú produkciu vajec, sú vo veľkých počtoch chované v jednopohlavných skupinách. V rámci Európskej únie od januára 2012 nie je možné chovať sliepky v tzv. konvenčných klietkových systémoch, ktoré síce mali isté výhody, ale zvieratám neumožňovali vykonávať ich prirodzené správanie a obmedzovali ich pohyb [3]. V obohatených klietkových systémoch síce nosnice získali väčší životný priestor a niektoré prvky obohatenia prostredia, ale ich pohyb je stále relatívne limitovaný a nie je im umožnené plné vykonávanie prirodzeného správania. V chove na hlbokú podstielku alebo vo výbehoch je vyššia šanca na výskyt parazitov, ochorení alebo zranení sliepok v dôsledku zvýšeného pohybu, ozobávania peria, kanibalizmu alebo hromadenia na jednom mieste [4]. Žiadny z aktuálne používaných systémov nie je ideálny [5].

Strach alebo úzkosť sú afektívne reakcie na skutočné alebo potenciálne ohrozenie welfaru alebo prežitia. Ich hlavnou funkciou je spustiť vhodné adaptačné reakcie na signály o nebezpečenstve, ohrození alebo konflikte motivácii. Zatiaľ čo je úzkosť chápaná ako všeobecná odpoveď na neznámu hrozbu alebo konflikt v motivácii, strach slúži ako motivačný stav vyvolaný špecifickými podnetmi, ktoré vedú k obrannému správaniu alebo úniku [6]. Dlhodobé prežívanie strachu alebo úzkosti negatívne ovplyvňuje welfare, vyčerpáva organizmus a narúša schopnosť úspešne zvládať životné výzvy. Existuje množstvo testov na hodnotenie strachu u sliepok (napr. test tonickéj imobility, test priblíženia sa k človeku, test otvoreného poľa), avšak testov na hodnotenie úzkosti je menej. Campbell a kol. [7] navrhli testovanie miery úzkosti sliepok pomocou testu kognitívneho skreslenia.

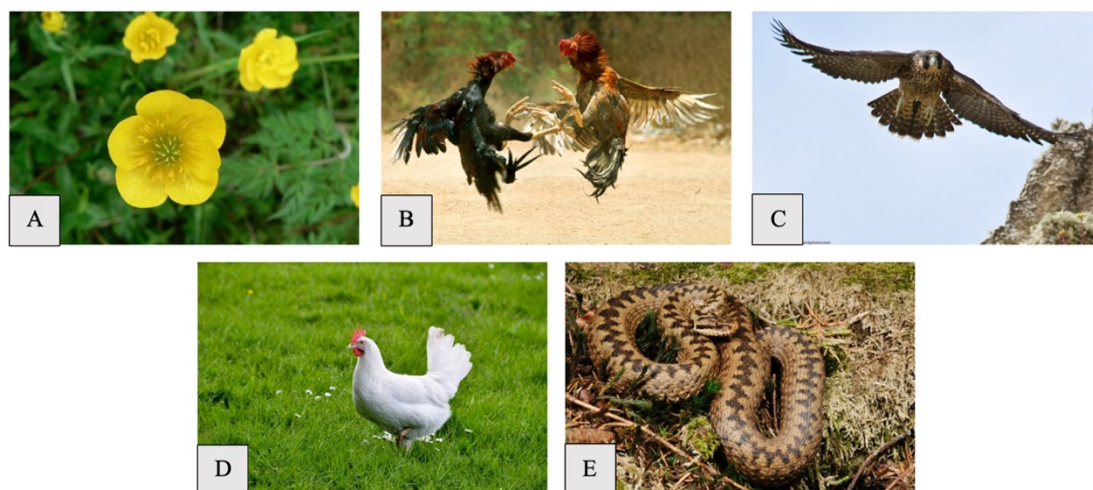
Kognitívne schopnosti, mechanizmy akými jedinec získava, spracováva a ukladá informácie z prostredia [8], sú ovplyvňované afektívnymi stavmi a rovnako aj afektívne stavy ovplyvňujú [9, 10]. Keď hovoríme o kognitívnom skreslení, hovoríme o vplyve emócií na kognitívne procesy, akými sú pozornosť, pamäť alebo tvorba úsudku. Prežívanie negatívnych afektívnych stavov (napr. úzkosti) môže ovplyvniť jedincovo vnímanie hrozby, čo môže ovplyvniť / skresliť jeho pozornosť. Vzťah skreslenia pozornosti k úzkostným stavom bol farmakologicky overený u oviec [11-13] a hovädzieho dobytku [14]. Zvieratá, ktorým bolo podané anxiogénne liečivo meta-chlórfenylpiperazín a bol im krátko ukázaný pes, vykazovali zvýšenú ostražitosť a smerovali viac pozornosti ku miestu, kde videli psa v porovnaní s kontrolnými zvieratami [11-14]. Campbell a kol. [7] sledovali vplyv prezentácie nahrávky s výstražným volaním veľkej skupiny sliepok v reakcii na prítomnosť pozemného predátora na sliepky, ktoré v systéme chovu vo viacúrovňovej hale dobrovoľne chodili do vonkajšieho výbehu, keď mali možnosť a na sliepky, ktoré von nechodili. Ukázalo sa, že sliepky, ktoré do vonkajšieho výbehu nechodili boli oproti slietkam dobrovoľne chodiacim von ostražitejšie (t. j. viac naťahovali krk a obzerali sa) a pomalšie sa vracali ku konzumácii krmiva po vypočutí si nahrávky s volaním.

V našej práci sme skúmali vplyv zvukových a vizuálnych podnetov, u ktorých sme predpokladali, že by mohli u nosníc navodiť odlišný afektívny stav na správanie v teste skreslenia pozornosti (angl. attention bias test). Predpokladali sme, že nosnice z obohatených klietok, ktorým je menej umožnené realizovať svoje prirodzené správanie a majú obmedzenejšie možnosti na pohyb, budú venovať potenciálne ohrozujúcim podnetom väčšiu pozornosť (t. j. budú reagovať s dlhšími latenciami) ako nosnice chované na hlbokjej podstielke.

Materiál a metódy

V experimente sme použili 20 nosníc plemena White Leghorn, z ktorých 9 bolo chovaných v obohatených kliebkach a 11 na hlbkej podstielke. Testovacia aparátúra pozostávala zo štartovacieho boxu (36 x 36 x 45 cm) a testovacej arény (125 x 125 x 125 cm) snímanej kamerou. Zdroj prezentovaných vizuálnych a akustických podnetov (monitor alebo reproduktor) sa nachádzal na náprotivnej stene ku vstupu do arény. Miska s odmenou (s múčnymi červami *Tenebrio molitor*) sa nachádzala 10 cm pred zdrojom podnetov. Zvieratá boli pred testovaním habituované na testovaciu arénu.

V teste skreslenia pozornosti boli nosniciam prezentované v dvoch nezávislých pokusoch akustické alebo vizuálne podnety (8 s). Akustické podnety boli normalizované pomocou softvéru Audacity (t. j. špičková amplitúda bola pre všetky zvuky štandardizovaná na -1 dB) a boli prehrávané s maximálnou intenzitou zvuku 80 dB. Predstavovali ich ticho (kontrola), biely šum, volanie sokola rároha (*Falco cherrug*), výstražné volanie veľkej skupiny sliepok ako reakcia na pozemného predátora (prevzaté od [7]) a výstražné volanie malej skupiny sliepok ako reakcia na vzdušného predátora. Ako vizuálne podnety sme použili kvet (*Ranunculus acris*), bielu sliepku, zápasiacich kohútov, vretenicu obyčajnú (*Vipera berus*) a sokola sťahovavého (*Falco peregrinus*) (Obr. 1.). Sliepky boli v jednom sedení vystavené jednému z podnetov dvakrát – prvýkrát po vstupe do arény (oba beháky sa dotkli podlahy arény) a druhýkrát po prvom zobnutí do misky s odmenou. Podnety boli prezentované v náhodnom poradí a všetky sliepky boli vystavené všetkým podnetom.



Obr. 1. Vizuálne podnety prezentované v teste skreslenia pozornosti –

Nosniciam bol v jednom sedení dvakrát prezentovaný jeden náhodne vybraný podnet. A) kvet (*Ranunculus acris*), B) biela sliepka, C) zápasiace kohúty, D) vretenica obyčajná (*Vipera berus*) alebo E) sokol sťahovavý (*Falco peregrinus*).

Hodnotili sme latenciu prvej konzumácie odmeny od začiatku prvej prezentácie podnetu a latenciu návratu ku konzumácii odmeny po druhej prezentácii podnetu. Dáta boli hodnotené pomocou analýzy rozptylu s použitím procedúry GLIMMIX v programe SAS (SAS® University Edition, USA).

Výsledky a diskusia

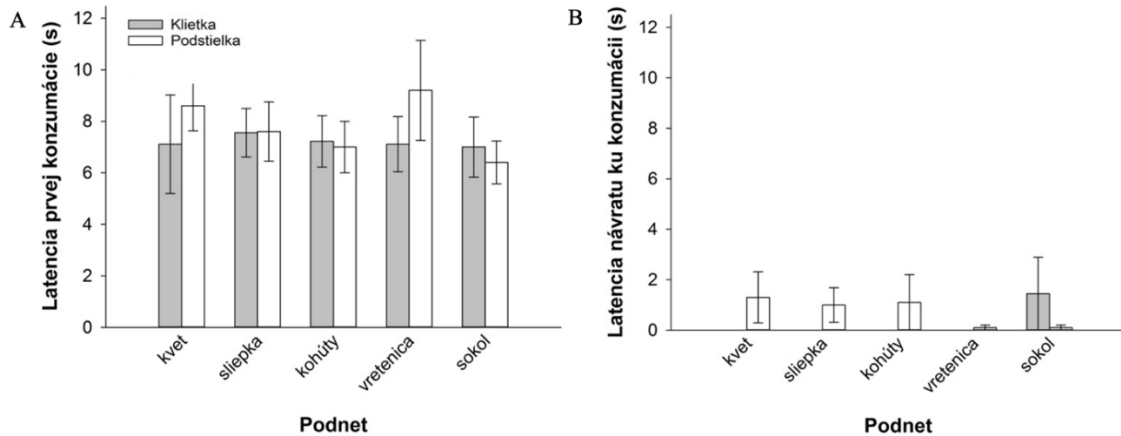
Akustické a vizuálne podnety nevyvolali v nosniciach tak silný negatívny afektívny stav (strach alebo úzkosť, [6]), aby prestali s konzumáciou odmeny. Niektoré sliepky boli natoľko motivované získať odmenu, že latencia prvej konzumácie odmeny bola kratšia ako trvanie prvej prezentácie podnetu (8 s). Druhá prezentácia začala okamžite po skončení prvej prezentácie.

Nepozorovali sme vplyv rôzneho chovného prostredia nosníc na latenciu konzumácie odmeny po prvej ani po druhej prezentácii akustického (1. latencia $F_{1,72} = 0,956$, $P = 0,955$; 2. latencia $F_{1,72} = 0,35$, $P = 0,555$) alebo vizuálneho podnetu (1. latencia $F_{1,68} = 0,18$, $P = 0,676$; 2. latencia $F_{1,68} = 0,67$, $P = 0,416$). Naša hypotéza, že nosnice z obohatených klietok budú venovať väčšiu pozornosť ohrozujúcim podnetom (t.j. mať dlhšie latencie) ako nosnice chované na hlbokkej podstielke, sa nepotvrdila.

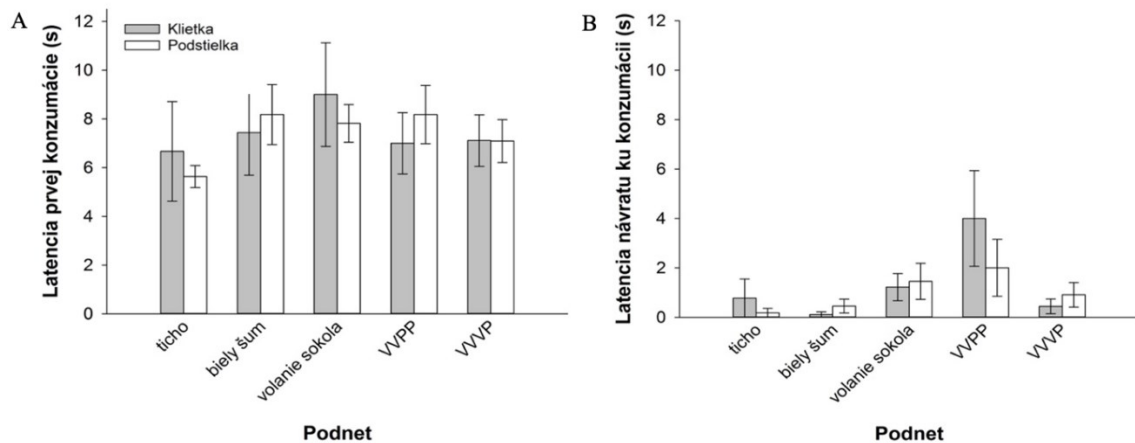
Rovnako sme nepozorovali vplyv žiadneho z vizuálnych podnetov na latenciu prvej konzumácie odmeny ($F_{4,68} = 0,78$, $P = 0,539$) ani návratu ku konzumácii odmeny ($F_{4,68} = 0,848$, $P = 0,539$) (Obr. 2.). Je otázne či nosnice rozlišovali a rozpoznávali obsah prezentovaných vizuálnych podnetov. Bežné monitory sú navrhnuté s ohľadom na ľudský zrak, ale spracovávanie vizuálnych podnetov zvieratami je pravdepodobne odlišné od toho nášho [15]. Samotné oči sliepok sú iné ako ľudské, napr. sliepky majú v oku 6 typov vizuálnych fotoreceptorov a ľudia 3 typy, pričom každé oko sliepok je dominantne využívané na vnímanie inak vzdialených objektov [16]. Obe tieto skutočnosti mohli ovplyvniť vnímanie a správanie pri prezentácii podnetov. Nemožno vylúčiť ani to, že prezentované obrázky neprezentovali pre sliepky dostatočne silné podnety na vyvolanie odlišných afektívnych stavov.

Žiadny z akustických podnetov neovplyvnil latenciu prvej konzumácie odmeny ($F_{4,72} = 1,04$, $P = 0,392$), ale bola ovplyvnená latencia návratu všetkých nosníc ku konzumácii odmeny ($F_{4,72} = 3,75$, $P < 0,01$). Prezentácia výstražného volania veľkej skupiny sliepok reagujúcich na prítomnosť pozemného predátora predĺžila latenciu návratu ku konzumácii odmeny v porovnaní s kontrolou ($P < 0,05$), bielym šumom ($P < 0,05$) a s výstražným volaním malej skupiny v reakcii na vzdušného predátora ($P < 0,05$) (Obr. 3.). Tento podnet nahrali Campbell a kol. [7] pri sledovaní správania experimentálnych zvierat. Sliepky ustajnené vo viacetážovej

hale, ktoré nikdy nechodili dobrovoľne von, venovali varovnému volaniu viac pozornosti ako zvieratá využívajúce vonkajší výbeh, strávili viac času v ostražitom postoji po prvej prezentácii podnetu a mali dlhšie latencie konzumácie potravy a návratu ku konzumácii potravy [7].



Obr. 2. Vplyv vizuálnych podnetov na správanie nosníc z rôznych chovných prostredí v teste skreslenia pozornosti – Porovnanie správania sliepok z rôznych chovných prostredí (hlboká podstielka alebo obohatená kliečka) po prezentácii prvého vizuálneho podnetu (t. j. latencia prvej konzumácie odmeny) a po prezentácii druhého vizuálneho podnetu (t. j. latencia návratu ku konzumácii odmeny). Zvieratám bol prezentovaný náhodne vybraný podnet zo zoznamu: kvet (*Ranunculus acris*), biela sliepka, zápasiace kohúty, vretenica obyčajná (*Vipera berus*) alebo sokol sťahovavý (*Falco peregrinus*). Dáta predstavujú priemerné latencie (s) $\pm$ SEM.



Obr. 3. Vplyv akustických podnetov na správanie nosníc z rôznych chovných prostredí v teste skreslenia pozornosti – Porovnávanie správania sliepok z rôznych chovných prostredí (hlboká podstielka alebo obohatená kliečka) po prezentácii prvého akustického podnetu (t. j. latencia prvej konzumácie odmeny) a po prezentácii druhého akustického podnetu (t. j. latencia návratu ku konzumácii odmeny). Zvieratám bol prezentovaný náhodne vybraný podnet zo zoznamu: ticho, biely šum, volanie sokola rároha (*Falco cherrug*), výstražné volanie veľkej skupiny sliepok reagujúcich na prítomnosť pozemného predátora (VVPP) a výstražné volanie malej skupiny sliepok v reakcii na vzdušného predátora (VVVP). Dáta predstavujú priemerné latencie (s) $\pm$ SEM.

Záver

Informácia o prítomnosti hrozby je dôležitá pre prežitie jedinca a musí byť citlivo

vnímaná a vyhodnotená pre zvolenie adekvátnej adaptačnej stratégie. Tieto kognitívne procesy ovplyvňujú afektívne stavy a sú nimi aj ovplyvňované. Jedinci v negatívnych afektívnych stavoch venujú potenciálnym hrozbám viac pozornosti a vyhodnocujú ich ostražitejšie a viac negatívne ako jedinci v neutrálnych alebo pozitívnych afektívnych stavoch. Rôzne chovné prostredia nosníc v našom experimente, t. j. chov na hlbokú podstielku alebo v obohatených klietkach, neovplyvnili afektívne stavy zvierat spôsobom, ktorý by bol merateľný v správaní v teste skreslenia pozornosti.

PodĎakovanie

Experiment bol zrealizovaný s podporou Slovenskej agentúry na podporu výskumu a vývoja [APVV-17-0371].

Zoznam použitej literatúry

- [1] Správa FAWC (2005) o dobrých životných podmienkach hospodárskych zvierat
- [2] Mellor D. J. (2016) *Animals* 6 (21), p. 1
- [3] Duncan I. J. H. (2004) Welfare problems of poultry. In: Benson G. J., Rollin B. E. (eds) *The well-being of farm animals: challenges and solutions*. Blackwell Publishing, New Jersey, USA, p. 307
- [4] Lay D. C. Jr., Fulton R. M., Hester P. Y., et al. (2011) *Poult. Sci.* 90 (1), p. 278
- [5] Hartcher K. M., Jones B. (2017) *Poult. Sci. J.* 73(4) p. 767
- [6] Steimer T. (2002) *Dialogues Clin. Neurosci.* 4(3) p. 231
- [7] Campbell D., Taylor P. S., Hernandez C. E., et al. (2019) *PeerJ* 7: e7303, p. 1
- [8] Shettleworth S. J. (2010) *Cognition, Evolution, and Behavior*. Oxford University Press, Oxford, England, p. 1
- [9] Paul E. S., Harding E. J., Mendl M. (2005) *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, p. 469
- [10] Mendl M., Burman O., Parker R. , et al. (2009) *Appl. Anim. Behav. Sci.* 118, p. 161
- [11] Lee C., Verbeek E., Doyle R. E., et al. (2016) *Biol. Lett.* 12(6): 20150977, p. 1.
- [12] Monk J. E., Doyle R. E., Colditz I. G., et al. (2018a) *PLoS One* 13(1): e0190404, p. 1
- [13] Monk J. E., Belson S., Colditz I. G., et al. (2018b) *Front. Behav. Neurosci.* 12(246), p. 1
- [14] Lee C., Cafe L. M., Robinson S. L., et al., (2018) *Appl. Anim. Behav. Sci.* 205, p. 210
- [15] D'Eath (1998) *Biol. Rev.* 73, p. 267
- [16] Seifert M., Baden T., Osorio D. (2020) *Semin. Cell Dev. Biol.* 106, p. 106

Identifikácia a charakterizácia variantu v géne *EYA1* asociovaného so závažnými symptómami branchio-oto-renálneho syndrómu

Marek Sklenár¹, Silvia Borecká¹, Miloslav Karhánek¹, Martina Škopková¹, Lukáš Varga^{1,2}, Daniela Gašperíková¹

¹*Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Ústav experimentálnej endokrinológie, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika;*

marek.sklenar@savba.sk

²*Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Univerzitná nemocnica Bratislava, Klinika otorinolaryngológie, chirurgie hlavy a krku, Antolská 11, 851 07 Bratislava, Slovenská republika*

Abstract

Identification and characterization of the *EYA1* gene variant associated with severe symptoms of branchio-oto-renal syndrome

Branchiootorenal syndrome (BOR) is a disease manifested by branchiogenic fistulas and cysts, hearing loss, structural defects of the outer, middle, and inner ear and renal abnormalities. It is an autosomal dominant disease caused by pathogenic mutations in *EYA1*, *SIX1* and *SIX5* genes. However, the genotype-phenotype correlation in patients has not been determined yet. The aim of our study was to reveal the genetic cause of BOR syndrome with severe manifestation, like kidney agenesis and congenital hearing loss in a family with affected children, and to confirm the potential pathogenic effect of identified variant. Whole exome sequencing revealed a novel heterozygous 82bp (c.1051-80_1052del) deletion affecting the *EYA1* intron 11 – exon 12 boundary. The mini gene assay confirmed the pathogenic character of this deletion. The emerging abnormal transcript could escape nonsense-mediated decay and truncated EYA1 proteins may act in a dominant-negative manner, what can be associated with severe disease manifestation.

Keywords: Branchiootorenal syndrome; BOR; *EYA1*, deletion, splicing, Minigene assay; WES

Úvod a formulácia cieľa

Branchio-oto-renálny syndróm (BOR) je ochorenie prejavujúce sa viacerými malformáciami (branchiálne a preaurikulárne cysty a fistuly, deformácie vonkajšieho, stredného alebo vnútorného ucha), poruchou sluchu a renálnymi abnormalitami. Vo vyspelých krajinách je prevalencia ochorenia 1 : 40 000 živonarodených detí. BOR syndróm má vysokú penetranciu, avšak jeho príznaky sú variabilné a vyznačujú sa rozdielmi v prejavoch a závažnosti i medzi členmi jednej rodiny. Najčastejším symptómom je porucha sluchu, ktorou trpí 90 % pacientov [1].

BOR syndróm spôsobujú patogénne varianty v génoch *EYA1*, *SIX1* a *SIX5*, ktoré vykazujú autozomálne dominantnú dedičnosť. Počas embryonálneho vývinu produkt génu *EYA1* funguje ako transkripčný koaktivátor zodpovedný za vývin 2., 3., a 4. branchiálneho oblúka, ucha i obličiek. Produkty génov *SIX1* a *SIX5* v interakcii s EYA1 fungujú ako bipartitné transkripčné faktory dôležité pre rast a proliferáciu prekursorových buniek počas

embryonálneho vývinu [2 – 3].

V 40 % až 85 % prípadov sú za ochorenie zodpovedné práve mutácie v géne *EYAI*. Okrem *missense* variantov majú vysoké zastúpenie aj *nonsense* a *frameshift* varianty, ale i varianty ovplyvňujúce zostrih pre-mRNA. Okrem toho oblasť génu *EYAI* podlieha aj zmenám v počte kópií. Medzi *missense* variantmi a variantmi ovplyvňujúcimi dĺžku proteínu sa však zvyčajne nepozoruje rozdiel v klinickom fenotype [4 – 5].

Cieľom tejto štúdie bolo objasniť príčinu BOR syndrómu v rodine, v ktorej sa príznaky ochorenia, i napriek autozomálne dominantnej dedičnosti a vysokej penetrancii ochorenia, prejavili len u potomkov, avšak nie u rodičov. Keďže v študovanej rodine sa BOR syndróm u všetkých postihnutých pacientov prejavil závažným priebehom ochorenia už v nízkom veku, odhalený genetický variant sme sa rozhodli funkčne charakterizovať a stanoviť jeho vplyv na génový produkt a patogenézu ochorenia.

Materiál a metódy

Izolácia genomickej DNA. Na izoláciu genomickej DNA z periférnej krvi pacientov sme použili Whole Blood DNA Maxi Preparation Kit (Bioteke Corporation) a automatický izolátor MagCore® Genomic DNA Large Volume Whole Blood Kit (RBCBioscience).

Celoexómové sekvenovanie (WES) a bioinformatické spracovanie. Výstup z WES nám poskytuje možnosť identifikácie variantov vo všetkých kódujúcich sekvenciách a priľahlých intrónových oblastiach pacientovho genómu. DNA probanda (III.1) sme zaslali na WES analýzu (Theragen, Kórea). Získané čítania sme analyzovali niekoľkostupňovým bioinformatickým postupom a rozsiahlou anotáciou variantov, napríklad za použitia informácií z databáz dbSNP, ENCODE, UCSC, ClinVar a KEGG [6]. Bežné varianty (max. frekvencia alely >0,01 v GnomAD) sa odfiltrovali a zvyšné varianty sme prioritizovali manuálne za použitia informácií, ako *in silico* predikčné algoritmy (REVEL), dopad na funkciu proteínu, predchádzajúce publikované informácie o variante a pod. Identifikovaný variant a jeho kosegregácia v rodine bola overená sekvenovaním podľa Sangera.

Klonovanie sekvencie študovaného exónu do plazmidu. Pomocou PCR sme z genómu probanda III.1 amplifikovali sekvenciu študovaného exónu spolu s priľahlými intrónovými sekvenciami z wt alely, ako aj alely nesúcej študovaný variant. V ďalšom kroku sme pomocou Nested PCR na konce amplicónov pridali sekvencie attB1 a attB2 miest, čo je nevyhnutný krok pre následné naklonovanie amplicónov podľa protokolu od Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen) do plazmidu pSpliceExpress (Addgene, #32485). Plazmid obsahuje samovražedné gény *ccdB* a *CmR* v kazete, ktorá sa vyštiepuje po attB-attP rekombinácii.

Amplikón so študovaným exónom je vložený namiesto kazety medzi exóny 2 a 3 potkanieho inzulínového génu *Ins*. Pripravené plazmidy sme vložili do kompetentných baktérií (DH5 α , Sigma), ktoré sme následne kultivovali na Petriho miskách so selekčným médiom (LB_{AMP100}). Pomocou „colony“ PCR a sekvenovaním podľa Sangeru sme u vybraných kolónií overili správnu orientáciu vlozenej sekvencie a prítomnosť, resp. neprítomnosť skúmaného variantu. Po overení sme z vybraných kolónií vyizolovali plazmidovú DNA pomocou Monarch® Plasmid Miniprep Kit (New England BioLabs).

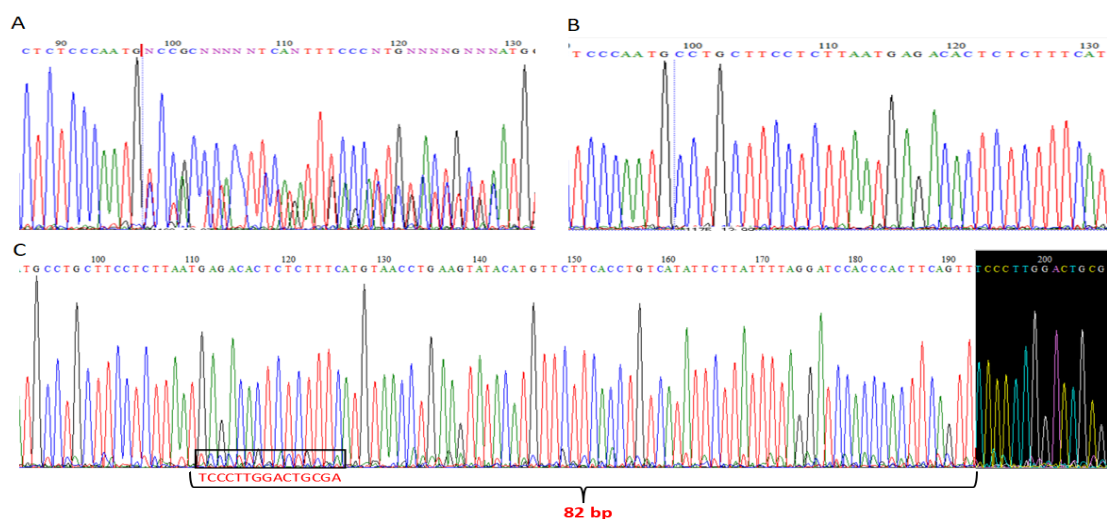
Minigene assay. Bunkovú líniu HeLa sme kultivovali v 12-jamkových platniach (1.10⁵ bb/jamka) pri 37 °C v DMEM médiu s prídavkom 10 % fetálneho bovinného séra (FBS), 1% L-glutamínu a 1 % zmesi penicilínu, streptomycínu a amfotericínu B (Gibco). Po dosiahnutí „confluency“ približne 90 %, sme bunky transfekovali plazmidmi pSpliceExpress s naklonovanými wt, respektíve mutovanými amplikónmi transfekčným činidlom Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (Invitrogen). Po 24 hodinách sme z buniek vyizolovali RNA pomocou protokolu QIAGEN Rneasy Mini Kit (Qiagen) a vyizolovanú RNA sme následne pomocou SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) prepísali do cDNA. Zo zmesi cDNA sme študované transkripty amplifikovali pomocou PCR. Vplyv variantu na *splicing* študovaného exónu sme posúdili podľa veľkosti výsledných transkriptov vizualizovaných elektroforézou DNA v agarózovom géli a sekvenciu transkriptov sme následne overili sekvenovaním podľa Sangeru.

Výsledky a diskusia

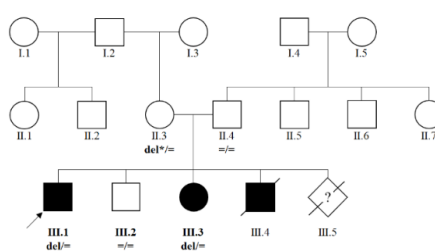
Autozomálne dominantný BOR syndróm vykazuje vysokú penetranciu s variabilnou expresivitou. Dodnes sa nepodarilo spoľahlivo stanoviť genotypovo-fenotypovú koreláciu ochorenia, keďže i medzi deléciou celého génu a variantmi zamieňajúcimi jedinou aminokyselinu sa nepozorujú rozdiely v dopade na závažnosť ochorenia. Príznaky ochorenia však môžu značne variovať i medzi členmi jednej rodiny [5, 7]. V nami študovanej rodine (Obr. 2) bola u probanda (III.1) diagnostikovaná kongenitálna porucha sluchu, krčné a preaurikulárne fistuly a cysty a agenéza ľavej obličky a močovodu. U sestry probanda (III.3) sme pozorovali podobný fenotyp, zo spektra renálnych abnormalít sa u nej diagnostikovala ektopická pravá oblička. Okrem toho matka podstúpila interrupciu, pričom u plodu (III.4) bola diagnostikovaná agenéza oboch obličiek. Napriek ťažkému priebehu ochorenia u postihnutých potomkov ani jeden z rodičov nevykazuje symptómy BOR syndrómu.

V snahe objasniť príčinu familiárneho BOR syndrómu sme sa zamerali na analýzu

génov *EYA1*, *SIX1* a *SIX5*. Zo získaných čítaní WES analýzy sme bioinformatickým postupom identifikovali delečný variant *EYA1* (NM_000503.6):c.1051-80_1052del dlhý 82 bp, nachádzajúci sa na rozhraní intrónu 11 a exónu 12. Sekvenovaním podľa Sangeru sme overili prítomnosť tejto patogénnej delécie v heterozygotnom stave u probanda (III.1) a jeho sestry (III.3). U zdravého otca (II.4) ani u zdravého brata probanda (III.2) sa variant nenachádza, avšak u zdravej matky (II.3) sme identifikovali prítomnosť variantu vo forme genetickej mozaiky (Obr. 1). Odhalenie genetickej mozaiky u matky (II.3) tak objasnilo problematickú kosegregáciu ochorenia v rodine (Obr. 2).



Obr. 1. Overenie prítomnosti delečného variantu *EYA1*(NM_000503.6):c.1051-80_1052del sekvenovaním
Nukleotidová sekvencia úseku hranice intrónu 11 a exónu 12 génu *EYA1* u probanda III.1 (A), zdravého rodinného príslušníka II.4 (B) a pravdepodobná genetická mozaika u zdravej matky II.3 (C)



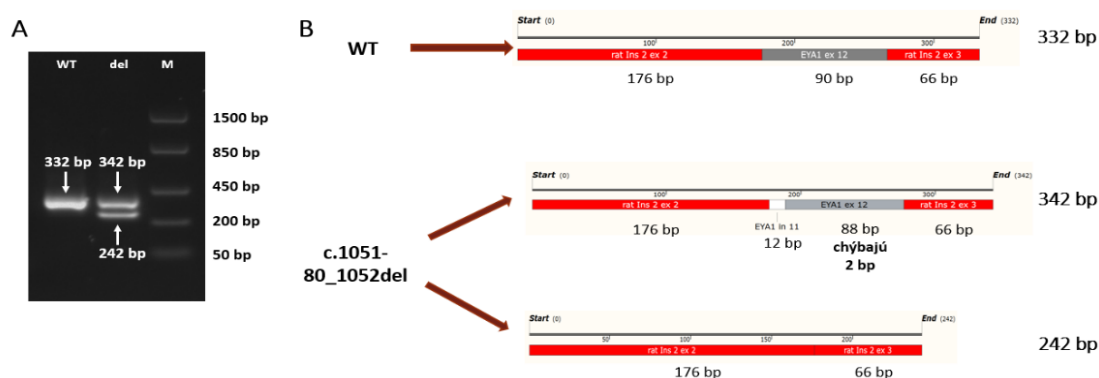
Obr. 2. Rodokmeň analyzovanej rodiny s autozomálne dominantným BOR syndrómom

U zvýraznených členov rodiny sme sekvenovaním podľa Sangeru stanovili genotyp: del/= - prítomnosť delečného variantu c.1051-80_1052del v heterozygotnom stave, /=/ - štandardný genotyp bez prítomnosti delécie (wt), del*/= - prítomnosť delečného variantu c.1051-80_1052del v mozaikovej forme. Štvorec – muž, kruh – žena, šípka – proband, vyplnenie útvaru – porucha sluchu, krčné a preaurikulárne fistuly, poškodenie obličiek, preškrtnutý útvar – úmrtie

Odhalený variant predstavuje deléciu v géne *EYA1* dlhú 82 bp, ktorá zasahuje intrón 11 s 2 bp presahom do exónu 12. Bioinformatický nástroj SpliceAI [8] predpovedal dopad variantu na narušenie zostrihu pre-mRNA *EYA1* v dôsledku straty akceptorového miesta

v intróne 11. Pre závažný fenotyp postihnutých nositeľov tohto variantu sme sa pokúsili overiť jeho dopad na narušenie zostrihu a výsledný génový produkt pomocou *Minigene assay*.

Elektroforéza DNA preukázala, že po naklonovaní wt alely do plazmidu pSpliceExpress vzniká jeden transkript, kým alela s deléciou generuje dva transkripty (Obr. 3A). Sekvenovaním sme overili, že transkript wt amplikónu obsahuje neporušený exón 12 génu *EYAI* medzi inzulínovými exónmi 2 a 3 (Obr. 3B). Prítomnosť delečného variantu vedie k využitiu alternatívneho akceptorového miesta, čím sa do zostrihnutého transkriptu s celkovou dĺžkou 342 bp dostala aj 12 bp sekvencia z intrónu 11 a sekvencia exónu 12 bez prvých dvoch nukleotidov odstránených deléciou. Delécia spôsobuje aj vyštiepenie exónu 12, čo sa prejavilo vznikom druhého transkriptu dlhého 242 bp obsahujúceho len inzulínové exóny (Obr. 3B).



Obr. 3. Schéma výsledkov *Minigene assay* pre deléciu c.1051-80_1052del v géne *EYAI*

Vloženie wt alely do plazmidu pSpliceExpress vedie ku vzniku 1 transkriptu, kým vloženie alely s variantom c.1051-80_1052del vedie k tvorbe dvoch rôznych transkriptov (A). Transkript vznikajúci z wt alely obsahuje neporušený exón 12. Transkript dlhý 342 bp, vznikajúci z alely nesúcej deléciu, obsahuje 12 bp z intrónovej sekvencie vďaka využitiu nového akceptorového miesta a sekvenciu exónu 12 skrátenú o prvé dva nukleotidy. V kratšom transkripte s dĺžkou 242 bp došlo k *exon skipping* a transkript obsahuje len dva inzulínové exóny (B)

V transkripte s dĺžkou 342 bp dochádza využitím alternatívneho akceptorového miesta k inzercii 12 bp z intrónu 11 do kódujúcej sekvencie *EYAI* a následnému posunu čítacieho rámca a vzniku terminačného kodónu v sekvencii exónu 12. Kým proteín vznikajúci z nenarušeného transkriptu obsahuje 592 aminokyselín, produkt abnormálneho transkriptu by po inzercii 4 nových aminokyselín z intrónu 11 a terminácii translácie v exóne 12 obsahoval 379 aminokyselín. Hoci sa doposiaľ nepodarilo spoľahlivo stanoviť genotypovo-fenotypovú koreláciu ochorenia [7], Stockley a kol., 2009 ukázali, že variant c.867+5G>A, ktorý ovplyvňuje *splicing EYAI* pre-mRNA a spôsobuje vznik predčasného STOP kodónu v exóne 9, dokáže unikáť procesu *nonsense-mediated decay* (NMD) [9]. Takto skrátený proteín EYAI obsahuje neporušenú N-terminálnu transaktivačnú doménu nevyhnutnú pre väzbu so SIX1. Pozmenená C-terminálna, fosfatázová doména s katalytickou aktivitou však nie je schopná

aktivovať transkripciu *downstream* génov [9 – 10]. Variant tak môže pôsobiť dominantne-negatívnym mechanizmom, o čom svedčí aj vyššia prevalencia závažných renálnych abnormalít u jeho nositeľov [9]. Podobne by aj produkt abnormálneho transkriptu s predčasným STOP kodónom v exóne 12, identifikovaný v našej štúdii, mohol obsahovať neporušenú

N-terminálnu doménu. Došlo by však k skráteniu produktu a k narušeniu C-terminálnej domény. Či aj nami odhalený variant uniká NMD a spôsobuje závažný priebeh ochorenia totožným mechanizmom, by v budúcnosti bolo vhodné potvrdiť kvantitatívnou analýzami *real-time* PCR *downstream* génov a *Western blot* proteínu EYA1.

Záver

V kaukazoidnej rodine s familiárnym výskytom BOR syndrómu sa nám podarilo identifikovať deléciu v gène *EYA1*(NM_000503.6):c.1051-80_1052del. Patogenitu delécie sme potvrdili analýzou jej vplyvu na *splicing* pre-mRNA. Získané výsledky by mohli prispieť k lepšiemu pochopeniu mechanizmov pôsobenia dominantne negatívnych variantov a k objasneniu genotypovo-fenotypovej korelácie u pacientov s BOR syndrómom.

PodĎakovanie

Výskum bol podporený projektami APVV-20-0236 a ITMS: 313021BZC9.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Krug P., Morinière V., Marlin S., et al. (2011) Hum. Mutat. 32(2), p. 183
- [2] Patrick A. N., Cabrera J. H., Smith A. L., et al. (2013) Nat. Struct. Mol. Biol. 20(4), p. 447
- [3] Morisada N., Nozu K., Iijima K. (2014) Pediatr. Int. 56(3), p. 309
- [4] Song M. H., Kwon T. J., Kim H. R., et al. (2013) PLoS One 8(6), p. e67236
- [5] Masuda M., Kanno A., Nara K., et al. (2022) Sci. Rep. 12(1), p. 969
- [6] Paila U., Chapman B. A., Kirchner R., et al. (2013) PLoS Comput. Biol. 9(7), p. e1003153
- [7] Cacciatori E., Aleo S., Scuvera G., et al. (2022) Ital. J. Pediatr. 48(1), p. 177
- [8] Jaganathan K., Panagiotopoulou S., McRae J. F., et al. (2019) Cell 176(3), p. 535
- [9] Stockley T. L., Mendoza-Londono R., Propst E. J., et al. (2009) Am. J. Med. Genet. A. 149A(3), p. 322
- [10] Sadatomi D., Tanimura S., Ozaki K., et al. (2013) Int. J. Mol. Sci. 14(3), p. 4596

Vplyv atranorínu na hematologické parametre onkologicky chorých experimentálnych zvierat

Lívia Šmalecová

*Spojená katolícka škola sv. Mikuláša, Duklianska 16, 080 01 Prešov, Slovenská republika;
livismal@gmail.com*

Abstract

The effect of atranorin on haematological parameters of experimental animals with oncological diseases

Brain cancer is one of the most aggressive types of cancer. Currently, the chemotherapy drug temozolomide is most often used as treatment, but many patients show a large number of side effects and are resistant to this drug. The search for alternatives and supplements to standard treatment represents a promising contribution to knowledge. We investigated the effect of lichen secondary metabolite - atranorin on the haematological parameters of experimental *Sprague Dawley* rats with chemically induced brain cancer. We divided the animals into five male groups - healthy group, untreated onco males, rats treated with atranorin, temozolomide and their combination (n=6/group). From the results, it is apparent that the levels of erythrocytes, thrombocytes, leukocytes and lymphocytes increased during cancer compared to healthy animals. Atranorin alone and in the combination with temozolomide was able to adjust the levels of monitored parameters to the level of healthy animals. The results show that atranorin in a dose of 10 mg/kg could be a supplement for standard treatment of brain tumours.

Keywords: *atranorin, brain cancer, temozolomid, blood parameters, laboratory rats*

Úvod a formulácia cieľa

Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie dnes počas života čelí diagnóze rakoviny jedna z troch žien a jeden z dvoch mužov [1]. Nádormi mozgu sú označované nádory neuroektodermálneho tkaniva centrálnej nervovej sústavy. Symptómy mozgových nádorov sa delia na celkové a špecifické. Celkové príznaky sú spôsobené tlakom nádoru na mozgové tkanivo alebo miechu. Špecifické príznaky vznikajú zhoršenou funkciou danej časti mozgu, ktorú nádor ovplyvňuje. Ochorenie rakoviny mozgu je prevažne diagnostikované u mužskému pohlavia, najčastejšie sú to deti do 5 rokov a dospelí nad 60 rokov. V detskom veku sú nádory mozgu druhým najčastejším typom nádorového ochorenia, u dospelých sú pomerne vzácné. Prognózy u jednotlivých typov nádorov sa veľmi líšia [1]. Rakovina mozgu vzniká primárne alebo ako metastáza, čo znamená, že je prenesená z iných orgánov. Päťdesiat percent všetkých primárnych nádorov sú astrocytomy (tvorené z astrocytov – buniek nachádzajúcich sa v mozgu), existujú viaceré typy. Mozgový nádor môže byť benígny alebo malígny. Príznaky závisia od lokalizácie nádoru a rýchlosti jeho rastu [2].

V súčasnosti sa ako liečba využíva najčastejšie chemoterapeutikum temozolomid, avšak mnoho pacientov po tejto chemoterapii vykazuje veľké množstvo vedľajších účinkov. Taktiež je veľká časť pacientov na tento liek rezistentná – t. j. neodpovedá na liečbu [2].

Hľadanie alternatív a doplnkov k štandardnej liečbe predstavuje sľubný prínos nových poznatkov a bolo smerovaním mojej práce.

Keďže medzi jednu z prírodných látok, ktorá sa dostáva v súčasnosti do popredia patrí sekundárny metabolit lišajníkov atranorín (ATR), mojím hlavným cieľom výskumu bolo zistiť vplyv ATR na hematologické parametre experimentálnych potkanov s chemicky vyvolanou rakovinou mozgu.

Materiál a metódy

Laboratórne zvieratá

V našom experimente sme pracovali so samcami kmeňa *Sprague Dawley* ($n = 30$) vo veku 30 dní ($275,28 \pm 15,60$ g), ktoré sme rozdelili do piatich skupín: 1) kontrola ($n = 6$), 2) experimentálna neliečená onko skupina ($n = 6$), 3) TMZ experimentálna skupina, 4) ATR experimentálna skupina, 5) kombinácia TMZ+ATR.

Parentálna generácia samíc ($n = 5$) a samcov ($n = 3$) bola použitá na získanie potomstva. Po pripustení samcov k samiciam bol následne samiciam urobený vaginálny ster na zistenie prítomnosti spermií. Trom samiciam bol na 15. deň gravidity intraperitoneálne podaný karcinogén Ethyl-Nitrozou-Urea (ENU) na vyvolanie rakoviny mozgu u potomstva. Dve matky vrhli zdravé potomstvo.

Vo veku 30 dní boli mláďatá oddelené od matiek. Potomstvu ENU matiek bola po dobu jedného mesiaca aplikovaná liečba- ATR (10mg/kg) a TMZ (50mg/kg), rozpustené denne v 10% etanole, *per os*, v svetlej fáze dňa o 14:30. Vybraným skupinám zdravých samcov boli tieto látky podávané tiež, avšak výsledky z týchto zvierat nie sú súčasťou tejto práce.

Odber biologického materiálu

Potkana sme vložili do imobilizačného boxu, aby sa nehýbal. Následne sme chvost vydezinfikovali a nahmatali vėnu. Pred samotným vpichom sme na žilu naniesli vazelinu, aby krv vytvorila kvapku a bola ľahšie zberateľná do mikroskúmavky. Ihlou sme prepichli kožu a dostali sa do žily. Krv sme zbierali do mikroskúmaviek, ktoré sme vložili do veterinárneho hematologického analyzátora EXIGO H400 (Filadelfia, USA). Miesto vpichu sme gázou silno zatlačili, aby sme zastavili krvácanie a aby nevznikli modriny na chvoste potkana.

Analýza a vyhodnotenie

Dáta získané z odberov sme spracovali v programe GraphPad Prism 8.0. V programe sme sa pozreli či sú naše dáta v norme. Použili sme neparametrický ANOVA test. V grafoch sú uvedené priemery za skupiny a smerodajné odchýlky (SD).

Výsledky a diskusia

V dnešnej dobe plnej syntetických liečiv mnohí hľadajú zdravšiu, lepšiu alternatívu. Výnimkou nie je ani rakovina mozgu. Jednou z najnovších alternatív by mohlo byť i použitie sekundárneho metabolitu lišajníkov- ATR. Jeho skúmanie prebieha už niekoľko rokov. Vedci sa zamerali na jeho skúmanie prevažne v *in vitro* podmienkach, práce sa robia s bunkovými kultúrami. Niektoré štúdie naznačili, že by mohol výrazne ovplyvniť nádorové ochorenia [3]. Rozhodli sme sa preto skúmať jeho vplyv na organizmus postihnutý rakovinou mozgu.

ATR doposiaľ pri nádoroch mozgu študovaný nebol. Využili sme malú dávku, ktorá nespôsobuje toxicitu a bola testovaná ako bezpečná [4].

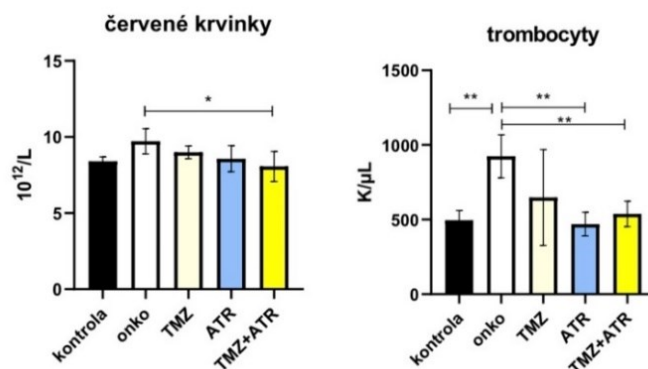
Krv je orgán, skladajúci sa z krvnej plazmy a krvných elementov – červených a bielych krviniek a krvných doštičiek. Keďže nádorový proces je často sprevádzaný zmenami v týchto základných parametroch, rozhodli sme sa sledovať ich hladiny. Bolo zistené, že nádorové bunky mozgu môžu iniciovať erytropoézu, čiže vznik erytrocytov, ako stratégiu rozširovania nádorových buniek [5]. V našom experimente sme zistili, že ATR samostatne dokázal znížiť incidenciu nádorov o 15%, v kombinácii s TMZ o 30% (dáta nie sú súčasťou tejto práce).

V tejto práci sme sa zamerali na štatistické spracovanie hladiny krvných doštičiek (trombocytov), červených a bielych krviniek a lymfocytov ako významnej zložky imunity. Z grafu 1 je vidieť, že stúpol počet červených krviniek potkanov s rakovinou mozgu. ATR, TMZ aj ich kombinácia mierne znížili počet erytrocytov, pričom kombinovaná liečba sa najviac priblížila hodnotám kontrolnej skupiny ($p < 0,05$).

Počas rakoviny sme zaznamenali zvýšený počet krvných doštičiek. Z Obr. 1 je zrejmé, že nastal výrazný nárast trombocytov počas rakoviny ($p < 0,01$). Medzi časté vedľajšie účinky liečby cytostatikom TMZ patrí trombocytopenia [6]. Pokles krvných doštičiek spôsobuje problém v prípade poranenia. V tomto stave sa v tele nenachádza dostatočný počet trombocytov na zastavenie krvácania a uzatvorenie cievy, čo zvyšuje riziko vykrvácania. Na tele sa objavuje mnoho modrín aj pri ľahkom poranení [7]. Pozorovať môžeme aj krvné petéchie. V kritických štádiách je potrebná transfúzia.

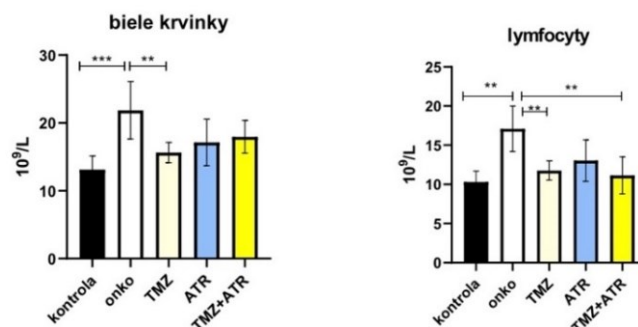
ATR samostatne aj v kombinácii s TMZ dokázal znížiť hladinu trombocytov v krvi zvierat ($p < 0,01$). Zvýšený počet krvných doštičiek je nebezpečný, pretože môže spôsobiť trombózu [7]. Je známe, že pri rakovine mozgu nádorové bunky komunikujú s trombocytmi, a preto je tento proces sprevádzaný zvýšeným množstvom trombocytov [5].

V našom experimente TMZ výrazne znížil počet trombocytov v porovnaní s onko zvieratami, avšak nepozorovali sme nijaké výrazné zníženia oproti kontrolám, takže usudzujeme, že sme nepozorovali vedľajší účinok liečby.



Obr. 1. Množstvo červených krviniek a trombocytov po liečbe. Hodnoty sú uvedené ako aritmetický priemer $\pm$ SD. Signifikancia medzi skupinami onko a TMZ+ATR $*p<0,0$ (erythrocyty). Signifikancia medzi skupinami kontrola a onko $**p<0,01$, onko a ATR je $**p<0,01$, a onko a TMZ+ATR $**p<0,01$ (trombocyty).

K nárastu bielych krviniek v tele dochádza najmä v pokročilých štádiách rakoviny, keď sa nádor začne nekontrolovateľne šíriť a dochádza k metastázovaniu. Vtedy telo začne bojovať s rakovinovými bunkami zvýšeným počtom bielych krviniek [8]. Podobne sa zvýšil aj počet lymfocytov. Proces rakoviny je sprevádzaný výšenou imunitnou odpoveďou, ktorá sa prejaví zvýšením hladiny lymfocytov [8]. Počas rakoviny mozgu hladina bielych krviniek v krvi narastá ($***p<0,001$; Obr. 2). TMZ spôsobil pokles bielych krviniek v porovnaní s neliečenými onkologickými samcami ($**p<0,01$). Frakcia lymfocytov taktiež zaznamenala nárast počas nádorov ($**p<0,01$). TMZ samostatne, ale i v kombinácii s ATR výrazne znížili hladinu lymfocytov počas rakoviny mozgu ($**p<0,01$).



Obr. 2. Množstvo bielych krviniek a lymfocytov po liečbe. Hodnoty sú uvedené ako aritmetický priemer $\pm$ SD. Signifikancia medzi skupinami kontrola a onko $***p<0,001$, onko a TMZ $**p<0,01$ (biele krvinky). Signifikancia medzi skupinami kontrola a onko $**p<0,01$, onko a TMZ je $**p<0,01$, a onko a TMZ+ATR $**p<0,01$ (lymfocyty).

Solár a kolektív skúmali ATR v dávke 30mg/kg hmotnosti počas nádorov prsníka myši [3]. Dávka sa síce niekoľkonásobne líšila, ale v porovnaní s našim podávaním po dobu jedného

mesiaci oni podávali iba 10 dní. ATR nepôsobil toxicky na pečeň, a dokázal znížiť počet nádorových buniek.

Je možné povedať, že ATR by mohol byť využitý ako vhodná alternatíva pri liečbe nádorov mozgu.

Záver

ATR je prírodná látka s dokázanými biologickými účinkami. Cieľom nášho experimentu bolo pozorovať vplyv mesačného podávania ATR (samostatne a v kombinácii s TMZ) v dávke 10 mg/kg hmotnosti na vybrané hematologické parametre laboratórnych potkanov s chemicky indukovanou rakovinou mozgu. V budúcnosti by sa táto látka mohla využívať ako účinný a šetrnejší liek, prípadne doplnok k štandardnej liečbe rakoviny mozgu.

PodĎakovanie

Veľmi pekne ďakujem mojim školiteľkám RNDr. Miriam Feretovej a RNDr. Terézii Kiskovej, PhD. za sprostredkovanie experimentu na Univerzite Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, za ich ochotu, pomoc a cenné rady, ktoré mi poskytli pri realizácii tejto práce.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Council C. (1995) Cancer Council Australia
- [2] Rouse C., Gittleman H., Ostrom Q. T., et al. (2016) *Neuro. Oncol.*, 18(1), p. 70
- [3] Solár P., Hrčková G., Koptašíková L., et al. (2016) *Chem. Biol. Interact.*, 250, p. 27
- [4] Simko P., Leskanicova A., Suvakova M., et al. (2022) *Life*, 12(7), p. 1090
- [5] Nolte I., Przibylla H., Bostel T., et al. (2008) *Clin. Neurol. Neurosurg.*, 110(4), p. 339
- [6] ADC. *Temozolomide Accord.* (2022) Available from: <https://www.adc.sk/databazy/produkty/detail/temozolomide-accord-100-mg-935930.html>
- [7] TvojeZDRAVIE.sk. (2023) Available from: <https://www.tvojezdravie.sk/zdravie-a-prevenicia/trombocyty/25999>
- [8] Kam.za.krasou. (2023) Available from: <https://www.kamzakrasou.sk/lifestyle/zdravie/leukocytoza/26017>

***Candida auris* mannan from cultivation on Shibata medium**

Apoorva Soni^{1,2}, Romana Vrzoňová², Janka Mečárová-Valáriková², Pavol Farkaš²

¹*Slovak University of Technology in Bratislava, Institute of Biochemistry and Microbiology, Radlinského 9 812 37 Bratislava, Slovak republic; chemsoni@savba.sk*

²*Institute of Chemistry of Slovak Academy of Sciences, v. v. i., Department of Immunochemistry of Glycoconjugates, Dúbravská cesta 9, 845 36 Bratislava, Slovak republic*

Abstract

Candida auris, an emerging multidrug-resistant yeast pathogen, is responsible for numerous high-mortality healthcare-associated outbreaks worldwide. In addition, *C. auris* rapid spread is linked to the successful colonization of human skin, leading to bloodstream infections. *C. auris* mannan is different from other pathogenic *Candida* species in its abundance of β -1,2-Man-linkages. The mannans are potent immunogens, and as such, the structure of the mannans and their epitopes have significant relevance to pathogenesis. Here we extracted the mannan from *C. auris* and characterized it using NMR, FTIR techniques to understand and analyze the structural differences at 37 °C. We have compared the mannan at 28 °C and 37 °C by FTIR, where we have found no significant differences. However, from TOCSY-NMR we can assume that: 1, both mannans have the same structural parts, 2, the mannans have altered relative abundance of branches.

Keywords: *Candida auris*; Mannan; Cultivation; Shibata medium; NMR; FTIR

Introduction and Objectives

Candida auris, a critical emerging fungal pathogen, was firstly described in 2009 and has since spread across six continents as a causative microorganism of hospital-acquired infections [1]. *C. auris* is one of the most challenging emerging human pathogens discovered in the last decade for various reasons. It is highly resistant to many commonly used antifungal drugs and has spread rapidly worldwide in just a few years [2]. *C. auris* complicates routine microbiological identification and is difficult to eradicate in healthcare settings. This is due to its ability to colonize the skin, spread via the patient-to-patient route or contaminated fomites, and high survival on plastic surfaces and in the hospital environment [3]. *C. auris* infections are generally associated with the same risk factors as other types of *Candida* infections, such as prolonged hospitalization, exposure to broad-spectrum antibiotics or antifungal agents [4]. Surprisingly, despite chlorhexidine washing, *C. auris* colonization of human skin is challenging to eliminate with its resistance to ethanol and other disinfectants and finish with the necessity to use very strong bleach (10 % NaOCl) and the remarkable persistence of the infection on inanimate surfaces in hospitals and nursing homes necessitates using bleach as the disinfectant [5]. Even with washing, alcohol, and disinfectants containing iodine, *C. auris* adheres firmly to the skin, eliminating numerous other organisms that generally comprise a healthy microbiome. It is unknown which proteins or tissues *C. auris* interacts with once inside

the body. The need for further study to understand the mechanism of its infection, with an emphasis on the role of its cell wall in its pathogenicity.

Nearly every element of the biology and pathogenicity of pathogenic yeasts depends on the cell wall, which is the outer layer of the organism and contains over 60 % carbohydrates. *N*- and *O*-linked mannans with α -1,2-, α -1,3-, α -1,6-, and β -1,2-linked mannopyranose units and phospho-linked mannopyranose units make up the components of cell wall mannoproteins [6]. These mannoproteins are potent immunogens that, during candidiasis, activate and regulate the host innate immune response via the mannose receptor, DC-SIGN (dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3 (ICAM-3) grabbing nonintegrin), and Dectin-2 [7]. Glycan structures vary among different *Candida* species. *Candida* mannans and mannoproteins are potent immunogens and proper vaccines in animal models of candidiasis. A further diagnostic marker for invasive *Candida* infections is fungus mannan antigenemia. The *Candida* cell wall is divided into two layers: an outer layer of highly mannosylated proteins (mannoproteins) and an inner layer made up primarily of β -1,3-, β -1,6-glucans, and chitin [8]. However, the cell wall, mannoproteins, mannans, and glycome of *C. auris* still need to be better understood [9].

Our goal of this work is to analyze the changes in the structure of *C. auris* mannan from cultivation at 37 °C in Shibata medium. The structure of mannan in *C. albicans* yeast and hyphal form (the most common morphological state at 37 °C, similar to human body) is different, we investigate whether the similar structural change of mannan is fundamental for *C. auris*.

Materials and methods

Strains and media

Candida auris (CBS 15279, Belgium) strain was taken directly from the frozen stock and passaged on YPD (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % dextrose, 2 % agar) plate media at and 37 °C. Cells were passaged at shibata medium (2 % glucose, 0.25 % (w/v); K₂HPO₄, 0.05 % (w/v) NaNO₃, 0.1 % (w/v) L-methionine, 0.05 % (w/v) L-phenylalanine, 0.05 % (w/v) *N*-acetyl-D-glucosamine, 0.5 ng/mL D-biotin; pH 7.5) for 48 h. And the first cultivation was done in 250 mL × 2 (500 mL) of the medium while the second cultivation was done by passaging the cells in 100 mL shibata for 24 h at 37 °C and then cultivated in 4 × 300 mL of Shibata medium. For the mannan extraction, cells were inoculated in the liquid Shibata medium at 37 °C at 120 RPM.

Mannan extraction

Mannan was isolated from cells using a modified extraction procedure [10]. Thus, the *C. auris* biomass was suspended in 0.2 M NaCl and autoclaved 3 × for 1 h. Each time the supernatant was collected. Then the mannoprotein was precipitated using 3 vol. of EtOH. Pellet was suspended in H₂O and then dialyzed with 2 % KOH. Then the supernatant was saved and subjected to Fehling's reagent for precipitation. The resulting precipitate was then dialyzed again with 3 M HCl and methanol + acetic acid. After the sample was lyophilized, we obtained product designed as mannan-37.

FTIR analysis

Samples were prepared after isolation of mannan and the lyophilized sample was directly measured on NICOLET Magna 6700 (Thermo Fisher Scientific, USA) spectrometer with DTGS detector and an experimental accessory – Smart Orbit, and OMNIC 8.0 software was used. Infrared spectral analyses were carried out in the mid-infrared region (from 4000 cm⁻¹ to 400 cm⁻¹), and spectral data obtained were presented as absorbance values. The number of scans was set to 128. Diamond Smart Orbit ATR accessory was used for measurements in the solid state.

NMR Spectroscopy

After being dissolved in 500 µL of D₂O (99.97 % D), the samples were lyophilized to substitute the exchangeable protons with deuterium and then transferred to NMR microtubes. NMR spectra results were recorded in ¹H NMR and ¹H–¹H 2D TOCSY spectra at 45 °C on a Bruker AVANCE III HD X 600 MHz spectrometer (Bruker TopSpin, Rheinstetten, Germany) equipped with a triple inverse TCI H-C/N-D-05-Z liquid He-cooled cryoprobe and processed using MeStreNova 14 software. The ¹H signal of acetone (2.217 ppm) was used as a reference for chemical shifts. After processing the mannan NMR spectra, structural alterations were identified by comparing the assigned peak intensities. The ranges are height adjusted to each spectrum's highest peaks for each pair of comparisons.

Result and discussion

Growth of cells

On YPD media with 2 % agar, *C. auris* produces smooth and white cream-colored colonies. *C. auris* cells appear to have a small morphology under a microscope without forming pseudohyphae (see Fig. 1). On the other hand, it may exhibit a variety of morphological phenotypes under different culture conditions, including round-to-ovoid, elongated, and pseudohyphal-like forms [11]. Overnight growth in 500 mL and 1,2 L of medium was required

to extract enough mannan for analysis. Whereas, yield of mannan recover 0.4 mg from the first cultivation and 19.2 mg from the second cultivation (mannan-37).

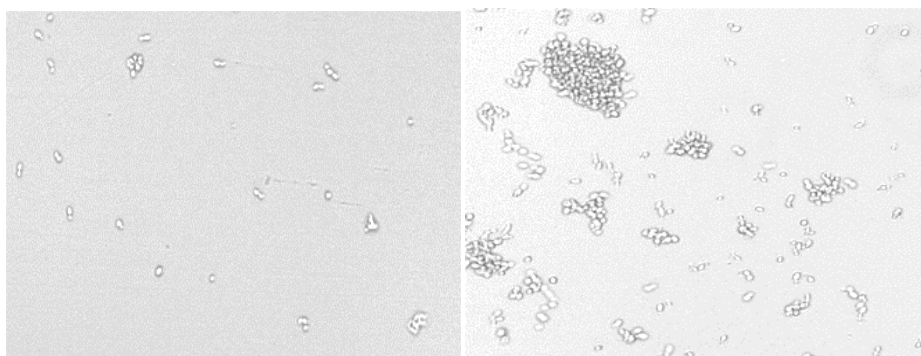


Fig. 1. Growth of *C. auris* in shibata medium at 37 °C for 48 h. under microscope. Cells growth of 1st cultivation (a), cells growth of 2nd cultivation (b).

Fourier-transform infrared spectroscopy

FTIR spectroscopy is a valuable instrument for monitoring structural changes in biopolymers. We used this method to compare mannans from *C. auris* cultivated at 28 °C and 37 °C in the 1600–1700 cm^{-1} range and the anomeric region is from 840–860 cm^{-1} . Fig. 2. shows the FTIR spectra of the obtained mannans. The main difference is presence of the ester band at 1737 cm^{-1} in mannan from cultivation on Shibata medium at 37 °C. Amide I band of the mannan assignment with influential bands (stretching vibration of C=O at 1650 cm^{-1}). The maximum band at 1015 cm^{-1} is in the specific region for C—O, C—C, and ring vibration stretching vibration (866–1188 cm^{-1}) carbohydrates assignments. The bands at 850 cm^{-1} in the anomeric region are unique for α -1,2-mannans. No other or major changes were found.

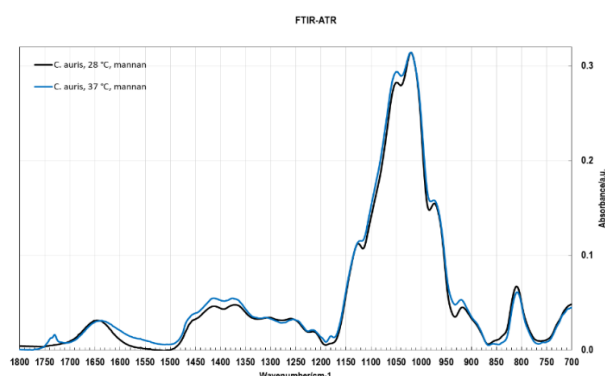


Fig. 2. FTIR spectra of the mannans of *C. auris* cultivated at 28 °C and 37 °C.

NMR spectroscopy (Nuclear Magnetic Resonance)

The sequential assignment of the H-1 and H-2 signals was performed using TOCSY NMR experiment. Although spectra showed different side-chain lengths containing α -1,2-mannose, α -1,3-mannose, and β -1,2-mannoses. Cross peak at 5.35 ppm in ^1H spectrum of the mannan-37 indicated traces of phosphate-linked side chain. If we compare our results to the standard cultivation, $\text{Man}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2$ epitopes are appr. 7 % of all mannoses present, but in case of mannan-37, they are 12 %. $\text{Man}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2$ epitopes decreased from 4 % to 2 % for standard mannan and mannan-37, respectively. Also, under standard cultivation mannose units are presented more often as branches as main chain. Unlike in *C. albicans* species, where under such conditions hyphae are formed, and resulting mannans are lack of $\beta 1 \rightarrow 2$ epitopes, here are these epitopes preserved.

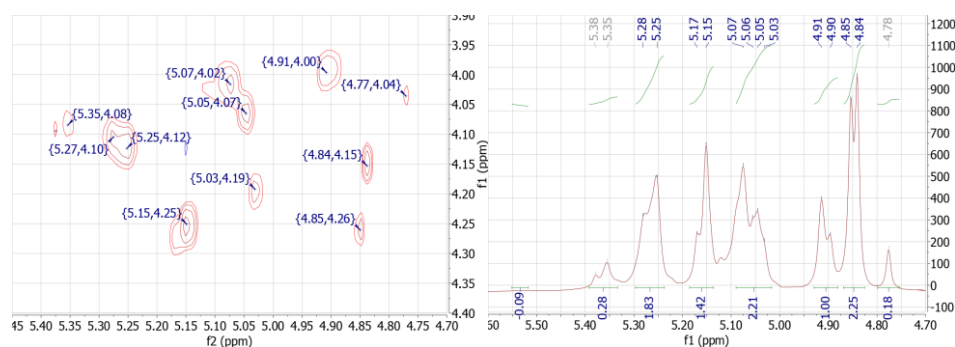


Fig. 3. TOCSY NMR experiment on mannan-37, from *C. auris* cultivated at 37 °C in Shibata medium.

Conclusion

In presented research we concluded that it is difficult to yield the satisfactory amount of mannan within cultivation at 37 °C. Data interpretation after FTIR, NMR analysis did not show crucial differences of mannans structures, only some alternation in relative epitopes abundance. This fact is intriguing because other species, e.g., *C. albicans*, transform the mannan structure substantially. In the future, we extend our findings by further independent experiments and provide a prerequisite for gaining unknown insights into the carbohydrate of *C. auris* factors of virulence.

Acknowledgments

This publication is the result of the project implementation CEMBAM – Centre for Medical Bio-Additive Manufacturing and Research, ITMS2014+: 313011V358 supported by the Operational Programme Integrated Infrastructure funded by the European Regional

Development Fund. We would like to thank to our technician Barbora Alföldyová for helping with experimental work.

References

- [1] Meis J. F., Chowdhary A. (2018) *Lancet Infect. Dis.* 18(12), p. 1298
- [2] Clancy C. J., Nguyen M. H. (2016) *Clin. Infect. Dis.*, 64(2), p. 141
- [3] Welsh R. M., Bentz M. L., Shams A., et al. (2017) *J. Clin. Microbiol.*, 55(10), p. 2996
- [4] Rudramurthy S. M., Chakrabarti A., Paul R. A., et al. (2017) *J. Antimicrob. Chemother.* 72(6), p. 1794
- [5] Kenters N., Kiernan M., Chowdhary A., et al. (2019) *Int. J. Antimicrob. Agents.* 54(4), p. 400
- [6] Lufeng Yan., Ke Xia., Yanlei Yu., et al. (2020) *ACS Infect. Dis.* 6 (5), p. 1018
- [7] Cambi A., Netea M. G., Mora-Montes H. M., et al. (2008) *J. Biol. Chem.* 283(29), p. 20590
- [8] Erwig L. P., Gow N. A. R. (2016) *Nat. Rev. Microbiol.* 14(3), p. 163
- [9] Sendid B., Poirot J. L., Tabouret M., et al. (2002). *Int. J. Med. Microbiol.* 51(5), p. 433
- [10] Bruno M., Kersten S., Bain J. M., et al. (2020). *Nat. Microbiol.* 5(12), p. 1516
- [11] Du H., Bing J., Hu T., et al. (2020). *PLoS Pathog.* 16(10), e1008921

Degradácia latentných odtlačkov prstov a environmentálne faktory, ktoré ju spôsobujú – upotrebitel'nosť latentných odtlačkov prstov

Michal Soták, Mária Chovancová, Petra Švábová

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra antropológie,
Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; msot7799@gmail.com*

Abstract

Degradation of latent fingerprints and environmental factors causing it - sufficient number of minutiae on latent fingerprints

Latent fingerprints contain several specific features that help with personal identification. This type of evidence is affected by environmental factors on a daily basis. With crime on the rise, it is important to have as much knowledge as possible about this issue to increase the chance of identifying as many offenders as possible. Significant differences were found among specific environmental factors in sufficient number of minutiae on degraded latent fingerprints. The following environmental factors were observed: light, snow, stagnant water, and freeze. The highest percentage of fingerprints with sufficient number of minutiae was found under the light conditions. The highest percentage of fingerprints with insufficient number of minutiae was found in snow into which the object had been forcibly placed.

Keywords: *criminalistics; fingerprint degradation; sufficient number of minutiae*

Úvod a formulácia cieľa

Nemennosť je základnou charakteristikou odtlačkov prstov. Na distálnych článkoch prstov sú prítomné identifikačné markery 1., 2. a 3. úrovne. Identifikačné markery 2. úrovne (minúcie) sú charakteristiky, ktoré pomenúvajú rôzne plynutia a deformácie papilárnych línií. Minúcie spolu s ostatnými identifikačnými markermi nás utvrdzujú v tom, že majú veľkú identifikačnú hodnotu. V slovenskej dermatoglyfickej praxi sa používa klasifikácia podľa Gutiérrez et al. (2007). Na Slovensku je na identifikáciu osoby potrebný odtlačok, ktorý považujeme za upotrebitel'ný vtedy ak obsahuje 10 a viac minúcií. Čiastočne upotrebitel'né odtlačky prstov majú sedem až deväť minúcií. Neupotrebitel'né odtlačky prstov majú menej ako sedem minúcií [1 – 3].

Degradácia latentných odtlačkov prstov vplyvom environmentálnych faktorov znemožňuje identifikáciu jedincov. Environmentálne faktory kvalitatívne degradujú latentné stopy. Vplyvom jednotlivých faktorov sa latentné odtlačky prstov dokážu zmeniť až na úroveň, kedy ich nie je možné zviditeľniť a vyhodnotiť [4].

Cieľom tejto práce bolo detailne vyhodnotiť počet minúcií na degradovaných latentných odtlačkoch distálnych článkov prstov a určiť upotrebitel'nosť odtlačkov prstov v rámci vplyvov jednotlivých environmentálnych faktorov. Prínosom tejto práce je využitie vo

forenznej praxi pri identifikovaní páchatel'a, nakoľko predmety, ktoré boli použité pri páchaní trestného činu sú neustále vystavované rôznym environmentálnym podmienkam.

Materiál a metódy

Súbor tvorilo 1272 latentných odtlačkov papilárneho terénu distálnych článkov prstov jedného probanda zo slovenskej populácie odoberané v rokoch 2021 až 2023, ktoré boli vystavené vplyvu vybraných environmentálnych faktorov. Pozorovali sme vplyv vody, priameho slnečného žiarenia, mrazu a snehu v rôznych časových intervaloch. Časové intervaly odberu degradovaných latentných odtlačkov prstov od ich vystavenia jednotlivým environmentálnym faktorom, priemerné teploty prostredia a vody a priemerná hodnota intenzity osvetlenia sú uvedené v Tabuľke 1.

Tab. 1. Časové intervaly odberu degradovaných latentných odtlačkov prstov od ich vystavenia jednotlivým environmentálnym faktorom a charakteristiky environmentálnych faktorov

Legenda: ČI – Časový interval odberu degradovaných latentných odtlačkov prstov od ich vystavenia jednotlivým environmentálnym faktorom, PT – priemerná teplota prostredia/vody, LUX – Priemerná hodnota intenzity osvetlenia, Sneh (NVP) – Sneh (násilne vložený predmet), Sneh (OM) – Sneh (opakované meranie)

Voda	ČI	1. hodina	2. hodina	1. deň	2. deň	5. deň	10. deň	
	PT	3,00 °C	3,00 °C	4,75 °C	5,57 °C	7,50 °C	8,58 °C	
Svetlo	ČI	1. týždeň	2. týždeň	3. týždeň	4. týždeň	5. týždeň	6. týždeň	7. týždeň
	LUX	7504	7471	7558	7550	7524	7538	7586
Mráz	ČI	16. hodina	1. deň					
	PT	-3,88 °C	-3,80 °C					
Sneh (NVP)	ČI	2. hodina	12. hodina	1. deň	2. deň			
	PT	0,50 °C	-1,83 °C	-1,92 °C	-1,80 °C			
Sneh	ČI	2. hodina	12. hodina	1. deň				
	PT	-2,50 °C	-2,25 °C	-1,79 °C				
Sneh (OM)	ČI	2. hodina	12. hodina	1. deň				
	PT	-2,00 °C	-3,33 °C	-2,75°C				

Latentné odtlačky prstov boli zanechané na sklenených tabuliach formátu A4. Na zviditeľňovanie latentných stôp sme používali magnetický strieborno-šedý Hi-fi daktyloskopický prášok a činidlo s malými časticami (SPR – small particle reagent). Zviditeľnené latentné stopy boli zaistené lepiacou páskou a po zaistení boli odtlačky skenované pri rozlíšení 1 200 dpi. Naskenované odtlačky prstov boli vyhodnotené v programe Preview 11.0 (1048) Apple Inc.. Vyhodnocované boli počty minúcií na kontrolnej vzorke a na degradovaných latentných odtlačkoch prstov v rôznych časových intervaloch. Vyhodnotené latentné odtlačky boli rozdelené do troch kategórií na základe počtu minúcií: upotrebitel'né odtlačky prstov (10 a viac minúcií), čiastočne upotrebitel'né odtlačky prstov (7 – 9 minúcií) a neupotrebitel'né odtlačky prstov (menej ako 7 minúcií) [3]. Na získanie spracovaných údajov

sme použili MS Office Excel 2023. V IBM SPSS Statistics 26 sme vykonali len filtrovanie dát, aby sme si jednotlivé odtlačky rozdelili na upotrebitel'né, čiastočne upotrebitel'né a neupotrebitel'né.

Výsledky a diskusia

Upotrebitel'nosť degradovaných latentných stôp v rámci jednotlivých faktorov

Boli pozorované rozdiely pri porovnaní percentuálneho vyjadrenia upotrebitel'nosti latentných odtlačkov prstov, ktoré vznikli vplyvom jednotlivých environmentálnych faktorov (Tab. 2). Pri hodnotení upotrebitel'nosti odtlačkov prstov, sme zistili, že najviac upotrebitel'ných odtlačkov bolo vyhodnotené na latentných stopách, ktoré boli vystavené priamemu slnečnému žiareniu. Vplyvom pomalej degradácie latentných odtlačkov prstov, ktoré boli vystavené svetlu nedošlo k takej silnej degradácii, aby boli odtlačky prstov nepoužitel'né na osobnú identifikáciu. Vodné prostredie malo negatívny vplyv na latentné odtlačky prstov, napriek tomu bolo vyhodnotené väčšie percento upotrebitel'ných odtlačkov prstov. Dôvodom pomerne väčšieho percenta upotrebitel'ných odtlačkov prstov, ktoré boli vystavené mrazu je, že latentné odtlačky prstov boli zafixované chladným prostredím, ktorému boli vystavené. Najväčšie percento neupotrebitel'ných odtlačkov prstov bolo vyhodnotené na latentných stopách, ktoré boli vystavené snehu, pričom boli do neho násilne vložené. Dôvodom bolo mechanické odstránenie latentných odtlačkov prstov pri vkladaní sklenených tabúl' do snehu. Sneh, ktorý nasnežil na sklenenú tabuľu s latentnými odtlačkami prstov mal v oboch meraniach podobné výsledky upotrebitel'nosti odtlačkov prstov.

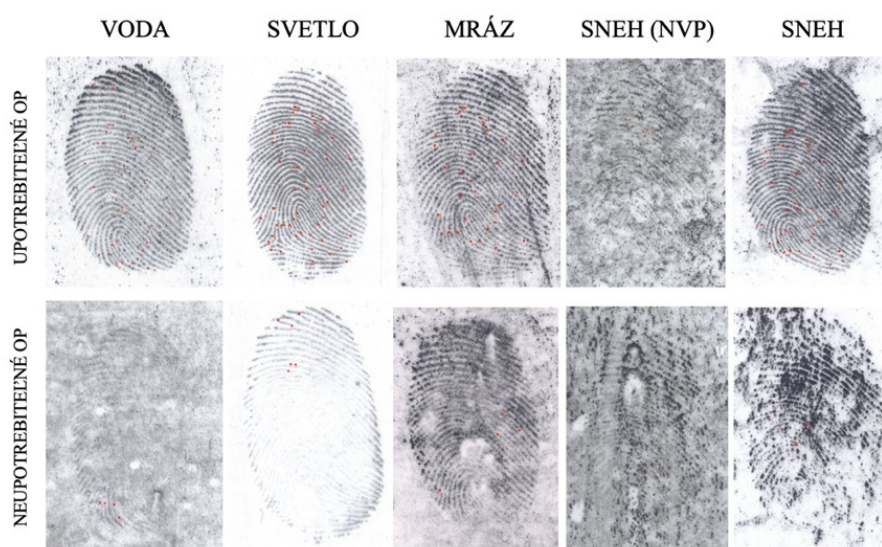
Tab. 2. Percentuálne vyjadrenie upotrebitel'ných, čiastočne upotrebitel'ných a neupotrebitel'ných degradovaných latentných odtlačkov prstov v rámci jednotlivých environmentálnych faktorov

Legenda: Upotrebitel'né OP – upotrebitel'né odtlačky prstov, Čiastočne upotrebitel'né OP – čiastočne upotrebitel'né odtlačky prstov, Neupotrebitel'né OP – neupotrebitel'né odtlačky prstov Sneh (NVP) – sneh (násilne vložený predmet), Sneh (OM) – sneh (opakované meranie)

	Upotrebitel'né OP	Čiastočne upotrebitel'né OP	Neupotrebitel'né OP
Voda	71,71 %	6,57 %	21,71 %
Svetlo	98,81 %	1,19 %	0,00 %
Mráz	77,78 %	6,94 %	15,28 %
Sneh (NVP)	0,00 %	1,88 %	98,13 %
Sneh	37,14 %	9,52 %	53,33 %
Sneh (OM)	31,37 %	11,76 %	56,86 %

Porovnanie degradovaných latentných odtlačkov prstov medzi jednotlivými faktormi

Porovnanie upotrebitelných a neupotrebitelných odtlačkov prstov, ktoré boli vystavené environmentálnym faktorom je znázornené na Obrázku 1. Minimálne rozdiely sme pozorovali medzi vplyvom vodného prostredia a mrazu. Percento upotrebitelných, čiastočne upotrebitelných a neupotrebitelných odtlačkov prstov je takmer rovnaké medzi obidvomi faktormi (Obr. 2). Trapecar (2012) vo svojej štúdii uvádza, že latentné odtlačky prstov vystavené vodnému prostrediu sú vhodné na osobnú identifikáciu avšak je zrejmé, že dĺžka pôsobenia vody na odtlačky prstov má negatívny vplyv. Môžeme predpokladať, že latentné stopy a ich substancie sa v týchto prostrediach správajú približne rovnako. Taktiež môžeme konštatovať, že latentné odtlačky prstov dokážeme zviditeľniť a použiť pri osobnej identifikácii aj pri ich vystavení nízkej teplote [5 – 6].

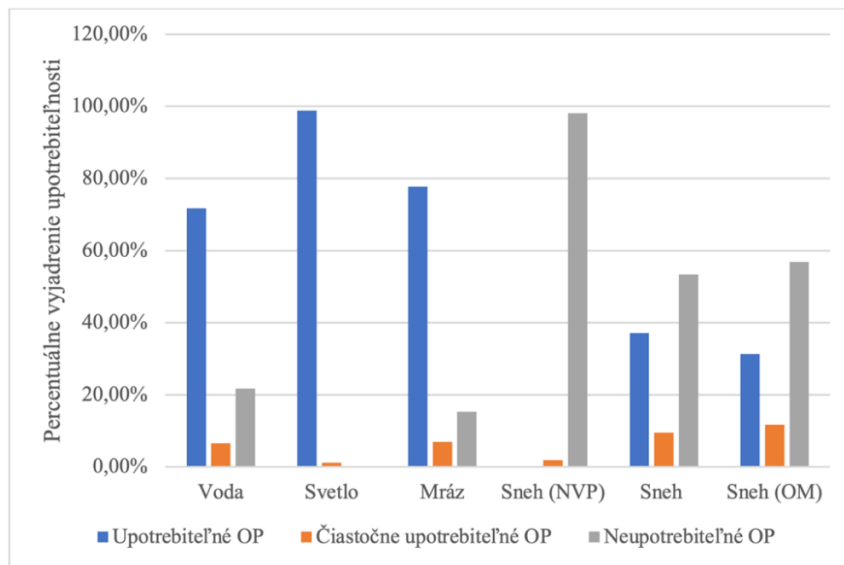


Obr. 1. Porovnanie upotrebitelných a neupotrebitelných degradovaných odtlačkov prstov jednotlivými environmentálnymi faktormi

Legenda: Upotrebitelné OP – Upotrebitelné odtlačky prstov, Neupotrebitelné OP – Neupotrebitelné odtlačky prstov, Sneh (NVP) – Sneh (násilne vložený predmet)

Výrazne rozdiely sme nepozorovali pri snehu a pri opakovanom meraní snehu (Obr. 2). Bol vyhodnotený približne rovnaký počet odtlačkov prstov v kategóriách upotrebitelných, čiastočne upotrebitelných a neupotrebitelných odtlačkov prstov v obidvoch meraniach. Latentné stopy boli zanechané na sklenených tabuliach v takmer identických podmienkach. Pri porovnaní s vodou alebo mrazom pozorujeme zvýšený počet neupotrebitelných odtlačkov prstov po vystavení tomuto faktoru. Na základe výsledkov je zrejmé, že dĺžka pôsobenia snehu má negatívny vplyv na latentné odtlačky prstov. McCook et al. (2016) vo svojej štúdii uvádzajú, že aj napriek nízkej kvalite, je možné použiť odtlačky prstov, ktoré boli vystavené

snehu na osobnú identifikáciu. Po zviditeľnení latentných stôp sme pozorovali minimálny počet minúcií na väčšine odtlačkov prstov. Po vyhodnotení počtu minúcií sme zistili, že je zvýšené percento neupotrebitelných latentných odtlačkov prstov [6 – 7].



Obr. 2. Porovnanie upotrebitelnosti latentných odtlačkov prstov v rámci jednotlivých environmentálnych faktorov

Legenda: Upotrebitelné OP – Upotrebitelné odtlačky prstov, Čiastočne upotrebitelné OP – Čiastočne upotrebitelné odtlačky prstov, Neupotrebitelné OP – Neupotrebitelné odtlačky prstov, Sneh (NVP) – Sneh (násilne vložený predmet), Sneh (OM) – Sneh (opakované meranie)

Extrémne rozdiely pozorujeme pri vystavení latentných stôp priamemu slnečnému žiareniu a pri násilnom vložení latentných odtlačkov prstov do snehu (Obr. 2). Potenciálne výsledky degradácie latentných stôp sú vysoko závislé od environmentálnych faktorov. Priame slnečné žiarenie nemalo takmer žiadny vplyv na kvalitu latentných stôp. Bol vyhodnotený vysoký počet upotrebitelných latentných stôp. Dôvodom je, že svetelná degradácia latentných stôp prebieha po dlhšom časovom období. De Alcaraz-Fossoul et al. (2016) vo svojej štúdii uvádzajú, že vystavenie latentných odtlačkov prstov priamemu slnečnému žiareniu nespôsobuje vysoký stupeň degradácie [4]. Bol vyhodnotený minimálny počet čiastočne upotrebitelných a neupotrebitelných odtlačkov prstov. Sneh mal na latentné odtlačky prstov negatívny vplyv. Najväčší počet neupotrebitelných odtlačkov prstov bol vyhodnotený na predmete, ktorý bol násilne vložený do snehu. Počet odtlačkov, ktoré boli čiastočne upotrebitelné a upotrebitelné bol minimálny. Dôvodom veľkého počtu neupotrebitelných odtlačkov prstov je mechanické odstránenie latentných stôp. McCook et al. (2016) vyhodnotili, že na predmete násilne vloženom do snehu, na ktorom boli zanechané latentné stopy, boli

rozdiely v porovnaní s povrchom, na ktorý nasnežilo. Tieto výsledky sa nám podarilo potvrdiť aj v našom výskume. Pre porovnanie, upotrebitelných odtlačkov prstov, ktoré boli vystavené priamemu slnečnému žiareniu bolo vyhodnotených 98,81 %. Neupotrebitelných odtlačkov prstov, ktoré boli zanechané na predmete a boli násilne vložené do snehu bolo vyhodnotených 98,13 % [7].

Záver

Pri výskume boli zistené rozdiely upotrebitelnosti odtlačkov prstov, ktoré boli vystavené jednotlivým environmentálnym faktorom. Najviac degradované latentné odtlačky prstov boli tie, ktoré boli zanechané na neporéznom povrchu násilne vloženom do snehu. Neupotrebitelných odtlačkov bolo 98,13 %. Vystavenie latentných odtlačkov snehu priamemu slnečnému žiareniu nemalo žiadny vplyv na ich kvalitu. Bol vyhodnotený najväčší počet upotrebitelných odtlačkov prstov. Opakované merania vystavenia latentných stôp snehu, ktorý na predmet so zanechanými odtlačkami nasnežil, mali takmer rovnaké výsledky. Zistili sme, že voda a mráz majú približne rovnaké deštruktívne účinky na kvalitu latentných odtlačkov prstov. Medzi týmito faktormi neboli zistené výrazné rozdiely v upotrebitelnosti latentných stôp. Výsledky a zistenia tejto štúdie môžu byť prínosom vo forenzej praxi, pri vyhodnocovaní latentných odtlačkov prstov, na ktoré pôsobili environmentálne faktory. Považujeme za dôležité aby sa v tejto štúdii pokračovalo a analyzovala sa upotrebitelnosť degradovaných latentných stôp na väčšej skupine probandov.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Gutiérrez E., Galera V., Martínez J. M., et al. (2007) Forensic Sci. Int. 172(2-3), p. 98
- [2] Polák P., Kubala J. (2010) Repertórium kriminalistiky. Wolters Kluwer (Iura Edition), Bratislava, p. 24
- [3] Šimovček I., Fedorovičová, I., Jalč A. (2011) Kriminalistika. Vydavateľstvo a nakladateľstvo Aleš Čeňek, Plzeň, Česká republika, p. 87
- [4] De Alcaraz-Fossoul J., Patris C. M., Feixat C. B., et al. (2016) J. Forensic Sci. 61(2), p. 322
- [5] Longchar T., Rarh V., Vashisth S., et al. (2019) Int. J. Chem. Stud. 7(3), p. 2094
- [6] Trapecar M. (2012) Egypt. J. Forensic Sci. 2, p. 48
- [7] McCook S. J., Tate D. P., Eller J. B. (2016) J. Forensic Identif. 66(6), p. 577

Predikcia telesnej výšky z rozmerov rúk a ich odtlačkov u jedincov zo slovenskej populácie

Romana Stanková, Michaela Dörnhöferová

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra antropológie,
Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; stankova58@uniba.sk*

Abstract

Prediction of stature from dimensions of hands and handprints in individuals from Slovak population

The aim of our research was to find out the relationship between stature and the dimensions of the hand and handprint and based on this relationship to create regression equations for estimating stature in the Slovak population. In addition, the aim was to assess the variability of hand dimensions, that is, to detect intersex and bilateral differences and differences between the dimensions of the hand and handprint. The group consisted of 215 individuals from Slovakia (125 women and 90 men) aged 18-30. Following the measurement of stature, 22 measurements were taken on each hand and its corresponding handprint. Hand dimensions and handprint dimensions showed a positive correlation with stature. Based on these results, linear regression equations were created to estimate stature from hand dimensions and handprint dimensions. This research provides new forensic standards for the estimation of stature in the Slovak population and also demonstrates that the measurement and analysis of handprints affords a new source of profiling data that is statistically quantified.

Keywords: *hand dimensions; handprints; stature; correlation; regression analysis*

Úvod a formulácia cieľa

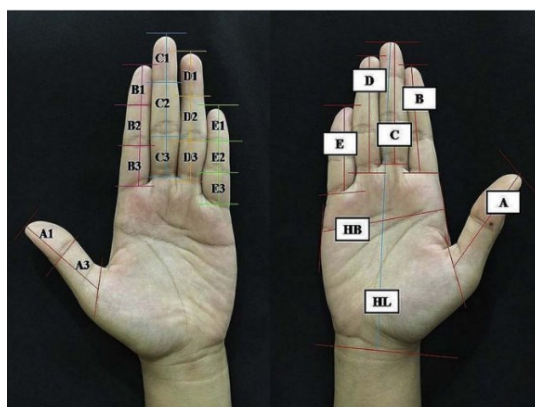
Identifikácia jedinca zohráva veľmi dôležitú úlohu vo forenznej oblasti, pri vyšetrovaní miesta činu a vo forenznej antropológii. Konkrétne telesná výška má veľký význam pri určovaní biologického profilu jedinca a predstavuje jeden zo štyroch hlavných parametrov, ktoré sú dôležité pri identifikácii, spolu s vekom, pohlavím a etnickou príslušnosťou. Odhad telesnej výšky prostredníctvom ľudských pozostatkov je založený na princípe, že medzi telesnou výškou a rôznymi časťami ľudského tela existuje lineárny vzťah. Nedávna literatúra ukázala, že rozmery rúk a odtlačkov rúk sú vhodnými nástrojmi na predikciu telesnej výšky [1]. Medzi rôznymi populáciami existujú veľké rozdiely, pokiaľ ide o antropometrické merania a ich koreláciu s telesnou výškou. Tieto rozdiely sú spôsobené environmentálnymi a genetickými faktormi. Preto je potrebné vykonať štúdie v rôznych populáciách a vytvoriť rovnice špecifické pre danú populáciu [2].

Cieľom nášho výskumu je zistiť a zhodnotiť vzťah medzi telesnou výškou a rozmermi ruky a jej odtlačku a na základe tohto vzťahu vytvoriť regresné rovnice na odhad telesnej výšky pre slovenskú populáciu. Okrem toho je cieľom posúdiť variabilitu rozmerov ruky, a to zistiť intersexuálne a bilaterálne rozdiely a rozdiely medzi rozmermi ruky a jej odtlačku.

Materiál a metódy

Súbor tvorilo 215 dospelých jedincov (125 žien a 90 mužov) vo veku od 18 do 30 rokov, bez akejkoľvek deformity, zlomeniny alebo chirurgického zákroku oboch rúk. Probandi, zúčastnení na tomto výskume pochádzali z rôznych regiónov Slovenska. Dáta boli zbierané od februára 2018 do decembra 2022 na Katedre antropológie a na hodinách telesnej výchovy. Pred meraním, každý proband vyplnil krátky dotazník obsahujúci základné demografické otázky (pohlavie, dátum a miesto narodenia, rukovosť) a informovaný súhlas.

Následne bola každému probandovi odmeraná telesná výška pomocou antropometra. Pomocou posuvného meradla bolo každému probandovi odmeraných 22 rozmerov rúk. Merané rozmery zahŕňali dĺžku a šírku ruky, dĺžku dlane, dĺžku prstov a jednotlivých článkov prstov (obr. 1). Po týchto meraniach boli každému probandovi odobraté odtlačky rúk. Na obe ruky sme naniesli daktyloskopickú čerň a následne sme valivou metódou odtlačili ruky na papier. Na odtlačkoch sme zmerali pomocou pravítka rovnaké rozmery, ktoré sme merali aj na rukách.



Obr. 1. Rozmery ruky [3]

Všetky namerané rozmery sme následne štatisticky spracovali v programe MS Office Excel 2016 a IBM SPSS Statistics 24. Normálnu distribúciu dát sme otestovali Kolmogorov-Smirnovým testom. Výsledky testu ukázali, že dáta nie sú normálne rozdelené, preto sme ďalej pracovali s neparametrickými verziami testov. Významnosť intersexuálnych rozdielov bola testovaná pomocou Mann-Whitneyho testu a pomocou Wilcoxonovho testu boli testované bilaterálne rozdiely a rozdiely medzi rozmermi ruky a rozmermi odtlačku ruky. Vzťah medzi telesnou výškou a rozmermi rúk sme určili pomocou Spearmanovho korelačného koeficientu. Na stanovenie rovníc pre odhad telesnej výšky z rozmerov ruky a odtlačkov ruky bola použitá metóda lineárnej regresnej analýzy. Na porovnanie priemernej nameranej telesnej výšky s odhadovanou sme použili párový t – test.

Výsledky a diskusia

V našom súbore sme sledovali vzťah medzi telesnou výškou a rozmermi rúk a ich odtlačkov (tab. 1 a 2). Na základe korelácie medzi telesnou výškou a jednotlivými rozmermi ruky a jej odtlačkov sme vytvorili lineárne regresné rovnice na odhad telesnej výšky v slovenskej populácii. Nakoľko sme v našom súbore pozorovali významné intersexuálne aj bilaterálne rozdiely, tak korelácie a regresné rovnice bolo potrebné vytvoriť zvlášť pre ženy a zvlášť pre mužov a tiež zvlášť pre pravú a ľavú ruku. Okrem týchto rozdielov sme zistili signifikantné rozdiely medzi rozmermi rúk a rozmermi ich odtlačkov, ktoré potvrdili dôležitosť vytvorenia rovníc na odhad telesnej výšky nielen z rozmerov rúk, ale aj z rozmerov odtlačkov rúk [4].

V súbore žien sme pozorovali pozitívnu koreláciu medzi všetkými rozmermi ruky a telesnou výškou ($p < 0,05$).

Tab. 1. Korelácie rozmerov rúk s telesnou výškou

Legenda: DR – dĺžka ruky, ŠR – šírka ruky, DD – dĺžka dlane, A – dĺžka palca, A1 – dĺžka distálneho článku palca, A3 – dĺžka proximálneho článku prsta, B – dĺžka ukazováka, B1 – dĺžka distálneho článku ukazováka, B2 – dĺžka mediálneho článku ukazováka, B3 – dĺžka proximálneho článku ukazováka, C – dĺžka prostredníka,

C1 – dĺžka distálneho článku prostredníka, C2 – dĺžka mediálneho článku prostredníka, C3 – dĺžka proximálneho článku prostredníka, D – dĺžka prstenníka, D1 – dĺžka distálneho článku prstenníka, D2 – dĺžka mediálneho článku prstenníka, D3 – dĺžka proximálneho článku prstenníka, E – dĺžka malíčka, E1 – dĺžka distálneho článku malíčka, E2 – dĺžka mediálneho článku malíčka, E3 – dĺžka proximálneho článku malíčka, p – hodnota významnosti $**\alpha = 0,01$, $*\alpha = 0,05$, r – korelačný koeficient

Rozmery rúk	ŽENY				MUŽI			
	Pravá ruka		Ľavá ruka		Pravá ruka		Ľavá ruka	
	r	p - hodnota	r	p - hodnota	r	p - hodnota	r	p - hodnota
DR	0,587**	< 0,001	0,579**	< 0,001	0,665**	< 0,001	0,662**	< 0,001
ŠR	0,254**	0,004	0,235**	0,008	0,526**	< 0,001	0,469**	< 0,001
DD	0,517**	< 0,001	0,507**	< 0,001	0,579**	< 0,001	0,545**	< 0,001
A	0,357**	< 0,001	0,416**	< 0,001	0,418**	< 0,001	0,403**	< 0,001
A1	0,280**	0,002	0,390**	< 0,001	0,472**	< 0,001	0,449**	< 0,001
A3	0,329**	< 0,001	0,375**	< 0,001	0,197	0,062	0,218*	0,039
B	0,544**	< 0,001	0,556**	< 0,001	0,575**	< 0,001	0,533**	< 0,001
B1	0,425**	< 0,001	0,406**	< 0,001	0,455**	< 0,001	0,482**	< 0,001
B2	0,361**	< 0,001	0,334**	< 0,001	0,348**	0,001	0,229*	0,030
B3	0,396**	< 0,001	0,354**	< 0,001	0,276**	0,009	0,296**	0,005
C	0,579**	< 0,001	0,539**	< 0,001	0,702**	< 0,001	0,629**	< 0,001
C1	0,389**	< 0,001	0,344**	< 0,001	0,512**	< 0,001	0,577**	< 0,001
C2	0,351**	< 0,001	0,405**	< 0,001	0,348**	0,001	0,459**	< 0,001
C3	0,342**	< 0,001	0,370**	< 0,001	0,463**	< 0,001	0,499**	< 0,001
D	0,519**	< 0,001	0,530**	< 0,001	0,596**	< 0,001	0,599**	< 0,001
D1	0,388**	< 0,001	0,318**	< 0,001	0,457**	< 0,001	0,451**	< 0,001
D2	0,378**	< 0,001	0,309**	< 0,001	0,304**	0,004	0,353**	0,001
D3	0,268**	0,002	0,257**	0,004	0,284**	0,007	0,272**	0,009
E	0,484**	< 0,001	0,510**	< 0,001	0,433**	< 0,001	0,436**	< 0,001
E1	0,396**	< 0,001	0,367**	< 0,001	0,382**	< 0,001	0,446**	< 0,001
E2	0,374**	< 0,001	0,324**	< 0,001	0,190	0,072	0,244*	0,020
E3	0,199*	0,026	0,288**	0,001	0,224*	0,034	0,096	0,370

Najvyššia korelácia bola medzi telesnou výškou a dĺžkou pravej ($r = 0,587$; $p < 0,001$) a ľavej ruky ($r = 0,579$; $p < 0,001$). U mužov nevykazovali koreláciu s telesnou výškou dĺžka proximálneho článku I. prsta na pravej ruke, dĺžka mediálneho článku V. prsta na pravej ruke a dĺžka proximálneho článku V. prsta na ľavej ruke ($p > 0,05$). Najviac s telesnou výškou korelovala dĺžka III. prsta na pravej ruke ($r = 0,702$; $p < 0,001$) a dĺžka pravej ($r = 0,665$; $p < 0,001$) a ľavej ruky ($r = 0,662$; $p < 0,001$).

Tab. 2. Korelácie rozmerov odtlačkov rúk s telesnou výškou

Legenda: DR – dĺžka ruky, SR – šírka ruky, DD – dĺžka dlane, A – dĺžka palca, A1 – dĺžka distálneho článku palca, A3 – dĺžka proximálneho článku prsta, B – dĺžka ukazováka, B1 – dĺžka distálneho článku ukazováka, B2 – dĺžka mediálneho článku ukazováka, B3 – dĺžka proximálneho článku ukazováka, C – dĺžka prostredníka, C1 – dĺžka distálneho článku prostredníka, C2 – dĺžka mediálneho článku prostredníka, C3 – dĺžka proximálneho článku prostredníka, D – dĺžka prstenníka, D1 – dĺžka distálneho článku prstenníka, D2 – dĺžka mediálneho článku prstenníka, D3 – dĺžka proximálneho článku prstenníka, E – dĺžka malíčka, E1 – dĺžka distálneho článku malíčka, E2 – dĺžka mediálneho článku malíčka, E3 – dĺžka proximálneho článku malíčka, p – hodnota významnosti $**\alpha = 0,01$, $*\alpha = 0,05$, r – korelačný koeficient

Rozmery odtlačkov rúk	ŽENY				MUŽI			
	Pravá ruka		Ľavá ruka		Pravá ruka		Ľavá ruka	
	r	p - hodnota	r	p - hodnota	r	p - hodnota	r	p - hodnota
DR	0,503**	< 0,001	0,506**	< 0,001	0,715**	< 0,001	0,738**	< 0,001
SR	0,238**	0,007	0,277**	0,002	0,458**	< 0,001	0,387**	< 0,001
DD	0,437**	< 0,001	0,414**	< 0,001	0,603**	< 0,001	0,582**	< 0,001
A	0,387**	< 0,001	0,369**	< 0,001	0,617**	< 0,001	0,633**	< 0,001
A1	0,244**	0,010	0,037	0,700	0,314**	0,003	0,403**	< 0,001
A3	0,328**	< 0,001	0,365**	< 0,001	0,492**	< 0,001	0,468**	< 0,001
B	0,558**	< 0,001	0,535**	< 0,001	0,510**	< 0,001	0,604**	< 0,001
B1	0,413**	< 0,001	0,345**	< 0,001	0,487**	< 0,001	0,597**	< 0,001
B2	0,375**	< 0,001	0,402**	< 0,001	0,467**	< 0,001	0,343**	< 0,001
B3	0,358**	< 0,001	0,341**	< 0,001	0,376**	< 0,001	0,415**	< 0,001
C	0,465**	< 0,001	0,520**	< 0,001	0,653**	< 0,001	0,716**	< 0,001
C1	0,368**	< 0,001	0,343**	< 0,001	0,532**	< 0,001	0,596**	< 0,001
C2	0,360**	< 0,001	0,372**	< 0,001	0,497**	< 0,001	0,569**	< 0,001
C3	0,283**	0,001	0,316**	< 0,001	0,413**	< 0,001	0,460**	< 0,001
D	0,465**	< 0,001	0,520**	< 0,001	0,608**	< 0,001	0,624**	< 0,001
D1	0,350**	< 0,001	0,456**	< 0,001	0,507**	< 0,001	0,502**	< 0,001
D2	0,405**	< 0,001	0,409**	< 0,001	0,459**	< 0,001	0,524**	< 0,001
D3	0,280**	0,002	0,310**	< 0,001	0,404**	< 0,001	0,387**	< 0,001
E	0,400**	< 0,001	0,455**	< 0,001	0,489**	< 0,001	0,428**	< 0,001
E1	0,239**	0,008	0,253**	0,004	0,404**	< 0,001	0,434**	< 0,001
E2	0,375**	< 0,001	0,329**	< 0,001	0,326**	0,002	0,357**	< 0,001
E3	0,238**	0,008	0,363**	< 0,001	0,362**	< 0,001	0,242**	0,022

Pri odtlačkoch rúk u žien sme pozorovali pozitívnu koreláciu s telesnou výškou vo všetkých sledovaných rozmeroch okrem dĺžky distálneho článku I. prsta na ľavej ruke ($p > 0,05$). Dĺžka II. prsta na pravom ($r = 0,558$; $p < 0,001$) aj ľavom odtlačku ruky ($r = 0,535$; $p < 0,001$) vykazovala najvyššiu koreláciu s telesnou výškou. U mužov pozitívne korelovali s telesnou výškou všetky rozmery odtlačkov rúk ($p < 0,05$). Najvyššia korelácia bola medzi telesnou výškou a dĺžkou ľavej ruky ($r = 0,738$; $p < 0,001$), dĺžkou III. prsta na ľavej ruke

($r = 0,716$; $p < 0,001$) a dĺžkou pravej ruky ($r = 0,715$; $p < 0,001$). Naše výsledky sú v súlade so štúdiami vykonanými na malajskej [3], západoaustrálskej [5] a iránskej populácii [6].

Na základe pozitívnej korelácie medzi rozmermi rúk a telesnou výškou sme vytvorili 24 lineárnych regresných rovníc na odhad telesnej výšky z rozmerov rúk a 32 regresných rovníc na odhad telesnej výšky z rozmerov odtlačkov rúk pre slovenskú populáciu [4]. Na vytvorenie regresných rovníc sme použili len dĺžku dlane a dĺžku prstov na oboch rukách, nakoľko už sú vytvorené rovnice na odhad telesnej výšky z dĺžky a šírky ruky pre slovenskú populáciu [7]. Jednotlivé články prstov sme na vytvorenie rovníc nepoužili preto, lebo vykazovali najnižšiu koreláciu s telesnou výškou. Rovnice boli vytvorené zvlášť pre ženy a zvlášť pre mužov. Avšak, z praktického hľadiska, je zatiaľ vhodné využívať rovnice vytvorené pre zmiešané skupiny, nakoľko vzhľadom k populačnej špecificite, nevieme z odtlačku ruky určiť pohlavie jedinca. Všetky regresné rovnice sme otestovali a porovnali priemerné hodnoty nameranej a odhadovanej telesnej výšky v súbore žien a v súbore mužov (tab. 3 a 4).

Tab. 3. Porovnanie odhadovanej a nameranej telesnej výšky z regresných rovníc na odhad telesnej výšky z rozmerov rúk

Legenda: CE – dĺžka ľavého III. prsta, AE – dĺžka ľavého I. prsta, EP – dĺžka pravého V. prsta, CP – dĺžka pravého III. prsta, AP – dĺžka pravého I. prsta, DP – dĺžka pravého IV. prsta, TV – telesná výška, p – hodnota významnosti $\alpha = 0,05$, MD – rozdiel priemerných hodnôt odhadovanej a nameranej telesnej výšky

	Regresné rovnice	Odhadovaná TV	Nameraná TV	p - hodnota	MD
Ženy	$110,00 + 7,60 \cdot CE$	166,605	166,604	0,999	0,001
	$131,21 + 5,72 \cdot AE$	166,579	166,577	0,997	0,002
	$129,87 + 6,55 \cdot EP$	166,608	166,604	0,994	0,004
	$104,73 + 8,28 \cdot CP$	166,592	166,604	0,978	-0,012
Muži	$95,99 + 10,45 \cdot CP$	180,420	180,419	0,998	0,001
	$138,66 + 6,19 \cdot AP$	180,425	180,419	0,993	0,006
	$104,43 + 10,10 \cdot DP$	180,427	180,419	0,990	0,008
	$104,65 + 9,33 \cdot CE$	180,430	180,419	0,986	0,011

Tab. 4. Porovnanie odhadovanej a nameranej telesnej výšky z regresných rovníc na odhad telesnej výšky z rozmerov odtlačkov rúk

Legenda: ŠRE – šírka ľavej ruky, DDP – dĺžka pravej dlane, BP – dĺžka pravého II. prsta, ŠRP – šírka pravej ruky, BE – dĺžka ľavého II. prsta, DP – dĺžka pravého IV. prsta, TV – telesná výška, p – hodnota významnosti $\alpha = 0,05$, MD – rozdiel priemerných hodnôt odhadovanej a nameranej telesnej výšky

	Regresné rovnice	Odhadovaná TV	Nameraná TV	p - hodnota	MD
Ženy	$133,93 + 4,49 \cdot \text{ŠRE}$	166,571	166,604	0,951	-0,033
	$103,13 + 6,33 \cdot \text{DDP}$	166,549	166,604	0,911	-0,055
	$116,17 + 7,87 \cdot \text{BP}$	166,535	166,598	0,894	-0,064
	$140,43 + 3,56 \cdot \text{ŠRP}$	166,523	166,604	0,884	-0,081
Muži	$114,01 + 7,97 \cdot \text{ŠRP}$	180,418	180,419	0,999	-0,001
	$115,26 + 9,28 \cdot \text{BE}$	180,411	180,419	0,990	-0,008
	$124,99 + 7,89 \cdot \text{BP}$	180,435	180,419	0,982	0,016
	$112,56 + 9,15 \cdot \text{DP}$	180,443	180,419	0,970	0,024

Medzi odhadovanou a nameranou telesnou výškou v súbore žien aj v súbore mužov neboli žiadne signifikantné rozdiely. Odhad telesnej výšky z rozmerov rúk bol najpresnejší z dĺžky III. prsta na ľavej ruke u žien a z dĺžky III. prsta na pravej ruke u mužov. Pri rozmeroch odtlačkov rúk, bol odhad telesnej výšky najpresnejší zo šírky ľavej ruky u žien a zo šírky pravej ruky u mužov.

Záver

Z výsledkov našej práce možno potvrdiť, že odhad telesnej výšky z rozmerov rúk a odtlačkov rúk je možný a spoľahlivý. Vytvorené regresné rovnice možno použiť na odhad telesnej výšky dospelých jedincov v slovenskej populácii. Nakoľko výsledky našej práce potvrdili populačnú variabilitu v sledovaných rozmeroch rúk, rozmeroch odtlačkov rúk a v telesnej výške, vytvorené rovnice sú aplikovateľné len na populáciu, v ktorej bol daný výskum realizovaný. Výsledky našej práce majú využitie vo forenznej antropológii, pri profilovaní pozostatkov na miestach činu a určovaní biologického profilu jedinca.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Varu P. R., Manvar P. J., Mangal H. M., et al. (2015) Int. J. Med. Res. 1(3), p. 104
- [2] Açıkgöz A. K., Balci R. S., Göker P., et al. (2020) Int. J. Contemp. Med. Res. 7(9), p. 11
- [3] Zulkifly N. -R., Wahab R. A., Layang E., et al. (2018) J. Forensic Leg. Med. 53, p. 35
- [4] Stanková R. (2023) Rozmery ruky a jej odtlačkov vo vzťahu k telesnej výške v slovenskej populácii. (rukopis; Diplomová práca) Univerzita Komenského v Bratislave
- [5] Ishak N. -I., Hemy N., Franklin D., (2012) Forensic Sci. Int. 216(1-3), p. 199.e1
- [6] Mojaverrostami S., Mokhtari T., Malekzadeh M., et al. Anat. Sci. J. 16(2), p. 87
- [7] Uhrová P., Beňuš R., Masnicová S., et al. (2015) Leg. Med. 17(2), p. 92

Účinnosť protistafylokokových bakteriofágových prípravkov *in vitro*

Marek Straka^{1,2}, Zuzana Hubenáková¹, Aneta Bugalová³, Lucia Janošíková¹, Andrej Minich⁴, Martin Wawruch⁵, Hana Drahovská⁶, Adriana Liptáková¹, Livia Slobodníková¹

¹Univerzita Komenského a Univerzitná nemocnica v Bratislave, Lekárska fakulta, Mikrobiologický ústav, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovenská republika; marek.straka@fmed.uniba.sk

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 841 04 Bratislava, Slovenská republika

³Univerzita Komenského v Bratislave, Vedecký park, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava, Slovenská republika

⁴Medirex Group Academy n. o., Novozámocká 1, 949 05 Nitra, Slovenská republika

⁵Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Ústav farmakológie a klinickej farmakológie, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovenská republika

⁶Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Ilkovičova 6, 841 04 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Efficiency of antistaphylococcal bacteriophage preparations *in vitro*

Staphylococcus aureus is a frequent colonizer and an important agent of various opportunistic human infections. Moreover, there is an increasing number of antibiotic-resistant strains presenting a therapeutic challenge. One of the most promising ways to treat such infections or decolonize carriers may be phage therapy. This study evaluated the efficiency of five phage preparations to carrier strains (n = 111) and clinical isolates (n = 81). The phage efficiency was assessed by spot assay *in vitro*. Their clonality was determined by spa typing. Pyo-bacteriophage was active in 80 % of the tested strains followed by Staphylococcal Bacteriophage, Bakteriofag Stafilokokovij, STAFAL®, and Sextaphag® that were active against 76, 75, 74 and 73 % of strains, respectively. Spa typing revealed 97 spa types, the most frequent were t003, t024, t032, t084 and t179. *In vitro* results indicate a promising therapeutic potential of all tested phage preparations to *S. aureus* strains with distinct clonality and antibiotic susceptibility.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; MRSA; phage preparations; nasal carriage

Úvod a formulácia cieľa

Staphylococcus aureus je významným pôvodcom komunitných aj nozokomiálnych infekcií. Tento oportúnny patogén môže tiež kolonizovať kožu a sliznice asymptomaticky [1]. Nosičstvo tejto baktérie na nosovej sliznici môže byť však nebezpečné, a to najmä v zdravotníckych zariadeniach z dôvodu hrozby šírenia *S. aureus* na pacientov so zníženým imunitným statusom [2]. Študenti medicíny počas stáží prichádzajú do kontaktu s hospitalizovanými pacientmi, a tak študent kolonizovaný *S. aureus* predstavuje potenciálny zdroj ohrozujúci vnímavých pacientov [3].

Terapia takýchto infekcií je často komplikovaná zvyšujúcim sa počtom kmeňov rezistentných voči antibiotikám. Preto je potrebné hľadať nové možnosti terapie. Za jeden z najsľubnejších alternatívnych prístupov sa považuje terapia s využitím bakteriofágov [4].

Využíva prirodzených predátorov baktérií - bakteriofágy, ktoré dokážu lyzovať baktérie v mieste infekcie [4,5]. V porovnaní s antibiotikami sú bakteriofágy vysoko špecifické k bakteriálnym hostiteľom, a tak má fágová terapia len zanedbateľný efekt na fyziologickú mikrobiotu človeka. Okrem toho fágy nepreukázali žiadne významné vedľajšie účinky alebo toxicitu na cicavčie bunky [6]. Ďalšou výhodou je, že aktivita fágov nie je ovplyvnená rezistenciou baktérií voči antibiotikám, pretože ich mechanizmy účinku sa líšia od mechanizmov konvenčných antimikrobiálnych liekov [5]. Navyše, bakteriálne kmene odolné voči fágom majú vo všeobecnosti nižšiu fitness. Fágová terapia tak má veľký potenciál pri liečbe infekcií a tiež pri dekolonizácii nosičov, aby sa zabránilo šíreniu infekčných agens na iných ľuďoch [7].

Cieľom tejto práce bolo otestovať účinnosť komerčných fágových prípravkov na kmene *S. aureus* rôzneho pôvodu, s rôznou citlivosťou na antimikrobiálne látky a patriacich k rôznym spa-typom.

Materiál a metódy

Nosičské kmene *S. aureus* v počte 111 (4 kmene rezistentné voči meticilínu (MRSA)) boli získané z nosových výterov zdravých dobrovoľníkov z radov študentov Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave. Klinické kmene v počte 81 (29 MRSA) pochádzajú z infekcií krvného riečiska a infekcií kože a mäkkých tkanív pacientov vyšetovaných v Univerzitnej nemocnici v Bratislave. Kmene *S. aureus* boli izolované a identifikované pomocou štandardizovaných kultivačných a identifikačných metód [8]. Nejednoznačne identifikované kmene boli podrobené analýze pomocou PCR [9].

Antimikrobiálna citlivosť kmeňov na erytromycín, klindamycín, tetracyklín, trimetoprim-sulfametoxazol a ciprofloxacín bola testovaná diskovým difúznym testom podľa odporúčaní EUCAST-u [10]. Na skrining kmeňov MRSA bol použitý diskový difúzny test s cefoxitínovým diskom (30 µg) a na ich confirmáciu amplifikácia *mecA* génu pomocou PCR [10, 11].

Molekulárna charakterizácia kmeňov bola založená na sekvenčnej typizácii opakovaní X regiónu génu *spa* [12].

Účinnosť fágových prípravkov Pyo-bacteriophage, Staphylococcal Bacteriophage (oba Eliava Biopreparations LTD, Tbilisi, Gruzínsko), Bakteriofag Stafilokokovyyj, Sextaphag® (oba NPO Microgen, Perm, Ruská federácia) a STAFAL® (Aumed, Brno, Česká republika) bola stanovená metódou tvorby plakov. Štandardizované inokulum bakteriálnych kmeňov (McFarland 0,5) bolo naočkované na agarové platne Luria-Bertani. Následne boli bodovo

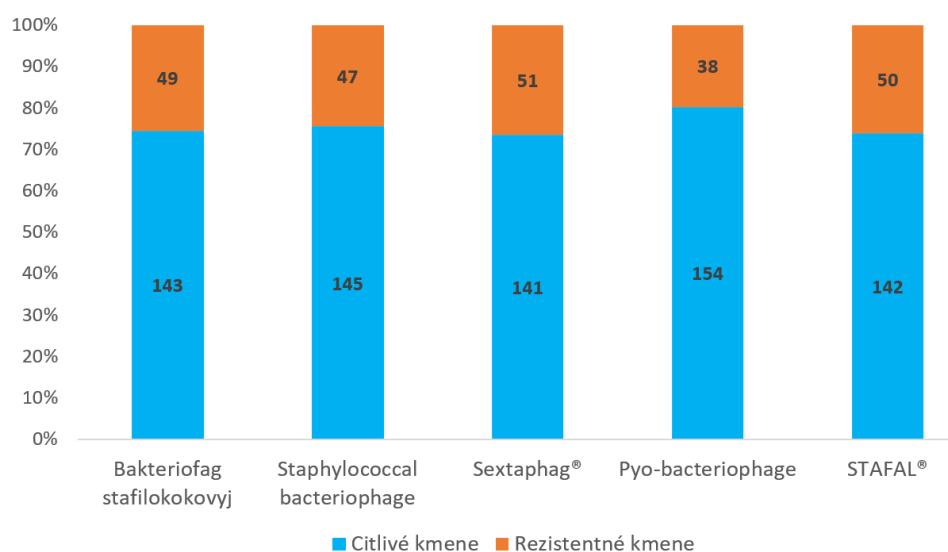
naočkované fágové prípravky v objeme 10 µl. Inkubácia trvala 16 hodín pri 37 °C. Aktivita fágových preparátov bola stanovená na základe konfluentnej bakteriálnej lýzy, prítomnosti semikonfluentných plakov alebo jednotlivých izolovaných plakov v mieste naočkovaných fágových suspenzií. Ktorákoľvek z týchto reakcií sa považovala za pozitívnu.

Všetky štatistické testy boli realizované na hladine štatistickej významnosti $\alpha = 0,05$. Na analýzy bol použitý štatistický softvér IBM SPSS pre Windows, verzia 28 (IBM SPSS Inc., Armonk, NY, USA).

Výsledky a diskusia

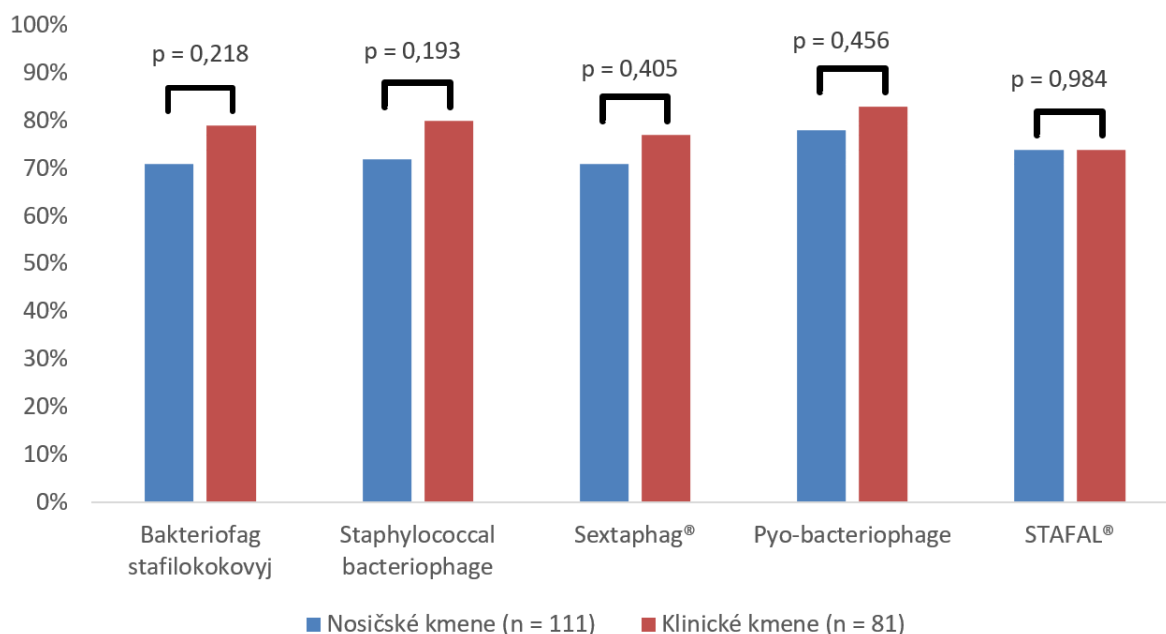
Citlivosť 192 kmeňov *S. aureus* na testované komerčné fágové prípravky bola 73-80 % v závislosti fágového preparátu. Najaktívnejší bol Pyo-bacteriophage, ktorý bol účinný voči 154 kmeňom (80 %). Nasledovali Staphylococcal bacteriophage so 145 citlivými kmeňmi (76 %), Bakteriofag Stafilocokovij na ktorý bolo citlivých 143 kmeňov (75 %), STAFAL® účinný voči 142 kmeňom (74 %) a Sextaphag® s efektivitou voči 141 kmeňom (73 %) (obr. 1).

Zo všetkých kmeňov *S. aureus* bolo 161 (84 %) citlivých aspoň na jeden z testovaných fágových preparátov. Stotridsať kmeňov bolo citlivých na všetky štyri fágové prípravky (68 %) a 31 kmeňov bolo rezistentných voči všetkým fágovým koktejlom (16 %). Medzi účinnosťou jednotlivých fágových prípravkov voči testovaným kmeňom boli vo všetkých prípadoch zistené štatisticky významné rozdiely. V účinnosti prípravkov voči kmeňom MRSA však žiadne významné rozdiely zaznamenané neboli.



Obr. 1. Sumárna citlivosť nosičských a klinických kmeňov *S. aureus* na testované fágové prípravky

Mierne, štatisticky nevýznamné rozdiely boli pozorované vo vnímavosti na fágy medzi klinickými a nosičskými kmeňmi *S. aureus*, pričom klinické kmene preukázali mierne vyššiu citlivosť (71 %-78 % vs. 74 %-83 %) (obr. 2).



Obr. 2. Porovnanie citlivosti nosičských a klinických kmeňov *S. aureus* na testované fágové prípravky

Citlivosť bakteriálnych kmeňov na testované fágové prípravky bola rozdielna pri kmeňoch citlivých na jednotlivé ATB v porovnaní s kmeňmi rezistentnými voči týmto ATB. Vo väčšine prípadov bola zaznamenaná vyššia citlivosť na fágy pri kmeňoch rezistentným voči ATB, v niektorých prípadoch bola táto účinnosť štatisticky významná, a to najmä pri porovnaní MRSA a kmeňov citlivých na meticilín (MSSA).

Účinnosť niektorých z týchto fágových prípravkov bola stanovená aj v iných prácach. V štúdií Dvořáčkovéj *et al.* [13] bola stanovená 83 % účinnosť prípravku STAFAL® voči klinickým kmeňom MRSA a 99 % účinnosť voči MSSA. Erol *et al.* [14] testovali účinnosť piatich fágových prípravkov medzi ktorými boli aj Staphylococcal bacteriophage a Pyo-bacteriophage, ktoré boli účinné voči 44,4 % a 53,5 % MRSA kmeňov izolovaných z nosovej sliznice tureckých pacientov a sýrskych imigrantov. Aktivita Staphylococcal bacteriophage bola voči MRSA kmeňom štatisticky významne nižšia oproti Pyo-bacteriophage a ďalším prípravkom testovaným v danej práci. Účinnosť Staphylococcal bacteriophage bola otestovaná aj v štúdií Kuptsov *et al.* [15], pričom bola preukázaná 86 % citlivosť kmeňov *S. aureus* na tento prípravok. Schopnosť lýzy bakteriálnych buniek *in vitro* pri kmeňoch rezistentných voči

antibiotikám je základným predpokladom pre ich použitie v terapii infekcií u pacientov [14].

V tejto práci boli stanovené aj spa typy kmeňov *S. aureus* a následne bola analyzovaná účinnosť fágových preparátov voči týmto typom. Medzi 192 nosičskými a klinickými kmeňmi bolo molekulárnou typizáciou identifikovaných 97 rôznych spa typov. Najpočetnejším spa typom v skupine nosičských izolátov bol t179 a t084. V skupine klinických kmeňov boli najviac zastúpenými spa typmi t024, t032 a t003.

Porovnaním citlivosti kmeňov *S. aureus* na fágy s ohľadom na spa typy boli pozorované podobné vzory citlivosti pri kmeňoch patriacich do rovnakého spa typu, len s niekoľkými výnimkami. Zo všetkých spa typov zistených v našej zbierke obsahovalo 56 kmeňov iba kmene citlivé na všetky fágové prípravky. Pri iných 19 typoch sa zistilo, že kmene *S. aureus* sú odolné voči všetkým testovaným fágovým prípravkom. Kmene patriace do 10 typov mali rôznu citlivosť na fágové prípravky a zostávajúce kmene prislúchajúce 12 spa typom mali variabilnú fágovú citlivosť v rámci rovnakého spa typu. Kmene najčastejšie identifikovaných typov boli všetky citlivé (t003, t084) alebo prevažne citlivé na fágy (t024, t032). pri kmeňoch spa typu t179 bola účinnosť fágov rôznorodá. Kmene z našej kolekcie, ktoré boli rezistentné na všetky fágové preparáty, patrili prevažne medzi málo frekventované typy.

Záver

Vysoká účinnosť všetkých testovaných fágových prípravkov naznačuje ich potenciál pri liečbe bakteriálnych infekcií, najmä tých, ktorých pôvodcami sú multirezistentné kmene. Vďaka viacerým výhodám fágov oproti antibiotikám by fágová terapia mohla hrať komplementárnu úlohu v terapii infekčných ochorení (chirurgia, dermatovenerológia, JIS,...).

PodĎakovanie

Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Výskum a vývoj v lekárskejších vedách – cesta k personalizovanej liečbe závažných neurologických, kardiovaskulárnych a nádorových ochorení (kód ITMS: 313011T431), spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a grantu KEGA002UK-4/2022.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Liptáková A., Koreň J., Buc M., et al. (2019) Lekárska mikrobiológia. Herba Bratislava, p. 394
- [2] Price J. R., Cole K., Bexley A., et al. (2017) Lancet. Infect. Dis. 17(2), p. 207

- [3] Carmona-Torre F., Torrellas B., Rua M., et al. (2017) *Lancet. Infect. Dis.* 17(5), p. 477
- [4] Romero-Calle D., Guimarães Benevides R., Góes-Neto A., et al. (2018) *Antibiotics.* 8(3), p. 138
- [5] Straka M., Dubinová M., Liptáková A. (2022) *Microorganisms.* 10(7), p. 1365
- [6] Loc-Carrillo C., Abedon S. T. (2011) *Bacteriophage* 1(2), p. 111
- [7] Oechslin F. (2018) *Viruses.* 10(7), p. 351
- [8] Jorgensen J. H., Pfaller M. A. (2015) *Manual of clinical microbiology.* ASM Press Washington DC
- [9] Martineau F., Picard F. J., Paradis D. K. S., et al. (2001) *J. Clin. Microbiol.* 39(7), p. 2541
- [10] EUCAST [Citované 24. marec 2023] http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/
- [11] Martineau F., Picard F. J., Roy P. H., et al. (1998) *J. Clin. Microbiol.* 36(3), p. 618
- [12] Ridom Spa server [Citované 20. marec 2023] <https://spaserver.ridom.de/spaserver/>
- [13] Dvořáčková M., Růžička F., Benešík M., et al. (2019) *Folia Microbiol.* 64(1), p.121
- [14] Erol H. B., Kaskatepe B., Bakkaloglu Z., et al. (2021) *Arch. Microbiol.* 203(9), p. 5735
- [15] Kuptsov N. S., Kornienko M. A., Gorodnichev R. B., et al. (2020) *Bull RSMU*

CAIX suppression attenuates the inflammation-triggered migration of the pancreatic cancer cell line Colo357

Sabína Strapcová, Mária Bartošová, Eliška Švastová

*Biomedical Research Center of the Slovak Academy of Sciences, v. v. i., Institute of Virology,
Department of Cancer Biology, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovak republic;
sabina.strapcova@savba.sk*

Abstract

Pancreatic cancer is one of the most fatal malignancies worldwide. Its high metastatic rate, combined with the fact that the disease is usually detected at an advanced stage, leave little to no room for effective therapeutic options. Hypoxia, desmoplasia, and inflammation represent inherent features of pancreatic cancer. Carbonic anhydrase IX (CAIX) is a hypoxia-regulated transmembrane enzyme poorly expressed in the healthy pancreas, but overexpressed in cancerous tissue. Its localization at fibrotic sites and areas of pancreatitis, as well as its correlation with tumor grade and poor prognosis, place CAIX in the center of the pathological events leading from malignant transformation to cancer progression and metastasis. Here, we show that inflammation is a key factor for the induction of normoxic *CA9* expression in the pancreatic cancer cell line Colo357. Moreover, we argue that CAIX is essential for facilitating cancer cell migration, particularly in the context of inflammation, as the suppression of CAIX by SLC0111 and M75 effectively decreased the migratory abilities of Colo357.

Keywords: *carbonic anhydrase IX; pancreatic cancer; inflammation; hypoxia; cell migration*

Introduction and Objectives

Carbonic anhydrase IX is a hypoxia-induced membrane enzyme strongly implicated in cancer. Its expression is associated with a variety of solid tumors, including pancreatic cancer, and is correlated with poor prognosis ([1, 2]). The main role of CAIX is to regulate intracellular pH of cancer cells, whereby it enables their survival within the acidic cancer TME ([3]). However, the roles of CAIX in carcinogenesis extend beyond pH regulation. The protein can also behave as an adhesion molecule and plays a crucial role in cancer progression – CAIX is actively involved in the metastatic cascade and migration ([4]), localizes at focal adhesion sites ([5]) and within invadopodia ([6]).

Pancreatic cancer has the lowest survival rate of all cancer in Europe, being responsible for 95 000 deaths within the EU yearly ([7]). The overall prognosis of all pancreatic patients remains extremely dismal as only 4% of patients live 1 year after being diagnosed with this disease ([8]). Similarly to other solid malignancies, CAIX expression in pancreatic cancer tissue is higher compared to the healthy organ as well as precursor lesions ([9]; [10]; [11]). CAIX expression positively correlates with tumor size and staging and hence, high CAIX expression also serves as an indicator of a worse prognosis ([11]). The crucial involvement of

CAIX in the development of PDAC is underlined by the fact that CAIX is already expressed in pre-cancerous lesions, i.e. PanINs ([12]) and IPMNs [2]).

Inflammation seems to play a cardinal role in the development and progression of pancreatic cancer, as the chances of developing pancreatic cancer increase drastically in patients with longer-standing chronic pancreatitis ([13]). Pancreatitis-induced stress was shown to cause acinar to ductal metaplasia ([14]), which ultimately can lead to the formation of PanIN lesions ([15]). Moreover, CAIX is thought to be involved in promoting survival and enhancing the invasive behavior of cancer cells via the IL-6/Notch-3/CAIX axis ([16]).

The accessible localization of CAIX on the cell's surface and its complex involvement in cancer, make the pharmacologic inhibition of carbonic anhydrase IX a promising tool in anti-cancer therapy. The major groups of compounds currently used for CAIX targeting or visualization in the clinic include monoclonal antibodies (e.g. M75) and CAIX-specific small molecule inhibitors (e.g. SLC0111). The monoclonal antibody M75 is routinely used in IF, IHC and WB detection of CAIX ([4]; [17]). The ureido-substituted benzene-sulfonamide SLC0111 can efficiently inhibit CAIX both *in vitro* and *in vivo* [18] and was shown to have the ability to sensitize tumor cells to conventional therapy *in vitro* [19]).

In order to elucidate how CAIX is involved in events promoting the progression of pancreatic cancer, we aim to show that (a) the expression of CAIX is driven by inflammation independently of hypoxia; and (b) CAIX is crucial for facilitating migration in a pro-inflammatory cytokine/chemokine-rich environment in the pancreatic cancer cell line Colo357.

Materials and methods

Cell culture. Colo357 cells were cultured in DMEM with 10% FCS at 37°C in humidified air with 5% CO₂. Hypoxic experiments were carried out in a hypoxic workstation (1% O₂).

Conditioned media. Conditioned media containing inflammatory cytokines/chemokines were prepared from MUF fibroblast spheroids as following: MUF cells were seeded on ultra-low adhesion 96-well plates (10 000 cells/well) and after 96hours of incubation, media from each well were collected, pooled, and centrifuged at 800g in order to eliminate cell debris.

Migration assay using the xCELLigence® RTCA Instrument. 40 000 cells/well were seeded on 16-well plates (CIM-Plate®16) in media (DMEM/CM) containing the corresponding treatments (SLC0111 100µM; M75 20µg/mL). CIM-plates were then incubated in normoxia and hypoxia (1% O₂), respectively. Cells pre-incubated in hypoxia for 24 hours prior were seeded onto CIM-plates later incubated in hypoxia. Impedance in real time was measured for 72 hours. Each sample was run in quadruplets.

Real-time PCR. After RNA isolation (RNeasy plus mini kit, QIAGEN) and cDNA preparation (High-capacity cDNA Reverse Transcription kit, Applied Biosystems), qPCR was carried out using the SYBR green/fluorescein qPCR Master Mix (Fermentas). Each sample was run in triplets. Transcript amplification was carried for 40 cycles. The $\Delta\Delta C_t$ method was used for evaluation and β -actin was used for normalization.

Immunoblotting. Protein lysates were separated by 10% SDS-PAGE, transferred onto a PVDF membrane (Millipore), and then blocked using 5% non-fat milk dissolved in 0.2% NP40 overnight at 4°C. The next day, the membrane was incubated with the primary antibodies (M75, β -actin) and subsequently with the appropriate secondary antibody (anti-mouse IgG/HRP, Dako) at room temperature for 1 hour. Membranes were developed using chemiluminescent substrate (ECL) and signal was detected using X-ray films (Fuji).

Results and discussion

Even though hypoxia is the most significant regulator of CAIX expression, activation of the transcription factor HIF1 can also be facilitated by different factors, such as reactive oxygen species, succinate, and lactate [20]. Likewise, the pro-inflammatory cytokine IL-6, was shown to induce CAIX expression even in the absence of hypoxia [16].

In order to study the effect of inflammation on CAIX, particularly in relation to the migration potential of the studied pancreatic cancer cells, we use conditioned media (CM) as a model of inflammation. The used CM contain a variety of pro-inflammatory cytokines and chemokines (the media were characterized by conducting a XL cytokine array; data not shown). As hypothesized, we show that CM (from now on referred to as “inflammation”) is able to induce CAIX expression on both gene and protein level even in normoxia (Fig.1).

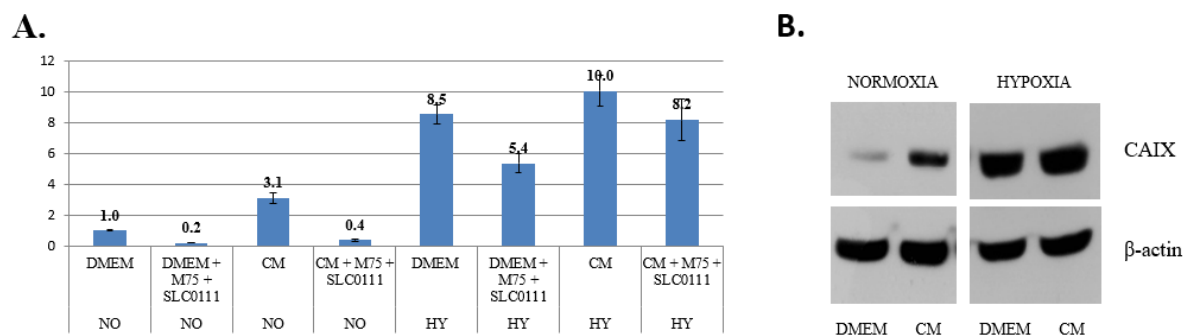


Fig. 1. The effect of inflammation on the expression of *CA9* in Colo357 cells on mRNA (A) and protein (B) level. NO – normoxia; HY – hypoxia; CM – conditioned media.

As a result of inflammation, the production of *CA9* mRNA increased 3.1-fold and 10-fold in normoxia and hypoxia, respectively (Fig.1A). The use of SLC0111 and M75 heavily decreased *CA9* expression among all treatment groups. While the lowest levels of *CA9* were present upon the use of SLC0111+M75 in DMEM in normoxia (0.2 fold decrease; Fig.1A), the most significant drop was achieved by inhibiting *CA9* in CM in normoxia (from 3.1-fold increase to 0.4; Fig.1A). Even in hypoxia, where *CA9* expression is particularly high due to the presence of HIF1 α , treatment with M75+SLC0111 was able to decrease *CA9* mRNA levels.

Consistently with these results, analysis of protein expression via Western blot (Fig.1B) showed that while Colo357 cells express low levels of CAIX even in normoxia, protein expression was significantly enhanced as a result of inflammation. In hypoxia, the levels of CAIX in DMEM and CM, respectively, were comparable (Fig.1B). Hence, we presume that inflammatory processes would positively influence the expression of CAIX most significantly in areas with normal oxygenation (e.g. at tumor edges), where it would drive the transformation of cells to a more aggressive phenotype. CAIX is known to be involved in various pro-invasive processes of cancer cells, such as invasion and migration ([4]; [5]; [6]). If inflammation is able to induce the expression of CAIX even outside of hypoxia, it potentially would enable cancer cells spread faster and, by that, effectively facilitate an even more rapid disease progression.

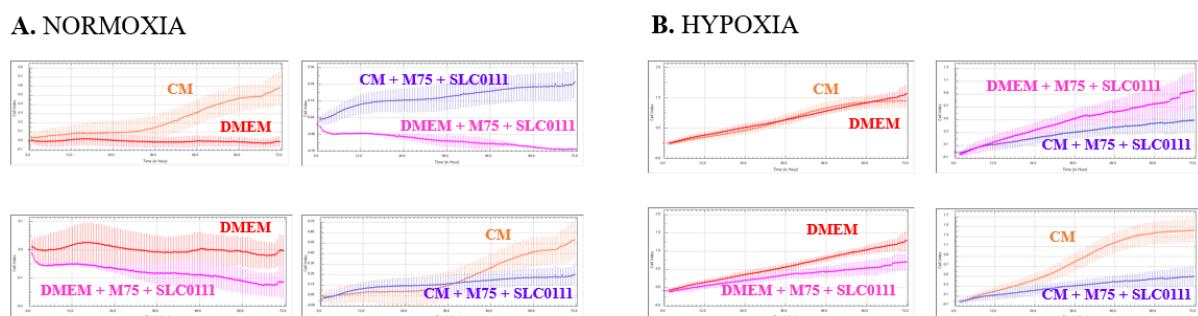


Fig. 2. Migration of Colo357 cells in corresponding media in normoxia (A) and hypoxia (B).

Hence, we decided to test the hypothesis that inflammation supports cancer cell migration by up-regulating the expression of CAIX. By carrying out a migration assay, we have shown that while Colo357 cells seeded in DMEM had no ability to migrate in normoxia (CI=0), inflammation enhanced the migratory potential to a CI = 0.6 reached after 72 hours (Fig.2A). Hypoxia significantly increased the migration potential of Colo357 cells – whether incubated in DMEM or CM, both groups reached a similar CI of approximately around 1.5 after 72 hours (Fig.2B). To target CAIX and inhibit its functionality, the antibody M75

(targeted against the PG domain of CAIX) and the inhibitor SLC0111 (acting by suppressing the utilization of Zn^{2+} within CA IX's active site) were used. As expected, CAIX inhibition effectively decreased the ability of cells to migrate independently on media type or oxygen availability (Fig.2). The most effective decrease in the migratory potential of Colo357 cells was achieved when adding M75 and SLC0111 to cells cultivated in CM in hypoxia (Fig.2B).

Conclusion

In the pancreatic cancer cell line Colo357, inflammation can induce the expression of carbonic anhydrase IX in a hypoxia-independent manner on gene as well as on protein level. Inflammation drives the ability of this cell line to migrate in normoxia, possibly by triggering the expression of CAIX. By suppressing the protein via the use of the inhibitor SLC0111 and the antibody M75, we show that migration rate can be decelerated, placing CAIX at the forefront of pancreatic cancer cell migration.

Acknowledgment

This work was supported by the project APVV-20-0480.

References

- [1] Pastorekova S., Gillies R. J. (2019). *Cancer Metastasis Rev.* 38(1-2), p. 65
- [2] Strapcova S, Takacova M, Csaderova L, et al. (2020) *Cancers.* 12(8), p. 2005.
- [3] Sedlakova O., Svastova E., Takacova M., et al. (2014) *Front Physiol.* 4, p. 400.
- [4] Svastova E., Witarski W., Csaderova L. et al. (2012) *J Biol Chem.* 287(5), p. 3392
- [5] Csaderova L., Debreova M., Radvak P., et al. (2013) *Front Physiol.* 4, p.271.
- [6] Debreova M., Csaderova L., Burikova M., et al. (2019) *Int J Mol Sci.* 20(11), p. 2745
- [7] European Cancer Information System. [Cited: March 28, 2023] <<https://ecis.jrc.ec.europa.eu/index.php>>
- [8] Rawla, P.; Sunkara, T.; Gaduputi, V. (2019). *World J. Oncol.* 10, p. 10
- [9] Couvelard A., O'Toole D., Leek R., et l. (2005). *Histopathology.* 46(6), p. 668
- [10] Yang L., Yang Z., Li D. et al. (2018) *Pathol Oncol Res.* 24(4), p. 899
- [11] Li Y., Dong M., Sheng W. et al. (2016) *Pathol Oncol Res.* 22(2), p. 277-86.
- [12] Leppanen J., Helminen O., Huhta H. (2018) *World J. Surg. Oncol.* 16, p. 127
- [13] Duell E.J., Lucenteforte E., Olson S.H. et al. (2012). *Ann. Oncol.* 23, p. 2964
- [14] Liou G.Y., Doppler H., Necela B. et al. (2013). *J. Cell Biol.* 202, p. 563
- [15] Kopp J.L., von Figura G., Mayes E. (2012) *Cancer Cell.* 22, p. 737

- [16] Sansone P., Storci G., Giovannini C. (2007) *Stem Cells*. 25, p. 807
- [17] Kajanova I., Zatovicova M., Jelenska L. et al. (2020) *Br J Cancer*. 122(11), p. 1590
- [18] Gieling R. G., Babur M., Mamnani L. et al. (2012) *J Med Chem*. 55(11), p. 5591
- [19] Andreucci E., Ruzzolini J., Peppicelli S. et al. (2019) *J Enzyme Inhib Med Chem*. 34(1), p. 117
- [20] Panisova E., Kery M., Sedlakova O. et al. (2017) *Oncotarget*. 8(44), p. 77819

Relationship between bone mineral density in radius and fat mass in young adult women

Simona Sulis, Lenka Vorobeľová, Darina Falbová

Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Anthropology, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak republic; sulis3@uniba.sk

Abstract

This study aimed to investigate the relationship between bone density, age, and fat mass in young healthy women aged 20 to 30 years old. The study included 349 Slovak women who underwent measurements of body composition and bone density using InBody 770 and Sunlight MiniOmni TM devices. The data were statistically analysed, yielding the result that age is a critical factor in bone density. However, the study did not find any significant correlation between fat mass and bone density in young healthy women.

Keywords: *bone mineral density; fat mass; bioelectrical impedance analysis*

Introduction and Objectives

Bones are a connective tissue characterised mainly by a mineral matrix and an organic matrix. Bone density is defined by mineral content, it is influenced by a plethora of different factors, such as age, sex, diet, physical activity, numerous pathologies and other behavioural components such as smoking and drinking alcohol. Bone mineral density (BMD) in women tends to decrease especially after menopause, due to a negative calcium balance and oestrogen deficiency [1]. The study of the influence of fat mass (FM) on BMD has so far yielded mixed results in the literature, due to its multifactorial nature. Being underweight increases the risk of fractures [2], whereas an excess of FM, if located subcutaneously, has a positive impact on bones as a result of mechanical loading which stimulates bone formation. However, if the fat mass is visceral the body experiences an increase in inflammatory cytokine levels that lead to bone resorption [3–5]. Most of the studies available in the literature focus on postmenopausal women, and the most frequently studied skeletal elements are the femur and the hip. However, some studies on premenopausal women are available, among those Slemenda et al. 1990 [6] analysed multiple bone regions, including the radius, on a sample of 342 women, aged 25 – 79 years, but they did not find a significant correlation between BMD in the radius and FM. In the same year another study [7] with a similar sample, 181 healthy women aged 20 to 50 years, found a significant correlation between BMD, fat-free mass (FFM) and BMI. Some studies also suggested [8,9] that FFM has a higher correlation with BMD in premenopausal women, whereas FM has a higher impact in postmenopausal women. In 2014 [10], a meta-analysis was

conducted to investigate the inconsistent finding available in the literature, their results show a higher correlation between FFM and BMD than FM in both men and women of all ages (18 – 92 years old). Hence, this study aims to investigate the relationship between bone density and FM on the left radius in a sample of young healthy Slovak women.

Materials and methods

A sample of 349 young healthy Slovak women aged 20 – 30 years old has been investigated since the quantitative ultrasound device (QUS) used is not validated on under 20 years old individuals and there were no sufficient data available on 30 years older probands. The exclusion criteria were the age and the presence of the following pathologies: thyroiditis, Crohn's disease, liver conditions, diabetes type 1, eating disorders, epilepsy, oncological pathologies, and celiac disease. Women have been invited to fill out a questionnaire adapted from the world health organization (WHO) STEPS 2014 regarding their medical history, behaviours and diet. Afterwards, body composition and bone density analysis were performed. This study has been approved by ethical commission of the Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava (no. ECH19021).

InBody 770 allows obtaining segmental results for each body part as well as overall results for the entire body. The focus of this study is the data collected on the left arm and the FM. The indices used in this study, collected by the instrument are the body mass index (BMI), percent body fat (PBF), visceral fat (cm^2), fat mass index (FMI) and the fat mass for the left arm. An additional measurement of obesity used is the waist-to-hip ratio (WHR), however, this measurement was obtained by manual anthropometric measurement of the waist and hip [11]. In the following analysis the BMI measurements obtained are divided according to the WHO ranges [12], below 18.5 underweight, 18.5 – 24.9 normal weight, 25.0 – 29.9 pre-obesity and above 30 is obesity. An established range from the WHO was used for WHR as well, in this case for women a value higher than 0.85 is considered to be associated with an obese individual. While PBF results were divided into the categories offered by the instrument where below 18% is under average, 18 – 28% is normal and above 28% is “over” (above average).

The BMD data are collected utilising a Sunlight MiniOmni TM sonographic device (BeamMed, Israel) on the distal third of the right radius, measured at the midpoint between the elbow and the end of the middle finger, using an ultrasound gel. Before each data collection day, a calibration of the instrument is performed. Speed of sound (SOS), T-score and Z-score are the data provided by the instrument. A T-score higher than -2.5 indicates osteoporosis (low bone density), -1 ideal, -1 to -2.5 osteopenia, whereas a Z-score of -2 and less indicates reduced

bone density, and more than -2 is considered within range.

The statistical analysis, performed utilising *jamovi* (2022) Version 2.3, started with descriptive statistics, to perform a preliminary study of the sample. Subsequently, a study of data distribution was performed, in particular, the dependent variables (Z-score, T-score and SOS), were analysed utilizing Kolmogorov-Smirnov tests. To evaluate the relationship between the variables Spearman's ρ coefficient and segmental statistical analysis were conducted.

Results and discussion

Preliminary descriptive statistical analysis of the BMD and FM parameters was performed, as shown in Table 1. The age of women (N = 349) averaged 22.18 years (SD = 1.98). Additionally, it was observed that 14.3% of the sample according to the BMI categories were underweight, 69.6% had a normal weight, 11.7% were pre-obese and 4.3% were obese. Similarly, in the WHR categories, 97.7% were normal and 2.3% obese, whereas in the PBF% categories, 9.2% were under, 46.4% normal and 44.4% were over. Moreover, 2.6% of participants had a lower Z-score, indicating low bone density and 97.4% were normal, lastly, 57% of women had a normal T-score, 39.3% osteopenia and 3.7% osteoporosis (reduced bone density).

Tab. 1. Overview of bone mineral density and fat mass parameters

Abbreviations: N – number of individuals, SD – standard deviation, SOS – speed of sound, BMI – body mass index, PBF% - percent body fat, FMI – fat mass index, WHR – waist to hip ratio

	N	Mean	Median	SD
Age	349	22.18	22.00	1.98
T-score	349	-0.76	-0.80	1.07
Z-score	349	-0.20	-0.20	1.05
SOS	349	4087.93	4086.00	117.85
BMI	349	21.89	21.10	3.65
PBF%	349	27.41	26.70	7.52
Fat mass Left Arm %	349	123.00	101.70	75.61
FMI	349	6.23	5.50	2.79
Visceral fat (cm2)	349	76.63	64.50	40.02
WHR	349	0.73	0.73	0.05

To assess the normality of the distribution of scores a Kolmogorov-Smirnov test was performed with a significance level selected of $p = 0.05$. The assumption of normality was not violated revealing a normal distribution in the variables T-Score ($p = 0.175$), Z-score ($p = 0.282$), SOS ($p = 0.618$) and PBF % ($p = 0.387$). Whereas the assumption of normality was violated in the variables age ($p < 0.001$), BMI ($p = 0.001$), WHR ($p = 0.004$) and visceral fat

in cm^2 ($p < 0.001$). To explore the relationship between the variables, a correlation matrix was created, using Spearman's ρ coefficient, as shown in Table 2, from which a significant positive correlation can only be inferred between the Z-score and age ($r = 0.203$, $p < 0.001$), the T-score and age ($r = 0.296$, $p < 0.001$) and SOS with age ($r = 0.269$, $p < 0.001$).

Tab. 2. Correlation between bone mineral density and fat mass parameters

Abbreviations: N – number of individuals, FMI – fat mass index, BMI – body mass index, PBF% - percent body fat %, WHR – waist to hip ratio, SOS - speed of sound, p – p-value, r – Spearman's rho

N = 349	T-score		Z-score		SOS	
	r	p	r	p	r	p
Age	0.296	< 0.001	0.203	< 0.001	0.269	< 0.001
FMI	0.013	0.814	-0.011	0.838	0.005	0.929
Visceral fat (cm^2)	-0.001	0.992	-0.022	0.679	-0.008	0.881
BMI	0.021	0.691	0.001	0.984	0.014	0.799
PBF%	0.006	0.916	-0.019	0.728	-0.002	0.969
WHR	-0.055	0.304	-0.031	0.565	-0.043	0.427
Fat mass left arm %	0.002	0.968	-0.021	0.693	-0.005	0.919

In accordance with the literature, this test confirms the association between BMD and age as demonstrated in the correlation analysis. However, no statistical significance has been found between BMD and body composition parameters such as BMI, FMI, WHR, PBF%, visceral adiposity and FM in the left arm. Several studies have shown an association between the aforementioned variables, but with contradictory results [3–5,7].

A further study between the two bone density categories (T-score and Z-score) and FM parameters divided into the WHO aforementioned categories, such as BMI, PBF% and WHR were investigated using the Pearson's χ^2 test (Table 3). Pearson's χ^2 test indicated no significant association between BMD parameters and FM parameters ($p > 0.05$).

Tab. 3. Observed frequencies of bone mineral density categories and fat mass parameters categories

Abbreviations: n – number of individuals, p – p-value, WHR – waist to hip ratio, BMI – body mass index, PBF% - percent body fat %

	Z-score					T-score						
	Low		Normal		p	Normal		Osteopenia		Osteoporosis		p
	n	%	n	%		n	%	n	%	n	%	
WHR												
Normal	9	2.7	329	97.3	0.662	196	57.5	132	38.7	13	3.8	0.372
Obese	0	0.0	7	100.0		3	37.5	5	62.5	0	0.0	
BMI												
Under	3	6.0	47	94.0	0.113	22	44.0	26	52.0	2	4.0	0.335
Normal	3	1.3	237	98.8		149	61.3	86	35.4	8	3.3	
Pre-obesity	2	4.9	41	95.1		21	51.2	18	43.9	2	4.9	
Obesity	1	7.1	14	92.9		7	46.7	7	46.7	1	6.7	
PBF%												
Under	1	3.1	31	96.9	0.728	17	53.1	15	46.9	0	0.0	0.570
Normal	3	1.9	157	96.7		93	57.4	64	39.5	5	3.1	
Over	5	3.3	148	97.4		89	57.4	58	37.4	8	5.2	

A possible explanation for this finding could be that the impact of FM on bone tissue requires more time, as suggested by the above-mentioned literature [3–5,7]. A larger sample size that includes older individuals (aged 50 – 60 yrs. old) could help confirm or refute this hypothesis and explore other potential factors influencing bone density. Moreover, the QUS device used to collect the BMD data was unable to obtain the measurements on eight obese individuals as well as it often required repeated measurements with individuals in pre-obesity and obese. Therefore, future studies could investigate the relationship between visceral fat and BMD in young healthy women using other methods more accurate with individuals in the aforementioned body composition categories. Additionally, only one bone site was evaluated, and the results may not be representative of BMD in other skeletal sites, as is the case with most of the above studies in which two or more different sites were examined [2,3,6-8,10].

Once the two correlated variables (Z-score and age) were identified, a segmental statistical analysis was performed to investigate their relationship. The BMD was tested by year, as shown in Table 4. From this last analysis of the Z-score, can be deducted a trend towards an increase in BMD from the age of 20 to 24. The sample for the 25 to 30 age group does not show a clear trend in either BMD reduction or increase and with only 35 individuals it was too small to draw any conclusions.

Tab. 4. Relationship between Z-score and age
Abbreviations: N – number of individuals, SD – standard deviation

Z-score					
Age	N	Mean	95 % Confidence Interval		SD
			Lower	Upper	
20	79	-0.435	-0.651	-0.220	0.960
21	73	-0.330	-0.603	-0.057	1.169
22	54	-0.254	-0.556	0.049	1.107
23	76	-0.013	-0.243	0.217	1.006
24	32	0.078	-0.282	0.438	0.998
25	16	-0.131	-0.585	0.322	0.851
26	5	0.200	-0.935	1.335	0.914
27	4	-0.025	-1.696	1.646	1.050
28	4	0.975	0.119	1.831	0.538
29	5	-0.160	-1.516	1.196	1.092
30	1	-0.100	-	-	-

According to Sezer et al. (2011) [13] peak BMD in women is reached at the age of 35 years, this assumption was true in this study as well since it has been observed an increase in bone density in the sample of 20-24 years old women.

Conclusion

In conclusion, it was observed a gradual increasing of BMD values from the age of 20 to 24 years. Interestingly, our study did not find any significant correlation between FM and BMD in young healthy women. This finding is somewhat surprising, considering the established relationship between obesity and a decrease in bone density. Hence, the findings suggest that age is a crucial factor in bone density and that other variables associated with FM in a human body, such as BMI, PBF%, WHR, FMI, and visceral body fat (cm²), do not appear to influence bone density significantly in this specific sample.

Acknowledgement

We would like to thank the Department of Anthropology of the Faculty of Natural Sciences of Comenius University in Bratislava, and its students whose participation in this study allowed its making. This publication is the result of the project implementation: Comenius University in Bratislava Science Park supported by the Research and Development Operational Programme funded by the ERDF. [Grant number: ITMS 26240220086, ITMS2014p: 313021D075].

References

- [1] Ji M., Yu Q. (2015) *Chronic Dis Transl Med.* 1(1), p. 9
- [2] Lim J., Park H. S. (2016) *Int. J. Clin. Pract.* 70(6), p. 462
- [3] Beck T. J., Oreskovic T. L., Stone K. L., et al. (2001) *J. Bone Miner. Res.* 16(6), p. 1108
- [4] Lanyon L., Skerry T. (2001) *J. Bone Miner. Res.* 16(11), p. 1937
- [5] Braun T., Schett G. (2012) *Curr. Osteoporos. Rep.* 10(2), p. 101
- [6] Slemenda C. W., Hui S. L., Williams C. J., et al. (1990) *Bone Miner.* 11(1), p. 101
- [7] Halioua L., Anderson J. J. B. (1990) *Osteoporos Int.* 1(1), p. 50
- [8] Ijuin M., Douchi T., Matsuo T., et al. (2002) *Maturitas.* 43(4), p. 239
- [9] Mizuma N., Mizuma M., Yoshinaga M., et al. (2006) *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 32(2), p. 184
- [10] Ho-Pham L. T., Nguyen U. D. T., Nguyen T. V. (2014) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99(1), p. 30
- [11] Lohman T.G., Roche A.F., Martorell R., eds. (1988) *Anthropometric standardization reference manual.* Human Kinetics Books, Champaign, IL.
- [12] World Health Organisation (1995) *World Health Organ Tech Rep Ser.* 854, 312
- [13] Sezer A., Altan L., Özdemir Ö. (2015) *Biomed Res. Int.* 1-7, 2015

Fágová terapia kožných infekcií pacientov s diabetickou nohou

Tomáš Talač¹, Andrea Andrésová¹, Peter Ďurovka^{1,3}, Michal Kajsík^{1,2,3}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;

tom.talac@gmail.com

²Univerzita Komenského v Bratislave, Vedecký park, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava, Slovenská republika

³Medirex Group Academy n.o., Novozámocká 1/67, 949 05 Nitra, Slovenská republika

Abstract

Phage therapy of skin infections in patients with diabetic foot

Diabetic foot syndrome is one of the most common chronic complications of diabetes mellitus and is manifested by diabetic ulcers that arise as a result of neuropathy, angiopathy, and associated ischemia and infection. The healing of skin wounds is often complicated by infections caused by multidrug-resistant bacteria that show resistance to commonly used antibiotics. Such bacteria include *Klebsiella* spp. The development of new and alternative approaches to the treatment of bacterial infections is therefore currently needed. Phage therapy represents a promising alternative or complementary therapeutic approach to antibiotic therapy because phages have many advantageous properties over antibiotics. Before their use in therapy, bacteriophages must be purified and well characterized to ensure their efficacy and safety. In this work, we focused on the isolation, purification, and characterization of new lytic bacteriophages from wastewater infecting *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* strains obtained from diabetic foot ulcers.

Keywords: phage therapy; skin infections; *Klebsiella*; diabetic foot; antibiotic resistance

Úvod a formulácia cieľa

Syndróm diabetickej nohy je jednou z najčastejších chronických komplikácií diabetes mellitus a prejavuje sa diabetickými vredmi, ktoré vznikajú v dôsledku neuropatie, angiopatie a ischémie. Hojenie diabetických vredov je do značnej miery oneskorené sprievodnou bakteriálnou infekciou. Antibiotická liečba infikovaných vredov je komplikovaná vzhľadom na trend zvyšujúcej sa multirezistencie baktérií a ich biofilmov voči tomuto typu terapie. Skupina obávaných baktérií ohrozujúcich pacientov s diabetickou nohou sa označuje skratkou ESKAPE, a medzi tieto baktérie patrí aj *Klebsiella* spp. V súčasnosti je preto potrebný vývoj nových možností liečby bakteriálnych infekcií [1, 2].

Fágová terapia sa považuje za alternatívny prístup k liečbe infikovaných a ťažko sa hojajúcich rán. Oproti bežným liečebným metódam ponúka niekoľko výhod. Medzi najdôležitejšie patrí presné zacielenie liečby na dané patogény a zabránenie vzniku bakteriálnej rezistencie. Výsledkom je výrazné zníženie infekcie v procese hojenia diabetických vredov. Za účelom zaistenia čo najvyššej bezpečnosti fágovej terapie, predídienia jej možným vedľajším účinkom, a zároveň zabezpečenia jej vysokej účinnosti je kľúčové charakterizovať použité

bakteriofágy. Fágová terapia kožných infekcií u pacientov trpiacich syndrómom diabetickej nohy môže rozšíriť možnosti liečby tohto problematického stavu, a tým výrazne zlepšiť kvalitu života pacientov v budúcnosti [3].

V tejto práci sme sa zamerali na izoláciu, purifikáciu a charakterizáciu nových bakteriofágov izolovaných z čističiek odpadových vôd, ktoré špecificky infikujú kmene *Klebsiella pneumoniae* a *Klebsiella oxytoca* izolované z rán pacientov s diabeticou nohou. Takéto charakterizované fágy môžu byť potenciálne použité na terapiu buď samostatne, alebo v kombinácii s inými terapeutickými prístupmi.

Materiál a metódy

V práci sme na kultiváciu bakteriálnych kmeňov použili tuhé alebo tekuté kultivačné LB (Luria-Bertani/ *lysogeny broth*) médium. Na koncentrovanie bakteriofágov sme použili 10 % roztok polyetylénglykola (PEG) s 1 mol/l NaCl. Na purifikáciu fágov ultracentrifugáciou v hustotnom gradiente sme použili chlorid cézny s koncentráciami 0,8 g/ml, 1 g/ml a 1,2 g/ml.

Ako indikátorové kmene sme použili bakteriálne kmene *Klebsiella pneumoniae* 3771B a *Klebsiella oxytoca* 1859B, ktoré boli izolované z rán pacientov s diabeticou nohou v nemocnici v Malackách. Hostiteľskú špecifickosť bakteriofágov sme stanovili na súbore 73 bakteriálnych kmeňov zo zbierok VP UK a PriF UK, zaradených do rodov *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter* a *Escherichia*.

Počas experimentov sme používali metódy izolácie bakteriofágov z odpadovej vody, amplifikácie bakteriofágov a stanovenia fágového titra na dvojitém agare. Purifikáciu fágov za účelom získania čistého fágového preparátu sme dosiahli viacnásobným odpichnutím jednotlivých plakov z dvojitého agaru, zrážaním bakteriofágov polyetylénglykolom a ultracentrifugáciou fágov v hustotnom gradiente chloridu cézneho s následnou dialýzou.

Purifikované fágy sme použili na stanovenie hostiteľskej špecifity, teplotnej stability a adsorpcie bakteriofágov. Určili sme aj optimálnu multiplicitu infekcie (MOI), životný cyklus a antimikrobiálnu aktivitu bakteriofágov v tekutom živnom médiu. Pri charakterizácii bakteriofágov sme izolovali fágovú DNA pomocou Phage DNA Isolation Kit (Norgen Biotek Corp.) Purifikované DNA sme sekvenovali pomocou prístroja MiSeq (Illumina, USA) s použitím v2 300 cyklovej chémie a Nextera XT protokolu na prípravu knižnice krátkych čítaní. Vytvorené celogenómové sekvencie sme použili na taxonomické zaradenie fágov, anotáciu ich genómov a prípravu špecifických primerov. Krížovou výmenou navrhnutých primerov komplementárnych k príslušnej sekvencii každého fága sme overili špecifickosť PCR a jej produkty sme vizualizovali v 1 % agarózovom géli.

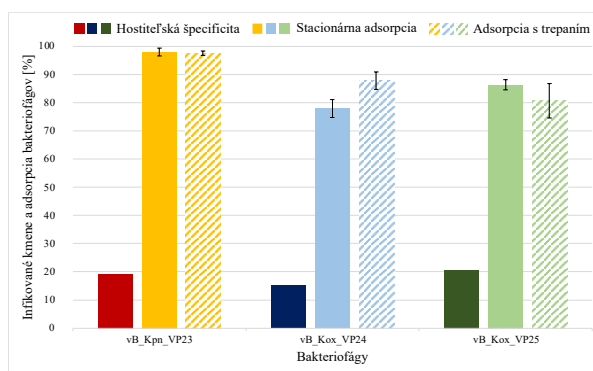
Výsledky a diskusia

Z čističiek odpadových vôd sa nám podarilo izolovať bakteriofágy amplifikáciou na indikátorových kmeňoch *K. pneumoniae* 3771B a *K. oxytoca* 1859B (Tab. 1). Z odpadovej vody sme získali fágy vB_Kox_VP24 a vB_Kox_VP25 schopné infikovať *K. oxytoca* 1859B. Fág vB_Kpn_VP23 bol schopný lyzovať *K. pneumoniae* 3771B. V procese purifikácie sme dosiahli titre uvedené v Tab. 1.

Tab. 1. Zoznam bakteriofágov izolovaných z odpadových vôd

Názov bakteriofága	Zdroj	Indikátorový kmeň	Titer [PFU/ml]
vB_Kpn_VP23	Senica	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 3771B	5×10^{10}
vB_Kox_VP24	Senica	<i>Klebsiella oxytoca</i> 1859B	$2,8 \times 10^{11}$
vB_Kox_VP25	Devínska Nová Ves	<i>Klebsiella oxytoca</i> 1859B	$2,2 \times 10^{11}$

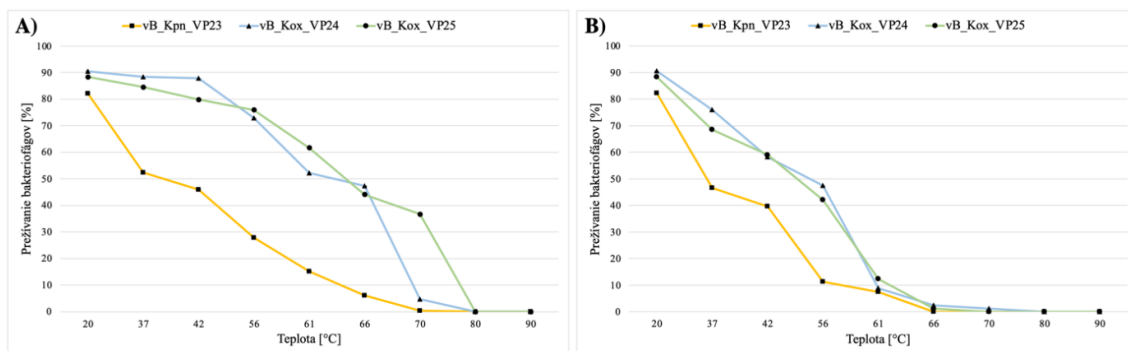
Schopnosť fágov infikovať a lyzovať bakteriálne kmene sme stanovili na súbore 73 kmeňov rôznych baktérií pomocou kvapkového testu na dvojtom agare. Najširšiu hostiteľskú špecificitu vykazoval fág vB_Kox_VP25 (20,55 %) a najužšie spektrum hostiteľov mal fág vB_Kox_VP24 (15,07 %) (Obrázok 1). Z dôvodu relatívne úzkej hostiteľskej špecificity sme sa zamerali na stanovenie miery adsorpcie na indikátorových kmeňoch počas 10 minút a laboratórnej teplote 22 °C pri stacionárnej kultivácii, a pri kultivácii s trepaním (200 otáčok/min.). Najvyššiu adsorpciu preukázal fág vB_Kpn_VP23, až 98,06 % v pokoji. Najnižšiu adsorpciu dosiahol fág vB_Kox_VP24 (77,91 %), taktiež v pokoji (Obr. 1).



Obr. 1. Hostiteľská špecificita a adsorpcia bakteriofágov

V ďalšej časti práce sme fágy vystavili rôznym teplotám v rozsahu 20 – 90 °C po dobu 5, 30 a 60 minút a stanovili ich teplotnú stabilitu pri týchto podmienkach. Teplotne najstabilnejší sa javil fág vB_Kox_VP25, ktorý bol počas 5 minút stabilný až do teploty 70 °C (36,7 % prežívanie), a taktiež vykazoval vyššiu stabilitu počas 60 minút do teploty 61 °C (12,36

% prežívania) oproti fágovi vB_Kox_VP24 (8,83 %). Oba fágov však mali veľmi podobnú a zároveň vyššiu teplotnú stabilitu oproti fágovi vB_Kpn_VP23, ktorý bol stabilný do teploty 56 °C po dobu 60 minút (11,30 %). Po prekročení týchto teplôt fágov degradovali (Obr. 2).

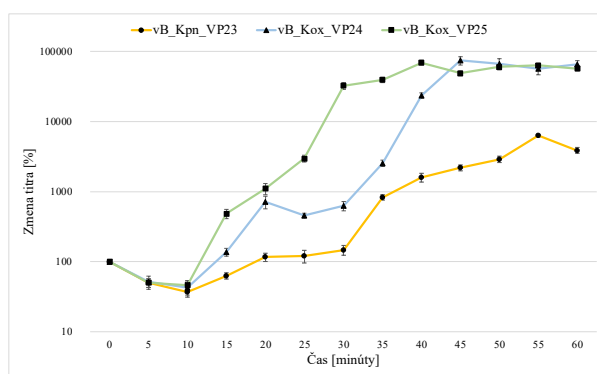


Obr. 2. Teplotná stabilita bakteriofágov po dobu A) 5 minút a B) 60 minút

Pre každého fága sme zostrojili jednokrokovú rastovú krivku, pomocou ktorej sme určili rastové parametre jednotlivých fágov (Tab. 2). Na základe získaných hodôt môžeme tvrdiť, že životný cyklus a latentná perióda fágov *K. oxytoca* sú kratšie a dochádza k produkcii väčšieho počtu nových viriónov v porovnaní s bakteriofágom vB_Kpn_VP23 (Obr. 3).

Tab. 2. Rastové parametre jednotlivých bakteriofágov

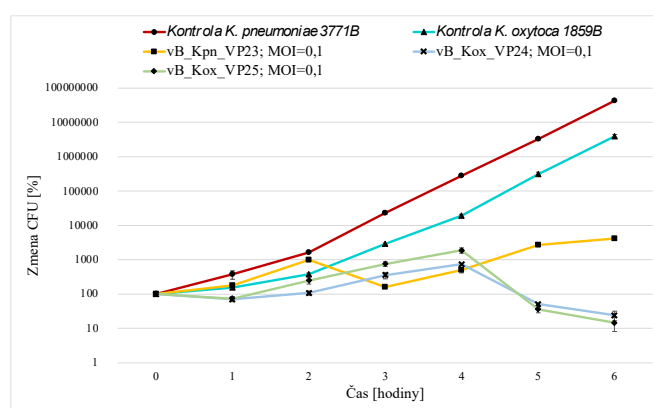
Bakteriofág	Miera adsorpcie [%]	Latentná perióda [min.]	Životný cyklus [min.]
vB_Kpn_VP23	63,19	20	55
vB_Kox_VP24	57,08	15	45
vB_Kox_VP25	53,69	10	40



Obr. 3. Životné cykly bakteriofágov znázornené rastovými krivkami

Pri skúmaní schopnosti lytických bakteriofágov potláčať bakteriálny rast sme indikátorové kmene kultivovali spoločne s fágmi počas 6 hodín, počas ktorých sme každú

hodinu odobrali vzorku kultúry. Antimikrobiálna aktivita je jedným z dôležitých parametrov pri použití fágov za účelom eliminácie patogénov. Fágy vB_Kox_VP24 a vB_Kox_VP25 infikujúce *K. oxytoca* efektívnejšie inhibovali exponenciálny bakteriálny rast oproti fágu vB_Kpn_VP23 infikujúci *K. pneumoniae*. Po 6 hodinách po pridaní fága k tekutej bakteriálnej kultúre s koncentráciou buniek 10^4 CFU/ml a multiplicitou infekcie MOI=0,1, dosiahla koncentrácia buniek v prípade použitia fágov *K. oxytoca* len 14,70 – 24,17 % z pôvodnej koncentrácie pri začatí meraní. V prípade fága vB_Kpn_VP23 došlo k nárastu počtu baktérií po 6 hodinách približne 41-násobne, nakoľko nebol schopný inhibície exponenciálneho rastu tak efektívne a dlho, ako ostatné skúmané fágy (Obr. 4).

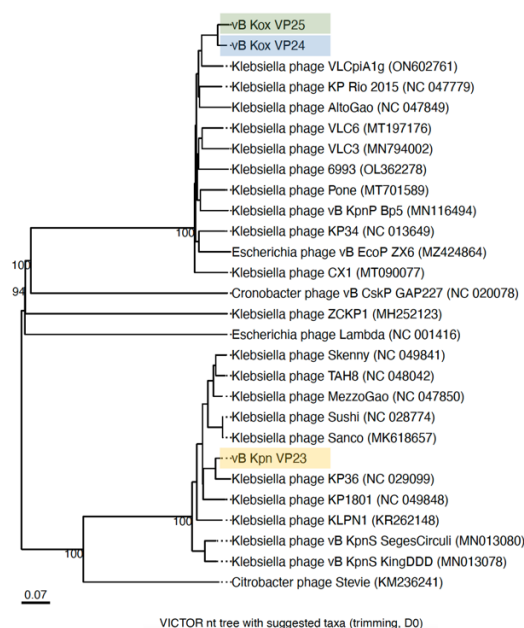


Obr. 4. Antimikrobiálna aktivita fágov pri počiatočnej koncentrácii buniek 10^4 CFU/ml

Bakteriofágy sme charakterizovali aj *in silico*, pomocou bioinformatických prístupov, ktoré zahŕňali anotáciu genómu každého fága nástrojmi RAST [4] a BLAST [5]. Analýzou celogenómových fágových sekvencií sme stanovili parametre genómov ako aj taxonomické zaradenie fágov (Tab. 3). Na základe podobnosti celogenómových sekvencií sme vyhľadali najbližšie príbuzné fágy ku každému izolovanému fágu. Vybrané fágy sme analyzovali pomocou fylogenetického a klasifikačného online nástroja prokaryotických vírusov VICTOR [6], ktorého výstupom bol fylogenetický strom. Fylogeneticky najbližší príbuzný k fágu vB_Kpn_VP23 je fág Klebsiella phage KP36. Fágy vB_Kox_VP24 a vB_Kox_VP25 sú vzájomne podobné, so spoločným príbuzným fágom Klebsiella phage VLCpiA1g (Obr. 5).

Tab. 3. Parametre sekvenovaných fágových genómov a taxonómia

Bakteriofág	Priemerné pokrytie	Veľkosť genómu [bp]	ORF	Obsah GC párov [%]	Taxonómia [rod]
vB_Kpn_VP23	2180x	48 589	75	51,3	<i>Webervirus</i>
vB_Kox_VP24	3783x	43 245	54	53,9	<i>Drulisvirus</i>
vB_Kox_VP25	4894x	42 629	56	53,4	<i>Drulisvirus</i>



Obr. 5. Fylogenetický strom príbuznosti bakteriofágov vB_Kpn_VP23, vB_Kox_VP24 a vB_Kox_VP24 vytvorený pomocou online nástroja VICTOR

Záver

Úspešne sa nám podarilo izolovať bakteriofágy z odpadovej vody, stanoviť ich hostiteľskú špecifickosť, schopnosť adsorpcie, teplotnú stabilitu a určiť ich životný cyklus a antimikrobiálnu aktivitu. Fágy sme charakterizovali taktiež na genómovej úrovni. Izolované fágy sú teplotne stabilné, špecificky infikujú a lyzujú kmene *K. pneumoniae* a *K. oxytoca* a môžu byť potenciálne použiteľné pre fágovú terapiu.

PodĎakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Výskum a vývoj využiteľnosti autonómnych lietajúcich prostriedkov v boji proti pandémie spôsobenej COVID-19, kód ITMS: 313011ATR9, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Brocco E., Ninkovic S., Marin M., et al. (2018) J. Cardiovasc. Surg. 59(5), p. 670
- [2] Mulani M. S., Kamble E. E., Kumkar S. N., et al. (2019) Front. Microbiol. 10(539), p. 1
- [3] Duplessis C. A., Biswas B. A. (2020) Antibiotics 9(7), p. 377
- [4] Aziz R. K., Bartels D., Best A. A., et al. (2008) BMC Genom. 9(75), p. 1
- [5] Altschul S. F., Gish W., Miller W., et al. (1990) J. Mol. Biol. 215(3), p. 403
- [6] Meier-Kolthoff J. P., Göker M. (2017) Bioinformatics 33(21), p. 3396

Produkcia LG3 domény rastlinného kalpainu DEK1 vo *Vibrio natriegens*

Hugo Trojanovský¹, Stanislav Voško¹, Júlia Šarkanová³, Viktor Demko² Zdenko Levarski^{1,3},
Stanislav Stuchlík^{1,3}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra Molekulárnej biológie, Ilkovičova 6, 841 04 Bratislava, Slovenská republika; hugotrojano@gmail.com

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyziológie rastlín, Ilkovičova 6, 841 04 Bratislava, Slovenská republika

³Vedecký park Univerzity Komenského v Bratislave, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Production of the LG3 domain of the plant calpain DEK1 in *Vibrio natriegens*

The production of recombinant proteins is one of the most important and developing areas in the field of molecular biology. The need to choose suitable conditions for production, such as the selection of suitable hosts, editing of expression vectors and, last but not least, financial requirements, is the most important step in the construction of large-capacity expression systems. *Vibrio natriegens* is considered to be the fastest growing free-living bacterium with a culture doubling time between 7 and 10 minutes under optimal conditions. Estimates of the number of ribosomes in *V. natriegens* are approximately 115,000 per cell in the exponential phase of growth, while in *E. coli* the number is estimated to be only 70,000–90,000, resulting in a higher rate of biomass synthesis and a stronger ability to synthesize proteins. In this study, we focus on the production of the LG3 domain from the plant calpain DEK1 precisely in *V. natriegens* strains, which can help in better production and purification of the produced domain.

Keywords: *Vibrio natriegens*; heterologic expression; Defective Kernel 1

Úvod a formulácia cieľa

V súčasnosti sa na produkciu rekombinantných proteínov využíva široká škála rôznych expresných systémov. Najčastejšie využívanými systémami sú bakteriálne expresné systémy a to hlavne pre ich nenáročnosť na manipuláciu a nízke náklady. Najznámejšími systémami sú bakteriálne kmene *E. coli*, a to vďaka ich dobre preskúmanému genómu, rýchlej reprodukovateľnosti a v neposlednom rade nízkej cene [1]. Na druhú stranu produkcia v týchto kmeňoch nie je vždy optimálna, hlavne pri produkcii tzv. „difficult-to-express“ rekombinantných proteínov. Do tejto kategórie môžeme zaradiť napríklad rôzne toxíny, veľké membránové proteíny, proteíny pochádzajúce z iných organizmov a podobne. Problémy pri produkcii takýchto proteínov bývajú často spojené s toxicitou pre hostiteľskú bunku, dochádza k nesprávnemu skladaniu produkovaných proteínov, čo môže byť spôsobené chýbajúcim posttranslačným aparátom. Pri transmembránových proteínoch môže byť problém ich veľkosť a hlavne nerozpustnosť, keďže sa z väčšej časti skladajú z hydrofóbných proteínov. Tieto nevýhody sa dajú obísť použitím iných expresných systémov počnúc kvasinkami, alebo rastlinnými a cicavčiami bunkami, avšak tie zas bývajú časovo aj finančne náročnejšie

a výťažky rekombinantných proteínov často nedosahujú výťažky v bakteriálnych systémoch [2].

Jedným z „difficult-to-express“ rekombinantných proteínov je aj rastlinný kalpaín *Defective kernel 1* (DEK1). Ten zohráva dôležitú úlohu pri vývoji rastlín a ich správnej priestorovej orientácii. V prípade neaktívneho, alebo deletovaného génu, dochádza k úmrtiu rastlinného embrya v skorom štádiu vývinu. DEK1 je cysteínová proteáza, ktorej aktivita je pravdepodobne závislá od kationov vápnika. Na štúdium vlastností DEK1 kalpaínu je nutná jeho nadprodukcia v optimálnom množstve a čistote. Pri produkcii v bežných kmeňoch *E. coli* dochádza často k jeho agregácii a vznikajú nerozpustné častice, tzv. inklúzne telieska, ktoré nie sú vhodné na ďalšie analýzy [3].

V tejto štúdii sa zameriavame na produkciu rekombinantnej domény LG3 z rastlinného kalpaínu DEK1, vlozenej do expresného plazmidu pJexpress, pri rôznych teplotách a médiách v bunkách *Vibrio natriegens*. Tieto kmene, oproti kultúram *E. coli*, vykazujú kratší čas rastu kultúry, vyššiu stabilitu produkovaných proteínov a aj možnú vyššiu rozpustnosť [4].

Materiál a metódy

Príprava elektrokompetentných buniek: Nočnú kultúru buniek *V. natriegens* sme na druhý deň preočkovali do 50 ml BHI.V2 média bez antibiotika a nechali rozrásť do $OD_{600} = 0,5$. Následne sme kultúru preliali do 50 ml skúmaviek a nechali odstáť na ľade po dobu 15 minút. Po uplynutí 15 minút sme bunky centrifugovali pri 4500 ot.min^{-1} 20 minút. Vzniknutý pelet sme rozpustili v 35 ml elektroporačného roztoku (680 mmol.l^{-1} sacharóza, 7 mmol.l^{-1} K_2HPO_4) a opäť centrifugovali po dobu 15 minút. Uvedené kroky sme zopakovali 3x. Následne sme bunky rozpustili v elektroporačnom roztoku do $OD_{600} = 20$ a bunky rozdelili do 1,5 ml skúmaviek, následne sme ich uchovávali pri -80°C .

Transformácia: Elektrokompetentné bunky *V. natriegens* PF sme rozmrazovali na ľade po dobu 10 minút potom sme pridali 2 μl plazmidovej DNA, konkrétne plazmidu pJexpress-LG3-mutMBP. Následne sme danú zmes preniesli do 0,1 cm kyviet. Kyvety sme preniesli do elektroporačného zariadenia BioRad Gene Pulser TM a nastavili parametre – 0,8 kV, 200 Ω a 25 μF . Po elektroporácii sme bunky inkubovali 4 hodiny v regeneračnom médiu v 1,5 ml skúmavke pri 28°C a 300 ot.min^{-1} . Po inkubácii sme zmes vysiali na misky s LB3 médiom a ampicilínom v koncentrácii $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a nechali rásť cez noc pri teplote 28°C .

Expresia: Pripravili sme si nočné kultúry buniek *V. natriegens* PF v médiách LB3, BHI.V2, TB.V2 a LB.V2 pri 37°C . Na druhý deň sme preočkovali 500 μl kultúry do 50 ml médií dvojmo a nechali rozrásť pri 37°C do $OD_{600} = 0,5$. Po dosiahnutí požadovaného OD sme

bunky indukovali pomocou IPTG v koncentrácii 1 mmol.l^{-1} , pričom sme z každého typu média nechali jednu kultúru produkovať na 37°C a druhú na 28°C . Vzorky sme odoberali každú hodinu po dobu 4 hodín.

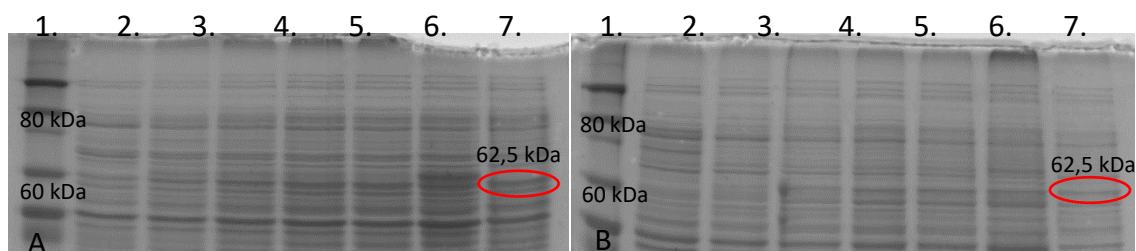
Homogenizácia ultrazvukom: Po skončení expresie sme kultúry zliali do 50 ml skúmaviek a centrifugovali pri maximálnych otáčkach 15 minút. Vzniknuté pelety sme potom rozpustili v 30 ml homogenizačného roztoku s obsahom 50 mmol.l^{-1} Tris-HCl a $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ NaCl. Takto pripravené skúmavky sme uložili na ľad a homogenizovali ultrazvukom na prístroji Homogeniser SONOPULS HD 3200 s nastavením amplitúdy 40 %, pulzom 15 sekúnd chladením 45 sekúnd po dobu 12 minút. Po skončení homogenizácie sme skúmavky centrifugovali, oddelili vzniknutý pelet a supernatant a odoberali vzorky.

SDS-PAGE: Z peletov po expresii sme odoberali vzorku, ktorú sme rozpustili v $40 \mu\text{l}$ roztoku TE a pridali $40 \mu\text{l}$ vzorkovacej farbičky. Zo supernatantu sme zobrali $40 \mu\text{l}$ a rovnako pridali $40 \mu\text{l}$ vzorkovacej farbičky. Separácia proteínov prebiehala v 12% tris-glycínovom géli, na ktorý sme do jednotlivých dráh naniesli $8 \mu\text{l}$ vzorky a $8 \mu\text{l}$ proteínového štandardu. Separácia prebiehala približne hodinu a pol.

Western blot: Na overenie prítomnosti produkovaného proteínu sme vykonali analýzu pomocou western blotu. Na N konci produkovaného proteínu sa nachádza 6x His-tag afinitná značka, na ktorú je schopná naviazať sa primárna protilátka (anti-his-mouse). Na túto protilátku je potom schopná naviazať sa sekundárna protilátka (anti-mouse-goat). Následne sa membrána s naviazanými protilátkami obmyje vo vyvolávacích roztokoch. Gél po SDS-PAGE sme nefarbili, ale použili na zloženie tzv. sendviča, ktorý sa skladal z 2 filtračných papierov, blotovacej membrány a gélu. Prenos prebiehal po dobu 1 hodiny na prístroji Fastblot B43 od spoločnosti Biometra. Po prenose sa membrána inkubovala s primárnou protilátkou cez noc pri 7°C . Na druhý deň sa membrána inkubovala 1 hodinu pri laboratórnej teplote so sekundárnou protilátkou. Po inkubácii a obmytí membrány vo vyvolávacích roztokoch sme výsledok vyvolali pomocou prístroja ImageQuant LAS 500.

Výsledky a diskusia

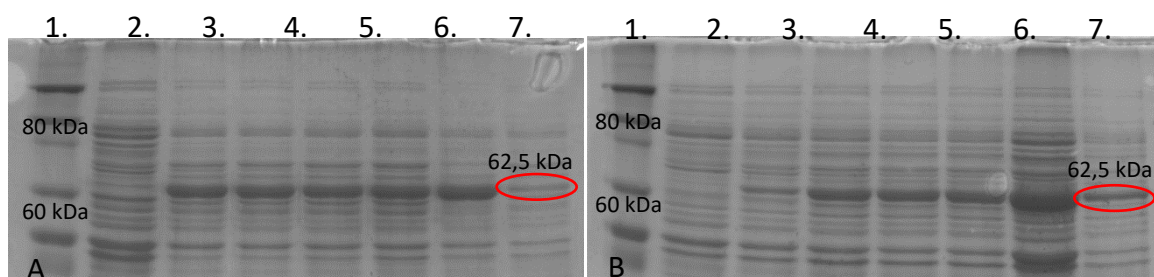
Na obrázku č. 1. môžeme vidieť produkciu LG3 domény v LB3 médiu pri teplotách 37°C a 28°C . LB3 médium, oproti iným médiám, obsahuje až 3% NaCl, čo je výhodné pri produkcii v kmeňoch *V. natriegens*, nakoľko tieto kmene rastú optimálne v prostredí s vyšším obsahom solí.



Obr. 1. Produkcia LG3 domény v LB3 médiu pri 37 a 28 °C

- A. 37 °C 1. proteínový štandard, 2. nultá hodina, 3. prvá hodina, 4. druhá hodina, 5. tretia hodina, 6. štvrtá hodina, 7. pelet, 8. supernatant
 B. 28 °C 1. proteínový štandard, 2. nultá hodina, 3. prvá hodina, 4. druhá hodina, 5. tretia hodina, 6. štvrtá hodina, 7. pelet, 8. supernatant

Ako z obrázka vyplýva, produkcia v tomto médiu nemala pozitívny vplyv na množstvo vyprodukovaného proteínu. V dráhe č. 8 kde sa nachádza rozpustná zložka, teda supernatant, môžeme vidieť len slabý prúžok, ktorý indikuje nízku rozpustnosť proteínu. Rovnako tak pri nižšej teplote nedochádzalo k zvýšenej produkcii rozpustnej frakcie proteínu. Ďalšia expresia LG3 domény prebiehala v BHI médiu (obr. 2.) s prídavkom V2 solí (204 mM NaCl, 4,2 mM KCl a 23,14 mM MgCl₂).



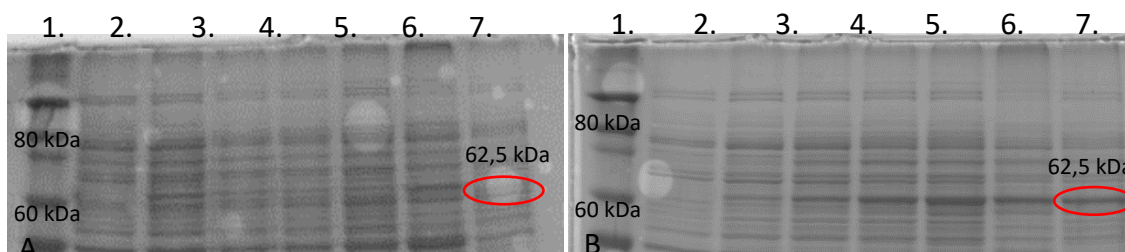
Obr. 2. Produkcia LG3 domény v BHI.V2 médiu pri 37 a 28 °C

- A. 37 °C 1. proteínový štandard, 2. nultá hodina, 3. prvá hodina, 4. druhá hodina, 5. tretia hodina, 6. štvrtá hodina, 7. pelet, 8. supernatant
 B. 28 °C 1. proteínový štandard, 2. nultá hodina, 3. prvá hodina, 4. druhá hodina, 5. tretia hodina, 6. štvrtá hodina, 7. pelet, 8. supernatant

Ako môžeme vidieť na tomto obrázku, produkcia LG3 domény prebiehala stabilne počas celej doby v oboch prípadoch, pri produkcii pri 28 °C je prúžok v rozpustnej frakcii o niečo viditeľnejší ako v prípade produkcie pri 37 °C. BHI.V2 médium, oproti LB3 médiu, obsahuje okrem NaCl aj podiel KCl a MgCl₂ solí, čo môže napomáhať lepšej produkcii spomínanej domény. Rovnako tak koncentrácia NaCl je oproti LB3 médiu nižšia, konkrétne pri LB3 je to približne 500 mM, kým pri BHI.V2 médiu je to len 204 mM. Pri porovnaní

s produkciu v LB3 médiu je viditeľné zlepšenie produkcie, z čoho môžeme usudzovať, že produkcia LG3 domény v BHI.V2 médiu je vhodnejšia ako v LB3 médiu.

Ako posledný typ média, sme zvolili TB médium s prídavkom V2 solí (obr. 3). Toto médium je oproti iným médiám bohatšie na živiny, vďaka čomu sa môžu dosiahnuť vyššie výťažky produkovaných proteínov, na druhú stranu zvýšená produkcia môže viesť k ich agregácii.

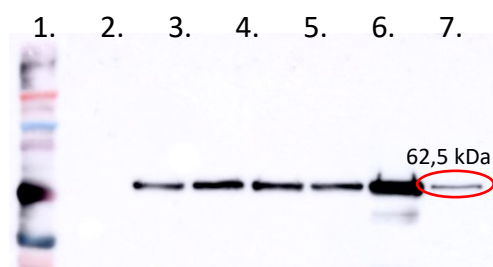


Obr. 3. Produkcia LG3 domény v TB.V2 médiu pri 37 a 28 °C

- A. 37 °C 1. proteínový štandard, 2. nultá hodina, 3. prvá hodina, 4. druhá hodina, 5. tretia hodina, 6. štvrtá hodina, 7. pelet, 8. supernatant
B. 28 °C 1. proteínový štandard, 2. nultá hodina, 3. prvá hodina, 4. druhá hodina, 5. tretia hodina, 6. štvrtá hodina, 7. pelet, 8. supernatant

Z obrázka 3. vyplýva, že produkcia pri 37 °C bola slabšia, prúžky sú menej viditeľné. Najsilnejší prúžok bol prítomný v 7. dráhe, ktorá reprezentuje nerozpustnú frakciu. V dráhe s rozpustnou frakciou môžeme vidieť len veľmi slabý prúžok, z čoho môžeme usúdiť, že v tomto prípade sa proteín produkoval skôr v nerozpustnej forme. Naopak, pri produkcii pri 28 °C môžeme vidieť postupné narastanie produkcie, pričom z gélu vyplýva, že najsilnejšia produkcia bola v 4 hodine. V dráhe obsahujúcej rozpustnú zložku môžeme vidieť výrazný prúžok, čo naznačuje, že daný proteín sa produkoval z časti v rozpustnej forme.

Aby sme si mohli byť istí, či sme produkovali správny proteín, vykonali sme analýzu pomocou western blotu.



Obr. 4. Analýza expresie pomocou western blotu z produkcie v LB3 médiu pri 37 °C

1. proteínový štandard, 2. nultá hodina, 3. prvá hodina, 4. druhá hodina, 5. tretia hodina, 6. štvrtá hodina, 7. pelet, 8. supernatant

Ako môžeme vidieť na obrázku 4., produkovaný proteín sa nám podarilo detegovať touto metódou. V 0. hodine sa nenachádza prúžok, vďaka čomu môžeme usúdiť, že sa nám podarilo úplne potlačiť bazálnu produkciu. V poslednej dráhe môžeme vidieť slabší prúžok, ktorý reprezentuje rozpustnú frakciu.

Záver

Pri produkcii zložitejších rekombinantných proteínov je vždy nevyhnutné zvoliť správny organizmus a podmienky kultivácie pri ich produkcii. V tejto štúdii sme sa zamerali na produkciu LG3 domény rastlinného kalpaínu DEK1. Z výsledkov môžeme usúdiť, že heterologická produkcia prebiehala vo všetkých zvolených médiách, avšak lepšie výsledky sme dosiahli pri produkcii pri 28 °C ako pri 37 °C. Môže to byť spôsobené zvýšenou agregáciou proteínov pri vyšších teplotách. Z vybraných kultivačných médií boli najlepšie výsledky dosiahnuté pri použití BHI média s prídavkom V2 solí. Takisto dobré výsledky sme pozorovali pri použití bohatšieho TB média, opäť s prídavkom V2 solí. Naopak produkcia v LB3 médiu vykazovala nižšiu produkciu ako pri ostatných médiách. Na záver sa nám úspešne podarilo potvrdiť produkovaný proteín pomocou western blotu.

PodĎakovanie

Príspevok je výsledkom realizácie projektov APVV-17-0570, APVV-21-0227, grantu UK/377/2022 a LISPER (ITMS2014:313011V446) na základe podpory operačného programu Integrovaná infraštruktúra financovaného z ERDF.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Khoo O., Suntrarachun S. (2012). Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2(2), p. 159
- [2] Fischer R., Stoger E., Schillberg S., et. al. (2004). Curr. Opin. Plant Biol. 7(2), p. 152
- [3] Lid S. E., Gruis D., Jung R., et. al. (2002). Proc. Natl. Acad. Sci. 99(8), p. 5460
- [4] Des Soye B. J., Davidson S. R., Weinstock M. T., et. al. (2018). ACS Synth. Biol. 7(9) p. 2245

Intro do analýzy environmentálnej DNA zo sedimentov plies Mlynickej doliny

Kornélia Tuhřinová¹, Ondrej Vargovčik¹, Fedor Čiampor Jr.^{2,3}, Zuzana Čiamporová-Zaťovičová^{1,2}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra ekológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava; tuhrinova1@uniba.sk

²Centrum biológie rastlín a biodiverzity Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Oddelenie biodiverzity a ekológie, Zoolab, Dúbravská cesta 9, 845 23 Bratislava

³Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra zoológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava

Abstract

The first results of the environmental DNA analysis from the lake sediments of Mlynská valley

Glacial lakes were formed in the Tatra Mountains as remnants of the last glaciation. These unique but highly vulnerable and threatened aquatic habitats contribute significantly to regional biodiversity and the preservation of ecosystem services. They, therefore, deserve protection, and proper monitoring. As a follow-up to the previous faunistic and ecological research of Tatra lakes, within this study, we focused on the use of innovative methods of environmental DNA (eDNA) analysis from recent lake sediments using metabarcoding. As a result, 85 operational taxonomic units (OTUs) were recognized and classified into 5 phyla, 10 classes, 21 orders, 33 families, 57 genera and 55 species. The results outlined that eDNA metabarcoding has great potential for monitoring of the status of such ecosystems as glacial lakes. Subsequently, presented data will be supported with more data from additional seasons and localities.

Keywords: metabarcoding; eDNA; alpine lakes; sediments; invertebrates

Úvod a formulácia cieľa

V posledných rokoch čoraz viac pozorujeme a uvedomujeme si enormnú stratu biodiverzity, ktorá ovplyvňuje taxonomické zloženie rôznych spoločenstiev organizmov na celom svete. Biotopy a ich spoločenstvá sú ohrozené najmä vplyvom klimatických zmien a v dôsledku antropogénneho stresu. K najviac ohrozeným vodným biotopom patria podhorské a horské sladkovodné ekosystémy [1]. Tatry, ako aj tatranské jazerá, sa stali objektom výskumu rôznych vedných odborov vďaka ich unikátnosti, ako aj značnej rôznorodosti na geograficky relatívne malom území. Na štúdie z tatranských plies vychádzajúce z konvenčných metód výskumu [2] postupne čoraz viac nadväzujú práce využívajúce inovatívne molekulárno-genetické metódy [3].

DNA metabarkóding umožňuje rýchle a robustné sekvenovanie DNA z rôznych typov vzoriek životného prostredia, ako je napríklad pôda, voda, vzduch, sneh, alebo sedimenty. Takáto DNA sa označuje ako environmentálna DNA (eDNA) [4]. Ukazuje sa, že v sedimentoch sa môže eDNA uchovať rádovo desaťročia až storočia [5]. V sedimentoch sa

prirodzene vyskytujú živé organizmy, ktoré sú pri výskume biodiverzity častokrát prehliadané, a to aj napriek tomu, že zvyčajne patria k druhovo aj početne veľmi bohatým taxonomickým skupinám. Ide najmä o zástupcov permanentnej fauny bezstavovcov, ktorí sú zvyčajne aj indikátormi zmien životného prostredia (napr. Nematoda, Ostracoda, atď.) [6]. Podľa publikovaných údajov môžu sedimenty poskytnúť odlišné a zároveň signifikantne bohatšie dáta ako napríklad eDNA zo vzoriek vody [7]. Taktiež predpokladáme, že niektoré doposiaľ podhodnocované taxonomické skupiny bentických organizmov, potenciálne významné z hľadiska zachovania biodiverzity a posudzovania stavu vodných ekosystémov, budú efektívnejšie detegované práve zo sedimentov.

Cieľom tejto práce je zhodnotiť prvé výstupy metabarkódingu eDNA zo vzoriek sedimentu troch vysokotatranských plies (Okrúhle pleso, Nižné Volie plesko, Štrbské pleso). Predpokladáme, že inovatívne metódy výskumu, založené na analýze DNA, umožnia rýchle získavanie spoľahlivých faunistických dát pri rutinnom sledovaní aj týchto vodných ekosystémov.

Materiál a metódy

Analyzované vzorky sedimentu z troch lokalít: Okružle pleso (2112 m n. m.; 0,72 ha), Nižné Volie plesko (1937 m n. m.; 0,05 ha), Štrbské pleso (1351 m n. m.; 19,67 ha) boli odobrané v septembri 2019. Všetky vybrané plesá sa nachádzajú v Mlynickej doline vo Vysokých Tatrách, majú rôzne hydromorfologické a fyzikálno-chemické charakteristiky a sú lokalizované v rôznych nadmorských výškach. Z každého odberového miesta bolo do 50 ml falkoniek odobratých 25 ml povrchového sedimentu, zvyšok bol doplnený 96 % etanolom na fixáciu DNA. Pre lepšiu spoľahlivosť výsledkov sa z každej lokality odobrali dva replikáty. Označené a parafilmom utesnené falkonky boli uložené v mraziacom boxe (-25 °C) do ďalšieho spracovania.

Na extrakciu eDNA zo sedimentov bol použitý DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), pričom eDNA sa extrahovala priamo zo sedimentu, z ktorého bola uvoľnená pomocou fosfátového pufru (soil pufo) [8]. Krátke fragmenty mitochondriálneho génu pre cytochróm c oxidázu podjednotku I (COI) boli amplifikované z každého DNA extraktu v dvoch replikátoch pomocou dvojkrokovej PCR. Prvá PCR, s použitím primerov „BR2“ (TCDGGRTGNCCRAARAAYCA) a „BF3“ (CCHGAYATRGCHTTYCCHCG) [9], je nevyhnutná na základnú amplifikáciu DNA barkódov. V druhej PCR boli použité rovnaké primery, ale obsahujúce DNA indexy na neskoršie odlíšenie vzoriek a adaptéry nevyhnutné pre Illumina MiSeq sekvenovanie. Pre každý PCR replikát bola zabezpečená jedinečná kombinácia

indexov v rámci sekvenačného behu. Finálne PCR produkty boli následne purifikované pomocou kitu Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Purifikované PCR produkty boli rovnomerne zmiešané do výslednej sekvenačnej knižnice na základe koncentrácie a dĺžky DNA fragmentov meraných fluorometrom Quantus™ (Promega) a vypočítaných pomocou softvéru Carestream. Následne prebehlo sekvenovanie v sekvenátore Illumina MiSeq na Chemickom ústave SAV s použitím kitu MiSeq® Reagent Kit v3 (600 cycle). Na bioinformatické a štatistické spracovanie získaných dát boli využité programy Cutadapt [10], mBRAVE [11], TaxonTableTools [12] a KronaTools [13].

Výsledky a diskusia

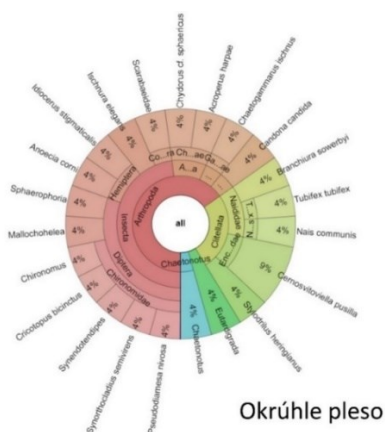
Zo 6 vzoriek sedimentu, odobratých na 3 lokalitách, sme získali spolu 40863 párov demultiplexovaných (rozdelných na jednotlivé vzorky podľa DNA indexov) čítaní. Vo výsledku bolo 85 operačných taxonomických jednotiek (OTUs) živočíchov, zistených na základe porovnania s referenčnými dátami z databázy BOLD [14], zaradených do 5 kmeňov, 10 tried, 21 radov, 33 čeľadí, 57 rodov a 55 druhov. Väčšina OTUs (54) patrila k rodom známym z fauny Tatier, na druhovej úrovni bola táto zhoda nižšia (30). Tieto počty sú ovplyvnené jednak vnútrodruhovými rozdielmi v sekvenciách markera, nedokonalosťami v referenčnej databáze DNA barkódov, a tiež zameraním predošlých prác.

U druhu máloštetinavca *Tubifex tubifex* (Müller, 1774) boli zaznamenané 4 OTUs a druh virníka *Rotaria rotatoria* (Pallas, 1766) bol determinovaný v rámci 3 OTUs. Druhy máloštetinavcov *Cernosvitoviella pusilla* Nurminen, 1973 a *Stylodrilus heringianus* Claparède, 1862, ako aj lastúrnečky *Bradleystrandesia reticulata* (Daday, 1898), brušnobrajka *Chaetonotus* aff. *heideri* Brehm, 1917 a hmyzu *Heterotrissocladius marcidus* (Walker, 1856) obsahovali po 2 OTUs. Tieto informácie môžu byť užitočné pre populačné štúdie, čo potvrdzuje druh *H. marcidus* s už preukázanou vysokou vnútrodruhovou variabilitou na území Tatier [15]. Pri niektorých OTUs absentovali podrobnejšie taxonomické informácie, čo naznačuje prítomnosť zatiaľ neopísanej diverzity a zároveň potvrdzuje potrebu budovania čo najkompletnejších a spoľahlivých referenčných databáz aj na lokálnej úrovni, ako napríklad AquaBOL [16].

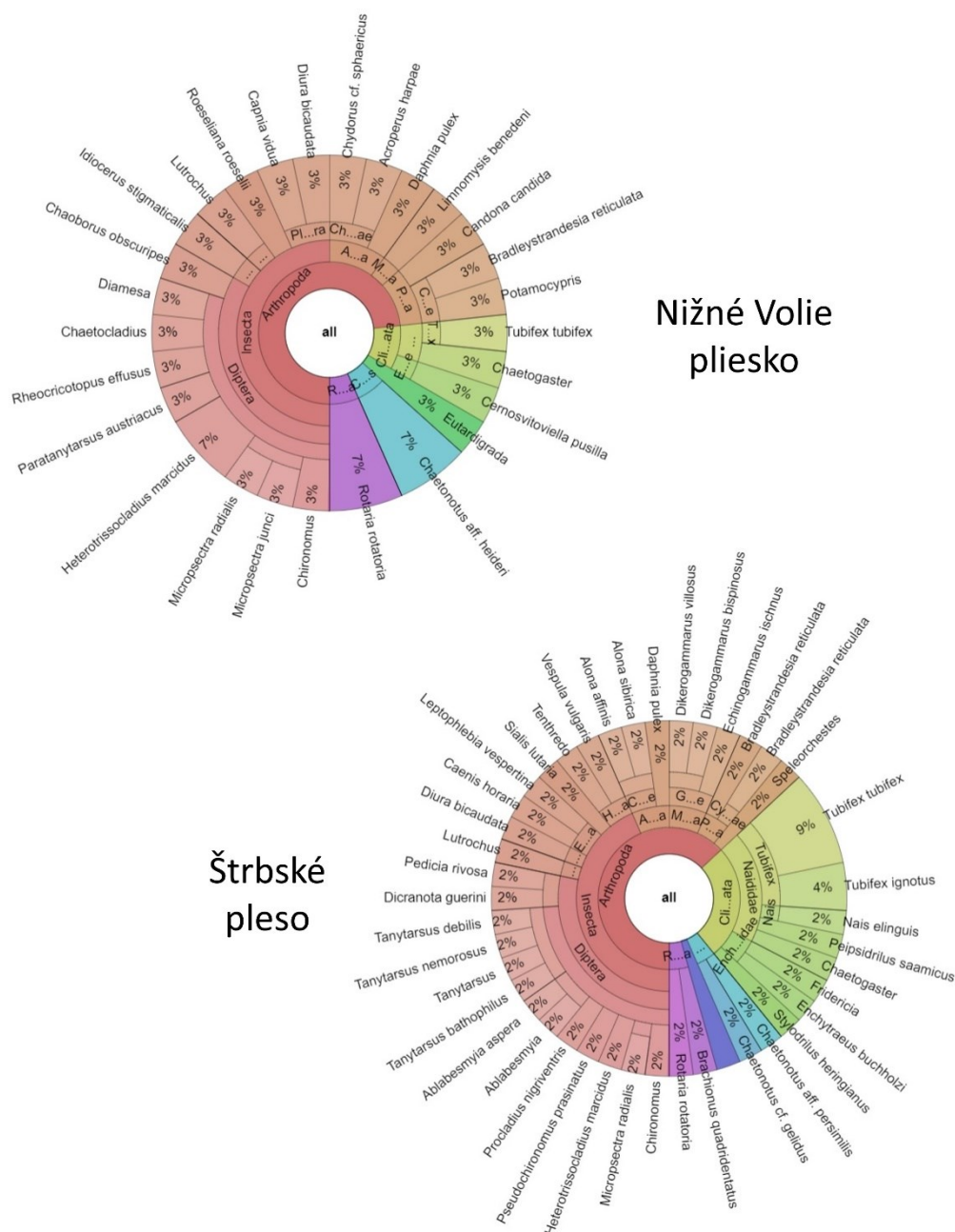
V podrobnejších analýzach bolo porovnaním PCR replikátov v rámci lokalít zistené, že v priemere zdieľajú iba 19,11 % OTUs, avšak toto číslo tvorí až 85,62 % čítaní. To znamená, že len málopočetné OTUs sú detegované nekonzistentne. Odlišnosti v replikátoch mohli byť spôsobené povahou PCR reakcie ako aj samotnou štruktúrou sedimentov. Napríklad jemné sedimenty sú z hľadiska chemických a fyzikálnych vlastností veľmi variabilné, čo sa následne

odráža v diverzite prítomného spoločenstva [17]. Tento výsledok zvyrazňuje potrebu vykonať viac opakovaných analýz vzoriek z každej lokality, aby bolo možné spoľahlivejšie stanoviť skutočné druhové zloženie. V najvyššie položenom Okrúhlom plese bolo zaznamenaných 23 OTUs a 15 druhov. V Nižnom Volom pliesku bolo detegovaných 30 OTUs a 20 druhov. V najnižšie položenom a najväčšom Štrbskom plese bolo zaznamenaných 46 OTUs a 33 druhov. Alfa diverzita v tomto prípade narastá s klesajúcou nadmorskou výškou. Dalo sa predpokladať, že v rozlohou najmenšom Nižnom Volom pliesku bude aj najnižšia druhová diverzita. Odlišný výsledok však vyzdvihuje unikátnosť rozlohou malých a málo preštudovaných pliesok [18].

Najviac zastúpenými skupinami boli vo všetkých troch plesách kmene Annelida a Arthropoda (Obr. 1.). Zachytenie práve týchto skupín je dané jednak špecifickosťou použitých primerov a dostatočným množstvom cieľovej DNA vo vzorke [19], ale najmä skutočnou dominanciou týchto živočíšnych skupín v benthickom spoločenstve, čo sa už viackrát potvrdilo tradičným hydrobiologickým výskumom [2, 18]. Metabarkódingová analýza sedimentov Štrbského plesa zachytila aj druh *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758), ktorý bol do Štrbského plesa introdukovaný [20]. Tiež boli identifikovaní zástupcovia vírnikov (Rotifera), brušnobrcov (Gastrotricha), lastúrníciok (Ostracoda), planktonických kôrovcov (Crustacea) a niekoľko terestrických organizmov. Rôznorodosť zachytených taxónov potvrdzuje potenciál moderných molekulárnych metód prispievať k výsledkom tradičného výskumu oživenia tatranských plies. Takéto metódy nám umožňujú rýchlo a bez nutnosti zdĺhavej a náročnej morfolologickej determinácie zachytiť makro- i mikroorganizmy, ako aj morfologicky takmer neodlíšiteľné druhy či ohrozené a nepôvodné druhy.



Obr. 1. Zloženie spoločenstva živočíchov v Okrúhlom plese, Nižnom Volom pliesku a Štrbskom plese
Oblúky a ich farebné odtiene odlišujú OTUs podľa zhody v taxonomickom zaradení od úrovne kmeňa (vnútorný oblúk) až po druh (vonkajší oblúk). Percentuálne podiely sú zaokrúhlené a reprezentujú prítomnosť jedného alebo viacerých OTUs z daného taxónu, nie jeho abundanciu.



Obr. 1. Pokračovanie

Záver

Predložená štúdia prináša úplne prvé výsledky analýz eDNA z povrchových sedimentov tatranských plies. V troch analyzovaných plesách sa podarilo zaznamenať 85 OTUs patriacich do 55 druhov z rôznych taxonomických skupín. Výsledky načrtli, že eDNA metabarkóding má veľký potenciál aj pre rutinné sledovanie stavu vodných ekosystémov práve pre jednoduchú aplikáciu a tiež absenciu odchyty a usmrcovania konkrétnych jedincov. Táto metóda sa síce stále vyvíja, ale už teraz poskytuje cenné ekologické informácie. Aj práce porovnávajúce klasické metódy biomonitoringu s inovatívnymi metódami poukazujú na

opodstatnenosť aplikovania DNA metabarkódingu pri výskume biodiverzity [21]. V budúcnosti doplníme tieto výsledky o dáta z ďalších tatranských plies. Taktiež bude zaujímavé porovnať tieto výsledky s výsledkami metabarkódingových analýz bentosu a eDNA z vodného stĺpca.

PodĎakovanie

Táto práca bola zrealizovaná s podporou projektu VEGA 2/0084/21. Ďakujeme všetkým kolegom zo Zoologického laboratória Centra biológie rastlín a biodiverzity SAV, v. i., ktorí pomáhali pri odbere vzoriek.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Bitušík P., Svitok M., Novikmec M., et al. (2017) *Hydrobiologia* 790, p. 287
- [2] Krno I. J., Šporka F., Galas J., et al. (2006) *Biologia* 61(18), p. 147
- [3] Čiamporová-Zaťovičová Z., Čiampor F. (2017) *Inland Waters* 7(1), p. 109
- [4] Taberlet P., Coissac E., Hajibabaei M., et al. (2012) *Mol. Ecol.* 21, p. 1789
- [5] Monchamp M. E., Spaak P., Domaizon I., et al. (2018) *Nat. Ecol. Evol.* 2, p. 317
- [6] Fjellheim A., Raddum G., Vandvik V., et al. (2009) *Adv. Limnol.* 62, p. 167
- [7] Pawłowski J., Bruce K., Panksep K., et al. (2022) *Sci. Total Environ.* 818, 151783
- [8] Taberlet P., Prud'homme S. M., Campione E., et al. (2012) *Mol. Ecol.* 21(8), p. 1816
- [9] Elbrecht V., Braukmann T. W. A., Ivanova N. V., et al. (2019) *PeerJ* 7: e7745
- [10] Martin M. (2011) *EMBnet.journal* 17, p. 10
- [11] Ratnasingham S. (2019) *Biodiversity Information Science and Standards* 2
- [12] Macher T. H., Beermann A. J., Leese F. (2021) *Mol. Ecol. Resour.* 21(5), p. 1705
- [13] Ondov B. D., Bergman N. H., Phillippy A. M. (2011) *BMC Bioinform.* 12(1), p. 385
- [14] Boldsystems.org [Citované: 10. marec 2023] <<https://boldsystems.org/index.php>>
- [15] Goffová K., Čiamporová-Zaťovičová Z., Čiampor F. Jr. (2015) *Biochem. Syst. Ecol.* 61, p. 329
- [16] AquaBOL.sk [Citované: 10. marec 2023] <<https://aquabol.sk/en/home/>>
- [17] Zheng B., Wang L., Liu L. (2014) *Microbiol. Res.* 169(7-8), p. 585
- [18] Hamerlík L., Svitok M., Novikmec M., et al. (2014) *Hydrobiologia* 723, p. 41
- [19] Deiner K., Bik H. M., Machler E., et al. (2017) *Molecular Ecology* 26, p. 5872
- [20] Nevický O. (1992) *Polnohospodárstvo (CSFR)* 38(3), p. 202
- [21] Abidin D. H. Z., Nor S. A. M., Lavouré S., et al. (2022) *Research Square*, p. 1

Návrh a konštrukcia expresných plazmidov pre produkciu kyseliny kanabigerolovej vo vybraných kvasinkách

Berenika Tulipánová, Lea Lukáčová, Adriána Dusíková, Kristína Mižáková, Bronislava Martinková, Timotej Šándor, Erik Mokroš, Sabina Houdeková, Ján Krahulec

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Ilkovičova 6, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
berenikatulipanova@gmail.com

Abstract

Designing and construction of expression vectors for production of cannabigerolic acid in yeasts
Cannabinoids are the most important constituents of the cannabis plant. Ever since the discovery of an endogenous cannabinoid system, research regarding the potential of production of cannabinoids in various microorganisms has rapidly increased. In this work we aimed to create optimized genes which encode prenyltransferase in yeasts *Pichia pastoris* and *Candida utilis*. After the initial isolation of cloning plasmids pUC57+CPT4-T and pUC57+PPT4-T, we were able to dissect these plasmids in order to obtain our desired genes. These genes were combined with specific expression vectors and therefore created an expression plasmids which will later on be inserted into chromosomes of our chosen yeasts. Verified clones will also undergo an expression analysis by qPCR and functional analysis.

Keywords: *Candida utilis*; *Pichia pastoris*; cannabinoids; cannabigerolic acid

Úvod a formulácia cieľa

Kanabinoidy predstavujú prirodzené látky vyskytujúce sa ako súčasť rastliny konope siate (*Cannabis sativa*). V dnešnej dobe sa ich terapeutické účinky využívajú na liečbu rôznych populačných ochorení, ako sú napríklad epilepsia, úzkosť, depresia, zápal a iné [1]. V rámci štúdia biosyntézy sa momentálne experimentuje s možnosťami produkcie kanabinoidov v mikrobiálnych kmeňoch. Ako jeden z najvhodnejších mikroorganizmov pre produkciu takýchto látok sa javia kvasinky. Kvasinky sú vhodným producentom hlavne vďaka rýchlemu rastu a jednoduchšej genetickej manipulácii, pri ktorej môžeme ich genóm upraviť pomocou rekombinantných techník [2].

Cieľom našej práce je vytvorenie špecifických konštruktov, ktoré budú schopné produkovať kyselinu kanabigerolovú (CBGA) v nami vybraných kvasinkách – *Pichia pastoris* a *Candida utilis*. Výber kvasiniek spočíva v ich pomerne dobrom genetickom preskúmaní, rýchlom raste na nenáročných médiách, ako aj v ich celkovom vysokom výťažku proteínov. Za samotnú tvorbu CBGA v kvasinkách sú zodpovedné synteticky optimalizované gény *CsPT4-T*, kódujúce túto prenyltransferázu. Gény sú zavádzané do expresných vektorov pomocou základných rekombinantných techník, pričom sú umiestnené pod kontrolou silného konštitutívneho promótoru P_{GAP}. Nami vytvorené konštrukty budú následne zavádzané do

chromozómu vybraných kvasiniek.

Materiál a metódy

Kmene a plazmidové vektory

Tab. 1. Použité kmene a plazmidové vektory, ich charakteristika a zdroj.

Názov	Charakteristika	Zdroj
<i>Escherichia coli DH5α</i>	F-φ80 <i>lacZΔM15ΔlacZYA-argF</i> U196 <i>endA1 hsdR17(rk-,mk+) recA1 supE44 thi-1</i> <i>gyrA96 relA1 phoA</i>	<i>Invitrogen</i>
<i>Escherichia coli XL1</i>	<i>endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac</i> <i>glnV44 F' [::Tn10 proAB⁺ lacI^q</i> <i>□(lacZ)M15] hsdR17(rk⁻mk⁺)</i>	<i>Stratagene</i>
<i>Escherichia coli TG90</i>	K-12 <i>supE hsd Δ5thi Δ[lac-proAB]</i> F' [<i>traD36 proAB lacIq lacZ ΔM15</i>] <i>penB80</i> <i>zad::TnIO</i>	KMB
pUC57+CPT4-T	<i>CPT4-T</i> ; Amp ^r ; rep(PMB1) ^R	<i>GenScript Gene Synthesis</i>
pUC57+PPT4-T	<i>PPT4-T</i> ; Amp ^r ; rep(PMB1) ^R	<i>GenScript Gene Synthesis</i>
pGAPZα C	P _{GAP} ; α-faktor SS, MCS, Myc, 6x HIS, AOX1 TT, P _{TEF1} , P _{EM7} , BleoR, CYCTT, ori	<i>Invitrogen</i>
pGE114	18S rDNA, P _{GAP} ; Inv, EK, 6x HIS, TD, GLC TT <i>loxP</i> ; P _{TEF1} , P _{EM7} , Zeo ^r , CYC TT, <i>loxP</i> , ori	KMB
pGC1	18S rDNA, PGAP, <i>CPT4-T</i> , GLC TT, <i>loxP</i> , PTEF1, PEM7, Zeor, CYC1 TT, <i>loxP</i> , ori	Táto práca

Enzýmy

Tab. 2. Zoznam použitých enzýmov, ich typ, názov a zdroj.

Typ	Názov	Zdroj
Restrikčné endonukleázy	<i>SaI</i> -HF	<i>New England Biolabs</i>
	<i>Sna</i> BI	
	<i>Bst</i> BI	
	<i>Age</i> I-HF	
Iné	T4 DNA ligáza	<i>New England Biolabs</i>
	<i>Shrimp</i> alkalická fosfatáza (<i>rSAP</i>)	<i>New England Biolabs</i>

Primery

Tab. 3. Zoznam použitých primerov, ich typ, názov a zdroj.

Názov	Použitie	Sekvencia (5' - 3')
MF13 F	Sekvenačná analýza	TGTAAAACGACGGCCAGT
MF13 R	Sekvenačná analýza	AGCGGATAACAATTTCACACAGGA

Kity

Tab. 4. Kity použité pri práci.

Názov kitu	Použitie	Zdroj
<i>NucleoSpin® Plasmid (NoLid)</i>	Izolácia plazmidovej DNA	<i>Macherey-Nagel</i>
<i>NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up</i>	Prečistenie extrakcie z gélu	<i>Macherey-Nagel</i>

Konštrukcia plazmidov

Syntéza génov *CsPT4-T* bola vykonaná spoločnosťou *GenScript Biotech Corporation, New Jersey, USA*, pričom navrhnuté gény sme si označili *CPT4-T* (gén pre *C. utilis*) a *PPT4-T* (gén pre *P. pastoris*). Gény kódujúce prenyltransferázu sme doplnili o špecifické miesta pre restričné endonukleázy, ktoré boli potrebné v nasledujúcich krokoch práce. Gény boli firmou zavedené do klonovacieho vektora pUC57.

Plazmid pUC57+*CPT4-T* sme transformovali elektroporáciou do elektrokompetentných buniek *E. coli* DH5α a plazmid pUC57+*PPT4-T* sme transformovali elektroporáciou do elektrokompetentných buniek TG90 s cieľom ich naklonovania. Elektroporáciu sme vykonávali pri parametroch: napätie 2,5 kV, odpor 200 Ω a kapacitancia 25 μF. Selekcii klonov sme vykonávali na tuhých LB platniach s ampicilínom o koncentrácii 100 mg.dm⁻³.

Plazmid pUC57+*CPT4-T* sme izolovali pomocou kitu *NucleoSpin® Plasmid (NoLid)* a následne štiepli príslušnými restričnými endonukleázami *SalI*-HF a *SnaBI* pri teplote 37 °C po dobu 1 hodiny. Po prebehnutí štiepanej reakcie sme pre izolovanie cieľových fragmentov DNA využívali proces extrakcie z agarózového gélu. Vyextrahované fragmenty sme prečisťovali pomocou kitu *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up*, pričom vyextrahovaný fragment mal veľkosť 984 bp a v nasledujúcich reakciách slúžil ako inzert.

Plazmid pGE114, ktorý slúžil ako expresný vektor sme poštiepli restričnými endonukleázami *SalI*-HF a *SnaBI* pri teplote 37 °C po dobu 1 hodiny. Súčasne sme plazmid

defosforylovali pomocou *Shrimp* alkalickéj fosfatázy *rSAP*.

V reakciách sme pokračovali ligáciou za pomoci T4 DNA ligázy. Ligačnú reakciu sme namiešali o molárnom pomere 1:5 (vektor : inzert) a nechali prebiehať počas noci pri laboratórnej teplote. Na druhý deň sme reakciu prečistili kitom *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* a transformovali do kmeňa *E. coli XLI*. Transformanty sme vysiali na tuhé médium LB a ako selekčný marker sme využívali antibiotikum zeocín o koncentrácii 10 mg.dm⁻³.

Výsledky a diskusia

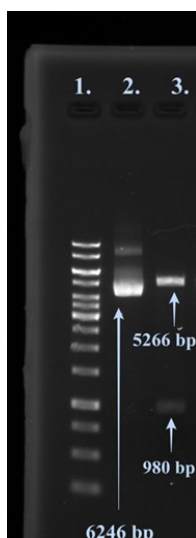
Gény pre produkciu kyseliny kanabigerolovej (CBGA) sme navrhli na základe výskumu vedeckého tímu Luo a kolektívu [3], pri ktorom autori zistili, že po odštiepení N-terminálnych častí prenyltransferázy (PT4-T) boli získané vyššie výťažky CBGA u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. V rámci našej práce sme úspešne navrhli optimalizované gény kódujúce prenyltransferázu v kvasinkách *C. utilis* (ozn. *CPT4-T*) a *P. pastoris* (ozn. *PPT4-T*). Gény sme doplnili o špecifické miesta pre restričné endonukleázy, ktoré budú využívané pri ligácii s vybranými expresnými vektormi, ktorých spoločnou vlastnosťou je, že optimalizované gény budú umiestnené pod kontrolou silného konštitučného promotora P_{GAP}. V prípade génu *CPT4-T* ide o miesta pre enzýmy *SalI*-HF a *SnaBI* a v prípade génu *PPT4-T* ide o miesta pre enzýmy *AgeI*-HF a *BstBI*.

Plazmidy pUC57+*CPT4-T* a pUC57+*PPT4-T* nesúce navrhnuté gény sme transformovali do buniek *E. coli*, pričom v tomto bode práce sme dosiahli 2 odlišné výsledky:

V prípade plazmidu pUC57+*PPT4-T* sme sa stretli s komplikáciami súvisiacimi s toxicitou plazmidu voči hostiteľským bunkám. Plazmid pUC57+*PPT4-T* sme transformovali do viacerých bunkových línií s neúspešným záverom. Transformáciu sme preto opakovali s bunkovou líniou TG90, ktorá disponuje schopnosťou pretvorenia vysokokópiových plazmidov na nízkokópiové, a to v prípade, že obsahujú ColE1 replikón. Pri spomínanom procese môže dochádzať ku vzniku mutácií, a preto sme plazmid pUC57+*PPT4-T* po transformácii overovali pomocou sekvenačnej analýzy s univerzálnymi primermi MF13. Výsledok sekvenačnej analýzy potvrdil autenticnosť našich sekvencií.

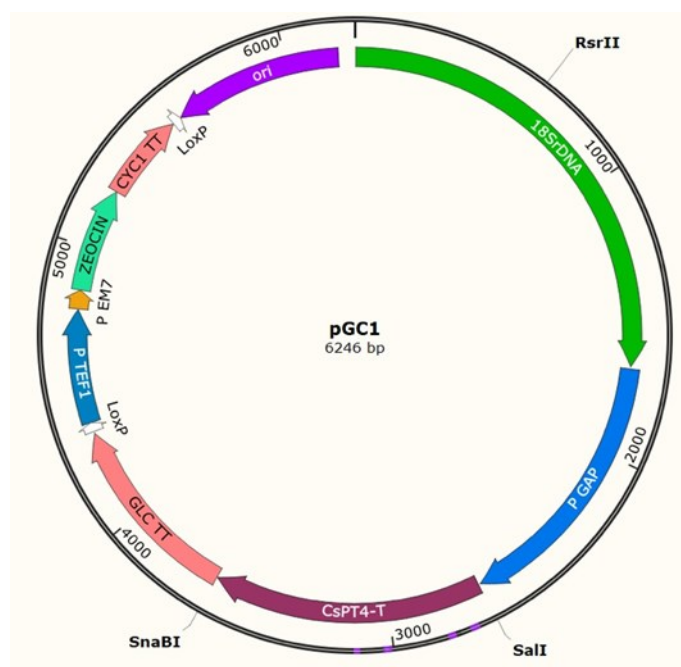
V prípade plazmidu pUC57+*CPT4-T* sme sa nestretli s problémom toxicity, a preto sme ho úspešne transformovali do buniek *E. coli* DH5α. Plazmid sme si následne vyizolovali pomocou kitu a poštípili pomocou príslušných restričných endonukleáz podľa postupu v kapitole Materiál a metódy. Výsledkom bol fragment o veľkosti 984 bp, predstavujúci gén *CPT4-T*, ktorý sme v nasledujúcich krokoch využívali ako inzert a ligovali s expresným vektorom pGE114, poštípeným rovnakými restričnými endonukleázami.

Pri správne prebehnutej ligačnej reakcii dochádzalo k vzniku expresného plazmidu pGC1. Plazmid pGC1 sme si vyizolovali pomocou kitu a následne overili jeho správnosť pomocou analytického štiepenia s restriknými endonukleázami *SalI*-HF a *SnaBI*. Analytické štiepenie potvrdilo autenticnosť nášho vytvoreného expresného plazmidu.



Obr. 1. Expresný plazmid pGC1 a výsledok analytického štiepenia plazmidu pGC1

Popis obrázka (zľava) – prvá dráha - *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (ThermoScientific, Waltham, MA), druhá dráha – neštiepený plazmid pGC1 o veľkosti 6246 bp, tretia dráha – plazmid pGC1 štiepený restriknými endonukleázami *SnaBI* a *SalI*-HF o veľkosti 5266 bp a 980 bp.



Obr. 2. Plazmid pGC1.

Schéma plazmidu pGC1 - zelená – 18srDNA, modrá – konštitutívny promótor P_{GAP}, vínová – gén *CsPT4-T*, lososová – GLC TT, biela – *loxP* miesto, tmavomodrá – promótor P_{TEF1}, žltá – prokaryotický promótor P_{EM7}, svetlo zelená – zeocínová rezistencia, ružová – CYC1 TT, biela – *loxP* miesto, fialová – miesto Ori.

V ďalšej práci budeme pokračovať zavádzaním plazmidu pGC1 do chromozómu divého kmeňa kvasinky *C. utilis* CCY 39-38-18. Jeho správne zabudovanie do chromozómu budeme overovať pomocou špecificky navrhnutých primerov. Následne sa zameriame na analýzu našich klonov pomocou metódy qPCR, kedy budeme overovať génovú dózu génov a ich expresiu.

V prípade plazmidu pUC57+PPT4-T budeme postupovať rovnako ako v prípade plazmidu pUC57+CPT4-T a teda jeho izoláciou, štiepením pomocou špecifických restričných endonukleáz a ligovaním s expresným vektorom pGAPZα C s cieľom vytvorenia expresného plazmidu pGP1. Vytvorený konštrukt budeme následne transformovať do divého kmeňa kvasinky *P. pastoris* a overovať jeho zabudovanie pomocou overovacej PCR so špecificky navrhnutými primermi.

Záver

V našej práci sa nám podarilo úspešne navrhnúť optimalizované gény pre tvorbu kyseliny kanabigerolovej v kvasinkách *Candida utilis* a *Pichia pastoris*. Rovnako sa nám podarilo vytvoriť expresný plazmid pGC1, ktorý bude v ďalšej práci zavádzaný miesto-špecificky do chromozómu divého kmeňa kvasinky *C. utilis*.

PodĎakovanie

Výsledky tejto práce boli získané aj vďaka projektu APVV-21-0076.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Ferber S. G., Namdar D., Hen-Shoval D., et al. (2020) Curr. Neuropharmacol. 18(2), p. 87
- [2] Kosalková K., Barreiro C., Sánchez-Orejas I. C., et al. (2023) J. Fungi. 9(2), p. 234
- [3] Luo X., Reiter M. A., d’Espaux L., et al. (2019) Nature. 567(7746), p. 123

Štúdium kombinovaného pôsobenia kofeínu a kvercetínu na ľudské bunky

Dajana Váňová¹, Terézia Zajičková¹, Stanislav Kyzek¹, Mária Petřková¹, Eva Horváthová², Eliška Gálová¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; vanova42@uniba.sk

²Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Ústav experimentálnej onkológie, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Study of combined effect of caffeine and quercetin on human cells

Caffeine and quercetin are both naturally occurring secondary metabolites with several biomedical properties, such as antioxidant, antimicrobial or anticancer. Recently, natural compounds and their combinations have become intensively investigated in order to identify more effective therapeutic strategies. The main advantages of combined treatment over conventional therapy are higher effectivity and fewer side effects. Studies have shown that quercetin and caffeine could be used as a potential anticancer drug in terms of the prevention as well as the therapy. The aim of our research is to analyse and evaluate effects of tested chemicals and their combinations on cell viability of non-cancerous (human lymphocytes) and cancerous cells (HepG2 cells) using trypan blue exclusion test and MTT assay, respectively.

Keywords: *quercetin; caffeine; cytotoxicity; human lymphocytes; HepG2; combined effect*

Úvod a formulácia cieľa

Rastliny sú hlavným zdrojom biosyntézy sekundárnych metabolitov. Tieto prírodné látky sa vyznačujú nízkou molekulovou hmotnosťou a významnými bioaktívnymi vlastnosťami [1].

Kofeín (C) (1,3,7-trimetylpurín-2,6-dión) je purínový alkaloid, ktorý je vo forme bieleho prášku, prípadne lesklých kryštálov. Má horkú chuť a je bez zápachu. Kofeín je najlepšie rozpustný vo vode, ale rozpustný je aj v etanole, acetóne alebo benzéne [2]. Káva je tvorená zmesou bioaktívnych zlúčenín vrátane kofeínu. Obsahuje antioxidanty a antimutagény, ktoré znižujú výskyt karcinogénnych chemikálií v epitelových bunkách čreva. Zdá sa, že káva prispieva k lepšej mobilite a funkcií čriev a tiež zvyšuje produkciu stolice. Vďaka antioxidantným vlastnostiam kofeínu, vo vysokých koncentráciách funguje ako vychytávač reaktívnych foriem kyslíka a aktivuje enzýmy dôležité pre opravu poškodenej DNA, čím znižuje frekvenciu mutácií [3]. Rovnako chráni bunky pred oxidačným stresom a reguluje bunkový cyklus. Kofeín znižuje zápal a pozitívne ovplyvňuje imunitné bunky akými sú T a B lymfocyty, *natural killer* bunky, ale aj makrofágy. Okrem toho kofeín moduluje črevnú mikroflóru, ktorá zohráva úlohu aj pri tvorbe kolorektálneho karcinómu. Výsledky veľkej kohortovej štúdie v USA naznačujú, že ľudia konzumujúci kofeínovú kávu majú výrazne nižšie

riziko vzniku kolorektálneho karcinómu [4].

Kvercetín (Q) je kategorizovaný ako flavonol, patriaci do skupiny flavonoidných zlúčenín. Jeho názov je odvodený od latinského slova *quercetum*, čo v preklade znamená dubový háj. Kvercetín má významné chemoprotektívne účinky v rôznych modeloch *in vitro* a *in vivo*. Medzi jeho protinádorové vlastnosti patrí predovšetkým schopnosť znižovať proliferáciu, indukovať apoptózu a inhibovať mitotické deje. Všetky tieto aktivity spôsobujú zastavenie bunkového cyklu. Spomínané vlastnosti zvyšujú potenciál kvercetínu v terapii nádorových ochorení [5]. Vážnym problémom pri liečbe onkologických ochorení je predovšetkým rezistencia nádorových buniek voči chemoterapii. Jedným z možných riešení je kombinácia liekov. Cieľom kombinovanej terapie je dosiahnuť synergické terapeutické účinky, znížiť potrebnú dávku a prípadnú toxicitu liečiv a zamedziť liekovej rezistencii. Kombinované terapie využívajúce flavonoidy a konvenčné chemoterapeutické lieky dokázali zvýšiť terapeutickú odpoveď v nádorových bunkách a znížiť vedľajšie účinky liečiv v zdravých bunkách. Vedci skúmali kombináciu 5-fluóruracilu (5-FU) a kvercetínu na nádorové bunky prsníka. Ich výsledky preukázali, že kvercetín je schopný synergicky zosilňovať účinok 5-FU, ktorý inhiboval rast a indukoval apoptózu bunkovej línie rakoviny prsníka MCF-7. Takáto kombinácia by z tohto dôvodu mohla mať veľký potenciál pri liečbe rakoviny prsníka [6].

Cieľom našej práce bolo porovnanie účinku rôznych koncentrácií kvercetínu v spolupôsobení s kofeínom na prežívanie nádorových (HepG2 bunky) aj nenádorových buniek (ľudské lymfocyty) a identifikovať prípadné interakcie medzi danými látkami za účelom ich potenciálnej aplikácie v medicínskej praxi pri liečbe nádorov.

Materiál a metódy

Cytotoxické účinky kofeínu, kvercetínu a ich kombinácie sme sledovali na nenádorových ľudských lymfocytoch izolovaných z periférnej krvi darcu prostredníctvom metódy *trypan blue exclusion test*. Lymfocyty sme získali metódou *finger-prick*. Do pripravených skúmaviek sme napipetovali 1 ml PBS a 50 µl krvi a tie sme nechali stáť na ľade 20 minút. Následne sme na dno každej skúmavky napipetovali 100 µl média Histopaque, ktoré slúži na izoláciu lymfocytov. Vzorky sme centrifugovali pri 4°C 5 minút (200 g), odobrali 200 µl oddelených lymfocytov (v prstenci) do nových skúmaviek a opätovne centrifugovali pri 4°C a 200 g 5 minút. Po centrifugácii sme pelet ovplyvnili testovanými látkami (1 ml) pri LT na 60 minút v tme, pričom koncentrácia rozpúšťadla (dimetylsulfoxid) predstavovala vo všetkých vzorkách obsahujúcich kvercetín 1 %. Ako negatívnu kontrolu sme použili bunky ovplyvnené PBS. Po ukončení ovplyvňovania sme testované látky odpipetovali

a k bunkám pridali 100 µl čerstvého PBS a bunky rozsuspendovali. K bunkovej suspenzii sme pridali farbičku (0,4 % trypanová modrá v PBS) v pomere 4:1 a nechali inkubovať 2 minúty. Bunky sme spočítali v hemocytometri pri 100x zväčšení a percento živých buniek sme vypočítali podľa vzorca:

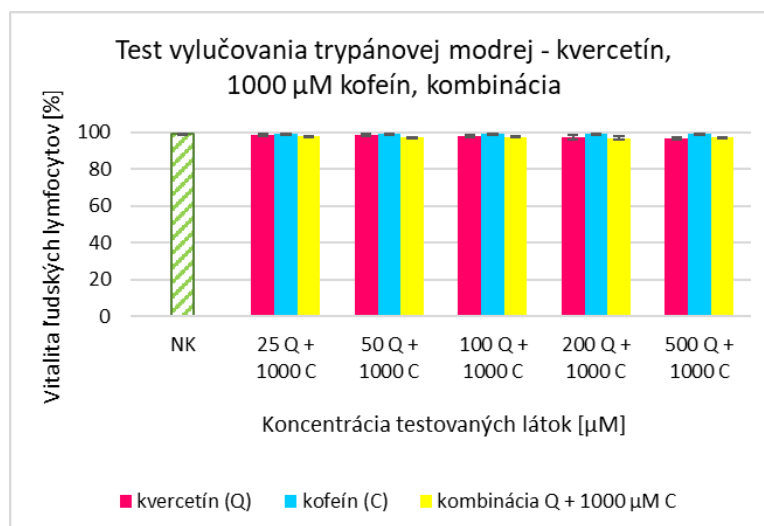
$$\text{percento živých buniek} = (\text{počet živých buniek} / \text{celkový počet buniek}) \times 100 \quad [\text{I.}]$$

Metódou *MTT assay* sme stanovili mieru prežívania nádorových buniek HepG2 po ovplyvnení kofeínom, kvercetínom a ich kombináciou. Pred začiatkom experimentu sme bunky HepG2 nasadili na 96-jamkové platničky (hustota buniek 2×10^4 /jamka) a inkubovali v DMEM médiu s prídavkom 10 % fetálneho bovinného séra a antibiotík (penicilín 200 U/ml a streptomycín 100 µg/ml) pri 37°C, v atmosfére s 5 % CO₂ 24 hodín. Následne sme bunky ovplyvnili jednotlivými koncentráciami látok, resp. DMEM médiom na 24 a 48 hodín. Ako kontrolu rozpúšťadla sme použili dimetylsulfoxid (1 %). Do vzoriek s kvercetínom a jeho kombináciou s kofeínom sme doplnili dimetylsulfoxid do finálnej koncentrácie 1 %. Po ukončení ovplyvnenia sme bunky inkubovali s 50 µl roztoku MTT (1 mg/ml) a 100 µl DMEM média 4 hodiny pri 37°C. Následne sme roztok MTT odstránili, do jamiek napipetovali 100 µl 100 % dimetylsulfoxidu a platničky umiestnili na trepačku na 15 – 20 minút. S využitím xMarkTM platničkového spektrofotometra sme odmerali absorbanciu vzoriek pri 540/690 nm a výsledné prežívanie buniek vypočítali podľa vzorca:

$$\text{percento živých buniek} = (\text{absorbancia}_{\text{vzorka}} / \text{absorbancia}_{\text{kontrola}}) \times 100 \quad [\text{II.}]$$

Výsledky a diskusia

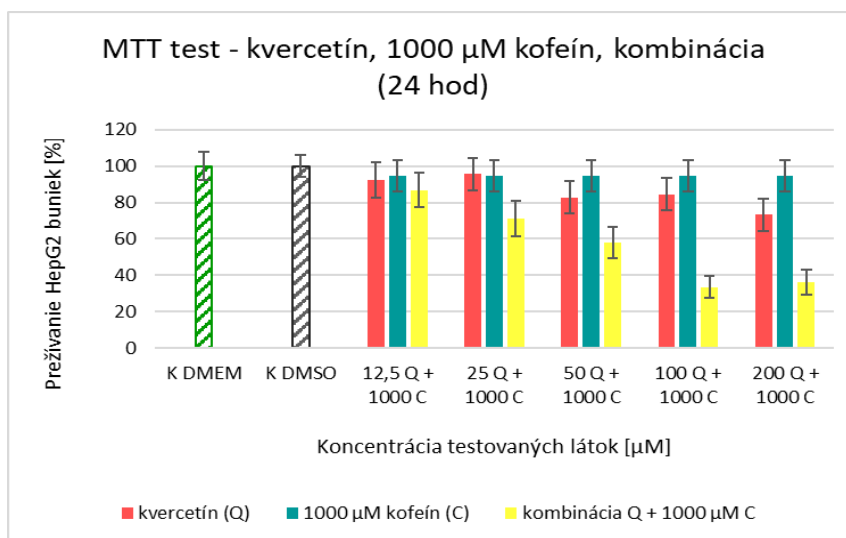
Testom vylučovania trypanovej modrej (*trypan blue exclusion test*) sme sledovali potenciálny cytotoxický efekt vybraných zlúčenín na ľudské lymfocyty. V experimentoch sme sledovali účinky viacerých koncentrácií kvercetínu (25; 50; 100; 200; 500 µM), 1000 µM kofeínu a ich vzájomné spolupôsobenie. Naše výsledky naznačujú, že ani jedna z testovaných látok v daných koncentráciách nepôsobila cytotoxicky. Percento prežívania lymfocytov ovplyvnených samotnými látkami dosahovalo hodnoty vyššie ako 90 %, rovnako ako aj v prípade kombinovaného pôsobenia (Q+C) (Obr. 1).



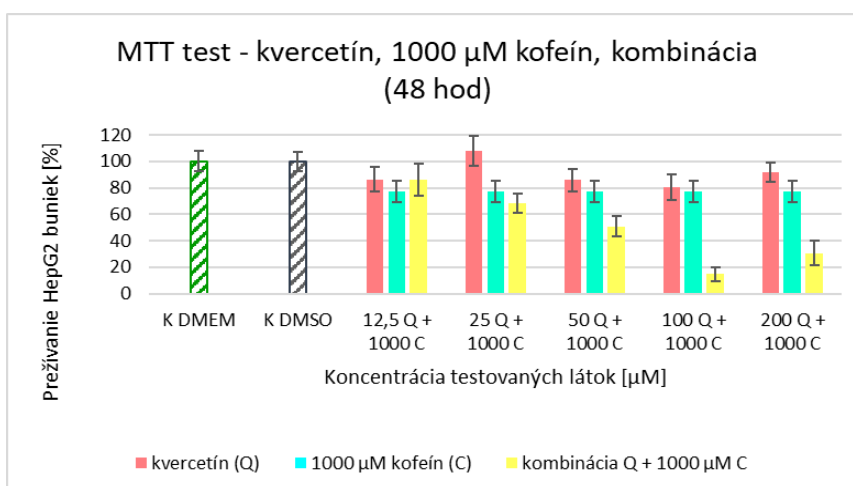
Obr. 1. Stanovenie vitality ľudských lymfocytov po 1 hod. ovplyvnení kofeínom (1000 µM), kvercetínom (25; 50; 100; 200; 500 µM) a ich kombináciou metódou *trypan blue exclusion test* Hodnoty v grafe sú priemernými hodnotami z min. troch experimentov ± smerodajná odchýlka. Negatívna kontrola (NK) – bunky ovplyvnené roztokom PBS

Prežívanie HepG2 nádorových buniek po ich ovplyvnení testovanými látkami sme stanovili pomocou *MTT assay*, ktorého princípom je redukcia žltého MTT (tetrazólievej soli) na fialový formazán prostredníctvom mitochondriálnych dehydrogenáz v živých bunkách. Vo vzorkách ovplyvnených samotným kvercetínom sme so stúpajúcou koncentráciou látky pozorovali pokles v prežívaní nádorových buniek, pričom tento trend bol jednoznačný len v prípade 24-hodinového ovplyvnenia (Obr. 2). Pri 48-hodinovom ovplyvnení kvercetínom (25 µM) mali bunky mieru prežívania $107,65 \% \pm 11,45$ čo bolo pravdepodobne spôsobené delením buniek. Zaujímavé je, že pri 200 µM kvercetíne sme zaznamenali rozdielne výsledky v rámci rôznych časov ovplyvnenia. Po 24 hodinách sa životaschopnosť buniek znížila na $73,21 \% \pm 9,07$ avšak pri 48 hod. ovplyvnení sme pozorovali prežívanie na úrovni $91,62 \% \pm 7,10$. HepG2 nádorová línia dosahovala vysokú mieru prežívania po 24-hodinovom ovplyvnení 1000 µM kofeínom, avšak po 48-hodinovom ovplyvnení vitalita HepG2 buniek klesla pod 80 % (Obr. 2 – 3). Pri spolupôsobení 1000 µM C s rôznymi koncentraciami Q sme sledovali po 24 hodinách nárast cytotoxicity so zvyšujúcou sa koncentráciou sledovaných látok. Najvýraznejší pokles prežívania v porovnaní s kontrolami K DMEM a K DMSO sme zaznamenali vo vzorkách s kombináciami 1000 µM C + 100 µM Q a 1000 µM C + 200 µM Q. Vitalita nádorových buniek dosahovala v tomto prípade hodnoty $33,55 \% \pm 6,16$ a $36,05 \% \pm 9,08$. Domnievame sa, že skúmané látky v daných koncentráciách môžu vykazovať synergické účinky, nakoľko pokles prežívania pri kombinovanom spolupôsobení bol oveľa výraznejší v porovnaní so samotnými látkami. Najvyššie prežívanie buniek ($86,84 \% \pm 9,35$) pri

spolupôsobení nadobudla kombinácia 1000 μM C s 12,5 μM Q (Obr. 2). Pri 48 hod. ovplyvnení sme získali podobný trend vitality HepG2 nádorových buniek ako pri 24 hod. ovplyvnení. V tomto prípade najviac cytotoxicky pôsobila na bunky kombinácia 1000 μM C so 100 μM Q. Prežívanie buniek bolo na úrovni $14,67\% \pm 5,16$. Najvyššie hodnoty prežívania sme zaznamenali vo vzorkách ovplyvnených kombináciou 1000 μM C s 12,5 μM Q a to v prípade oboch časov ovplyvnenia (Obr. 2 – 3).



Obr. 2. Stanovenie vitality HepG2 nádorových buniek po 24 hod. ovplyvnení kofeínom (1000 μM), kvercetínom (12,5; 25; 50; 100; 200 μM) a ich kombináciou prostredníctvom *MTT assay* Hodnoty v grafe sú priemernými hodnotami z min. troch experimentov $\pm$ smerodajná odchýlka. K DMEM – bunky ovplyvnené kultivačným médiom DMEM. K DMSO – bunky ovplyvnené 1 % DMSO



Obr. 3. Stanovenie vitality HepG2 nádorových buniek po 48 hod. ovplyvnení kofeínom (1000 μM), kvercetínom (12,5; 25; 50; 100; 200 μM) a ich kombináciou prostredníctvom *MTT assay* Hodnoty v grafe sú priemernými hodnotami z min. troch experimentov $\pm$ smerodajná odchýlka. K DMEM – bunky ovplyvnené kultivačným médiom DMEM. K DMSO – bunky ovplyvnené 1 % DMSO

Záver

Kombinované spolupôsobenie sekundárnych metabolitov predstavuje inovatívny a alternatívny prístup v prevencii a liečbe rôznych ochorení vrátane nádorových ochorení. Kombinácia kofeínu a kvercetínu nevykazovala cytotoxické účinky voči nenádorovým ľudským lymfocytom. Avšak rovnaké koncentrácie indukovali zníženie prežívania nádorových HepG2 buniek a v prípade kombinovaného pôsobenia vykazovali testované látky potenciálne synergické účinky. Skúmanie interakcií látok a ich kombinovaných účinkov je veľmi dôležité, nakoľko má práve kombinované pôsobenie látok potenciál pri liečbe nádorových ochorení v medicínskej praxi.

PodĎakovanie

Táto práca je finančne podporená grantmi APVV-18-0125 a VEGA 1/0460/21.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Cary J. W., Gilbert M. K., Lebar M. D., et al. (2018) Food Saf. (Tokyo) 6(1), p. 7
- [2] PubChem National Center for Biotechnology Information [Citované: 20. marec 2023]
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2519>>
- [3] Sartini M., Bragazzi N. L., Spagnolo A. M., et al. (2019) Nutrients 11(3), p. 694
- [4] Cui W. Q., Wang S. T., Pan, D., et al. (2020) World J. Gastrointest. Oncol. 12(2), p. 149
- [5] Reyes-Farias M., Carrasco-Pozo C. (2019) Int. J. Mol. Sci. 20(13), p. 3177
- [6] Mawalizadeh F., Mohammadzadeh G., Khedri, A., et al. (2021) Mol. Biol. Rep. 48, p. 7733

Foretické roztoče čeľade Parasitidae (Acari, Mesostigmata) asociované s rozkladajúcim sa živočíšnym materiálom

Katarína Vargová, Lucia Švecová, Peter Fend'a

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra zoológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; vargova374@uniba.sk

Abstract

Phoretic mites of the family Parasitidae (Acari, Mesostigmata) associated with decomposing animal material

Mites are a significant and frequently occurring group of arthropods present on decomposing organic matter, often in great numbers. They seek out these environments using phoresy, by attaching themselves to different insects to disperse. The family Parasitidae, which is discussed in this work, is a frequent group of mites appearing in such environments. Samples were collected using 15 insect traps (9 placed in the ground, 6 hanging from nearby trees) placed near a decomposing pig carcass. The pork was placed in the traps as bait. Ten species of Parasitidae were found with 3 only being determined to the genus level with the further determination needed. The most abundant species collected from the samples were *Poecilochirus carabi* and *Poecilochirus austroasiaticus*.

Keywords: Mesostigmata; Parasitidae; phoresy; mites; insect

Úvod a formulácia cieľa

Vďaka ich malým rozmerom sú roztoče síce nenápadnou, ale za to veľmi pestrou a druhovo bohatou skupinou pavúkovcov. Dajú sa nájsť v rôznych typoch habitatov, od vrcholov hôr, cez jaskyne, púšte, pôdu až po oceány. Podarilo sa im obsadiť takmer každý typ morského, sladkovodného i terestrického prostredia. Mesostigmata predstavujú najdiverzifikovanejšiu a najviac rozšírenú skupinu Parasitiformes. Ich telo, rozdelené na gnatozómu (predná časť) a idiozómu (zadná časť), je často dorzoventrálne sploštené, chránené z dorzálnej aj ventrálnej strany sklerotizovanými štítkmi [1].

Rozkladajúci sa organický materiál pre roztoče predstavuje síce bohaté, ale zato dočasné a rýchlo sa meniace prostredie na získavanie živín. Roztoče viazané na takýto typ prostredia sa živia baktériami, hubami či inými roztočmi alebo hmyzom. Ich malé a bezkrídle telo však obmedzuje schopnosť premiestňovania, a tak aj ich schopnosť vyhľadávať tieto habitaty, ktoré sú často od seba ďaleko vzdialené. Veľké množstvo roztočov tak využíva foréziu. Forézia je prichytenie sa jedného jedinca (roztoč) o iného (hmyz), vďaka ktorému môžu prekonať oveľa väčšie vzdialenosti. Asociácia roztočov s hmyzom je často špecifická, napríklad deutonymfy *Poecilochirus* sp. využívajú na prepravu chrobáky z rodu *Nicrophorus* sp. [2]. Pokiaľ je roztoč prichytený, neprijíma potravu, nerozmnožuje sa a ani sa nevyvíja [3]. Cieľom tohto výskumu bolo zachytiť klieštikovce z čeľade Parasitidae, ktoré sú významnou

skupinou roztočov na rozkladajúcich sa kadáveroch a využívajú na presun medzi nimi práve foréziu.

Materiál a metódy

Výskum prebiehal vo výskumnej stanici Šúr. Tento výskum nadväzoval na prebiehajúci výskum s kadáverom ošipanej, ktorý bol ponechaný prirodzenému rozkladu. V jeho blízkosti sa rozložilo spolu pätnásť pascí na hmyz s návnadou. Deväť pascí bolo umiestnených do zeme, zatiaľ čo zvyšných šesť bolo zavesených na okolité stromy. Pasce zavesené na stromy pozostávali z rozrezanej plastovej fľaše, pričom vrchná časť sa otočila a vložila do spodnej, aby sa predišlo úniku hmyzu. Na pasce uložené v zemi boli použité 0,5 l plastové poháre. Ako návnada sa do pascí vložilo 10-15 g surového bravčového mäsa, ktoré sa pri každom zbere vybralo a nahradilo čerstvým. Pasce umiestnené v zemi sa prikryli klieťkou, aby sa predišlo ich poškodeniu.

Zber materiálu prebiehal od 14. 4. - 9. 6. 2022. Materiál z pascí sa zbieral pravidelne raz do týždňa a uschoval sa v skúmavkách s 70% etylalkoholom alebo 4% formaldehydom. Odobrané vzorky sa roztriedili za použitia binokulárnej lupy a roztoče boli od ostatného materiálu oddelené a umiestnené do samostatných skúmaviek so 70% etylalkoholom. Z roztočov boli následne vyhotovené preparáty použitím média Liquido de Swan [4] pre podrobnejšie určovanie pod mikroskopom. Na určovanie roztočov boli použité kľúče Karg [5], Hruzová [6].

Na výpočet dominancie jednotlivých druhov bol použitý vzorec:

$$D = N_i / n * 100 (\%) \quad [1.]$$

pričom N_i vyjadruje počet jedincov taxonomickej skupiny a n celkový počet jedincov vo vzorke. Index dominancie bol hodnotený podľa Stockera a Bergmana [7]:

eudominantný druh: 31,7 – 100 %,

dominantný druh: 10,1 – 31,6 %,

subdominantný druh: 3,2 – 10 %,

recedentný druh: 1,1 – 3,1 %,

subrecedentný druh: 0 – 1,0 %.

Výsledky a diskusia

Analyzovaných bolo 120 pascí z 8 zberov. Spolu bolo nájdených 744 jedincov z čeľade Parasitidae (Tab. 1). Z druhov *Poecilochirus carabi* bolo získaných 414 jedincov, *Poecilochirus austroasiaticus* 273 jedincov, *Poecilochirus subterraneus* 15 jedincov a *Poecilochirus mrciaki* 1 jedinec. Z druhov *Cornigamasus lunaris* boli nájdené 4 jedince, *Gamasodes spiniger* 12 a *Parasitus coleoptratorum* 16 jedincov. Taktiež bolo odchýtených 5 jedincov *Parasitus* sp., ktoré pravdepodobne predstavujú dva druhy a 4 jedince *Pergamasus* sp., pre ktoré je nutná ďalšia determinácia.

Najdominantnejšími druhmi v rámci všetkých zberov celkovo boli *P. carabi* ($D = 55,65\%$) a *P. austroasiaticus* ($D = 36,7\%$). Oba druhy boli zaznamenané až od štvrtého zberu s nasledujúcimi hodnotami dominancie pre *P. carabi*: $D_4 = 65,33\%$; $D_5 = 62,44\%$, $D_6 = 59,93\%$, $D_7 = 17,78\%$, $D_8 = 57,14\%$; pre druh *P. austroasiaticus*: $D_4 = 10,6\%$; $D_5 = 36,1\%$, $D_6 = 38,1\%$, $D_7 = 17,44\%$. V prvom zbere sa podarilo získať len po 1 jedincovi *P. subterraneus* a *P. coleoptratorum*. Počas druhého a tretieho zberu neboli získané žiadne jedince čeľade Parasitidae. V poslednom, ôsmom, zbere bol najvyšší počet zistených druhov (7 druhov) a okrem eudominantného *P. carabi*, boli početne zastúpené aj dominantné druhy *P. coleoptratorum* ($D = 14,29\%$) a *G. spiniger* ($D = 12,86\%$).

Pasce boli umiestnené v blízkosti rozkladajúceho sa kadáveru, ktorého fázy rozkladu sa počas výskumu menili. Prvý zber bol robený ešte počas čerstvej fázy. Počas druhého zberu došlo k prechodu kadáveru do druhej (nafúknutej fázy), ktorá trvala aj počas tretieho zberu. V štvrtom týždni nastala tretia fáza (rozkladová), ktorá trvala aj počas piateho zberu. Počas šiesteho týždňa došlo k redukcii kadáveru na kostru, chrupavku a kožu (štvrtá, porozkladová fáza), ktorá trvala do konca výskumu s pascami.

Tab. 1. Počty roztočov v jednotlivých zberoch

Zber Druh	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
<i>P. carabi</i>	0	0	0	49	128	181	16	40
<i>P. austroasiaticus</i>	0	0	0	17	74	115	67	0
<i>P. subterraneus</i>	1	0	0	8	3	1	0	2
<i>P. mrciaki</i>	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>C. lunaris</i>	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>G. spiniger</i>	0	0	0	0	0	2	1	9
<i>P. coleopratorum</i>	1	0	0	0	0	0	5	10
<i>Parasitus</i> sp. 1	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Parasitus</i> sp. 2	0	0	0	0	0	3	0	1
<i>Pergamasus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	4

Záver

Roztoče sú významnou skupinou asociovanou s rozkladajúcim sa organickým materiálom, pričom toto prostredie dosahujú foreticky. Spolu bolo nájdených 10 druhov čeľade Parasitidae, pričom pri troch z nich je nutná ďalšia determinácia. Najčastejšie sa vyskytujúcim druhom v pasciach boli deutonymfy *P. carabi* a *P. austroasiaticus*. Výsledky tejto práce budú použité pri porovnaní zistených druhov s druhmi nachádzanými na kadávere ošipanej v jednotlivých štádiách rozkladu.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Dhooria M. S. (2016) Fundamentals of applied acarology, Springer Singapore, Singapore, p. 63
- [2] Braig H. R., Perotti M. A. (2009) Exp. & Appl. Acarol. 49(1-2), p. 45
- [3] Hunter P. E., Rosario R. M. T. (1988) Annu. Rev. Entomol. 33(1), p. 393
- [4] Singer G. (1967) Acarol. 9 (3), p. 475
- [5] Karg W. (1993) Acari (Acarina), Milben. Parasitiformes (Anactinochaeta) Cohors Gamasina, Raubmilben, Gustav Fischer Verlag, JenaStuttgart-New York, p. 456
- [6] Hruzová K. (2012) Roztoče podčeľade Parasitinae (Acarina, Mesostigmata, Parasitidae) na Slovensku (Bakalárska práca), Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave
- [7] Stöcker G., Bergmann A. (1977) Arch. Naturschutz Landsch.-Forsch. 17(1)

Analýza dermatoglyfických útvarov druhého stupňa u slovenských detí v predškolskom veku

Karolína Vaseková¹, Filip Babiak³, Miriam Kirchmayerová², Lenka Vandáková², Eva Neščáková¹, Mária Fuchsová⁴, Eva Štefánková⁵

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra antropológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; kajavasekova@gmail.com

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra telesnej výchovy, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Malá Hora 4, 036 01 Martin, Slovenská republika

⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Pedagogická fakulta, Katedra didaktiky prírodovedných predmetov v primárnom vzdelávaní, Račianska 59, 813 34 Bratislava, Slovenská republika

⁵Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Klinika detskej chirurgie, Národný ústav detských chorôb, Limbová 1, 833 04 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Analysis of second-degree dermatoglyphic formations in Slovak preschool children

Nowadays we can observe a new era in which dactyloscopy is gaining a lot of space. Unique identification methods include fingerprints. Every person on the planet has unique papillary line prints. Fingerprint refers to a complex of combination between gap of ridges and valleys on all of the fingertips. We can observe even more unique second-degree dermatoglyphic formations on papillary line impressions. With the help of second-degree dermatoglyphic formations, it is not only possible to identify people, but also second-degree dermatoglyphic formations can help in the diagnosis of various health disorders in people (e.g. autism, ADHD). We analyzed the fingerprints of 50 neurotypical boys and 50 neurotypical girls from the Slovak population (2 to 6 years – preschool age in Slovak children). Statistically significant differences were observed, such as intersexual differences in the total number of minutiae on both hands in the occurrence of the minutiae point o dot ($p = <0.001$), dock ($p = 0.014$), crossbar ($p = 0.018$), Y or M ($p = 0.024$) and break ($p = 0.027$). Based on this we can create a reference sample of the Slovak population for future studies.

Keywords: dactyloscopy; asymmetry; minutiae; bilateral differences; sexual dimorphism

Úvod a formulácia cieľa

Na dermatoglyfických odtlačkoch možno pozorovať tri úrovne markantov. Prvá úroveň markantov je tvorená papilárnymi líniami, ktoré vytvárajú vzor prstov. Druhá úroveň markantov je tvorená malými rozlišovacími znakmi prítomnými na papilárnych líniah dermatoglyfických vzorov, ktoré sú označované ako minúcie, tvoria veľkú variabilitu dermálnych hrebeňov u všetkých jedincov. Tretia úroveň markantov je tvorená vlastnosťami jednotlivých líst (napr. šírka a výška líšty, vyústenie potných pórov) [1].

Vďaka klinickej dermatoglyfike je možné určiť viac než 150 chorôb (napr. autizmus) so spoľahlivosťou dosahujúcou 80 % – 99,9 % [2]. Papilárny terén spoločne s nervovou

sústavou sa vyvíjajú takmer v rovnakom čase a z rovnakej zárodočnej vrstvy (ektoderma), čo poskytuje dôvod na predpoklad v odlišnostiach medzi zdravými a postihnutými jedincami, a to otvára priestor pre štúdium dermatoglyfických odtlačkov [3]. Hlavná výhoda minúcií je ich stálosť a nemennosť počas života jedinca, čiže od vnútromaternicového vývinu až po smrť nemenia svoje rozloženie [4]. Avšak, zmeny môžu nastať vekom z dôvodu nižšej produkcie kolagénu a elastínu, ktoré spôsobujú neschopnosť tkaniva vrátiť sa do pôvodného stavu. Následne vznikajú zníženiny na koži, ktoré nie je možné pri odoberaní odtlačkov odtlačiť (nedochádza k zmene rozloženia minúcií a ani nevznikajú nové minúcie). Vo výskume Silva et al. [5] porovnávali odtlačky prstov tých istých jedincov odobratých v detskom veku a následne v dospelom veku. Bolo preukázané, že starnutím dochádza ku morfometrickým zmenám viditeľných na odtlačkoch rúk a prstov. Najčastejšie znemožnenie pri identifikácii markerov druhej úrovne tvorila redukcia líšt a nárast počtu bielych línií (znemožnenie identifikovať markery druhej úrovne iba na zmenenej časti odtlačku, nie na celom odtlačku) [5].

Cieľom našej práce bolo analyzovať súbor zdravých chlapcov a dievčat v predškolskom veku, stanoviť referenčné početnosti minúcií, ktoré by v klinickej praxi mohli dopĺňať diagnostiku neurovývinových a psychiatrických porúch.

Materiál a metódy

Odbery odtlačkov papilárneho terénu, ktoré boli vo výskume využité, boli realizované v rokoch 2021 až 2023. Odber odtlačkov bol vykonávaný v dvoch materských školách v Bratislave (MŠ Borská –Karlova Ves, MŠ Šťastná – Ružinov) a v materskej škole v Senci (Súkromná MŠ Dúha – Reca). Použitý súbor bol tvorený odtlačkami dlaňovej plochy rúk a prstov 50 zdravých dievčat a 50 zdravých chlapcov slovenskej populácie vo veku od troch do šesť rokov, bez akýchkoľvek ochorení, neurovývinových porúch alebo porúch učenia.

Odtlačky boli odoberané pomocou daktyloskopickej čierne valivou metódou a následne naskenované do digitálnej podoby pri rozlíšení 600 – 1200 dpi. Vyhodnocovaná bola oblasť útvaru na prstoch rúk (papilárne línie medzi trirádiom a jadrom vzoru na jednotlivých prstoch rúk). Na vyhodnotenie minúcií bola použitá klasifikácia podľa Gutiérrez et al. [6], v ktorej je uvádzaných 13 typov minúcií (ukončenie, vidlica, fragment, bodka, zlom, očko, prekrytie, crossbar, mostík, skríženie, trojitá vidlica, dock a otočenie).

Výsledky boli štatisticky spracované v programe Microsoft Excel 2019 a IBM SPSS Statistics 20. Normalita rozdelenia dát bola testovaná Kolmogorovovým-Smirnovovým testom. Bilaterálne rozdiely boli zisťované párovým t-testom, v prípade normálneho rozloženia

dát. Pri dátach, ktoré nemali normálne rozloženie bol použitý Wilcoxonov test. Intersexuálne rozdiely boli zisťované nezávislým t-testom, v prípade normálneho rozloženia dát. Pri dátach, ktoré nemali normálne rozloženie, bol použitý Mann-Whitney U-test. Dáta boli testované na hladine významnosti $\alpha = 0,05$.

Výsledky a diskusia

V súbore 50 zdravých chlapcov bolo celkovo skúmaných 16 262 minúcií (8251 na prstoch pravej ruky a 8 011 na prstoch ľavej ruky). Medzi najpočetnejšie minúcie (tab. 1) patrí vidlica (58,61 %) a ukončenie (33,28 %). Ostatné typy minúcií boli zastúpené s oveľa nižšou frekvenciou, medzi najvzácnejšie sa vyskytujúce patrí „dock“ (0,05 %), otočenie (0,09 %) a „crossbar“ (0,14 %). V súbore 50 zdravých dievčat bolo celkovo skúmaných 15 354 minúcií (7 778 na prstoch pravej ruky a 7 576 na prstoch ľavej ruky). Medzi najpočetnejšie minúcie (tab. 1) patrí u taktiež u aj dievčat vidlica (59,06 %) a ukončenie (32,77 %). Ostatné typy minúcií boli zastúpené s oveľa nižšou frekvenciou, medzi najvzácnejšie sa vyskytujúce patrí tak ako aj u chlapcov s inou frekvenciou otočenie (0,05 %), „dock“ (0,13 %), „crossbar“ (0,25 %).

Tab. 1. Početnosť minúcií na prstoch rúk u chlapcov a dievčat bez ohľadu na lateralitu

Legenda: N – celkový počet, f (%) – frekvencia udávaná v %, μ – priemer, SD – smerodajná odchýlka, a – ukončenie, b – vidlica, c – fragment, d – bodka, e – zlom, f – očko, g – prekrytie, h – „crossbar“, i – mostík, j – skríženie, k – trojitá vidlica, l – „dock“, m – otočenie

Typ	Chlapci – celkový počet				Dievčatá – celkový počet			
	N	f (%)	μ	SD	N	f (%)	μ	SD
a	5412	33,28	54,12	6,923	5032	32,77	50,32	5,681
b	9531	58,61	95,31	10,745	9068	59,06	90,68	9,152
c	215	1,32	2,15	0,880	241	1,57	2,41	0,942
d	242	1,49	2,42	0,734	144	0,94	1,44	0,656
e	98	0,60	0,98	0,512	126	0,82	1,26	0,541
f	261	1,60	2,61	0,812	248	1,62	2,48	0,744
g	59	0,36	0,59	0,364	45	0,29	0,45	0,340
h	23	0,14	0,23	0,228	39	0,25	0,39	0,268
i	299	1,84	2,99	0,813	263	1,71	2,63	0,833
j	61	0,38	0,61	0,347	49	0,32	0,49	0,323
k	41	0,25	0,41	0,296	66	0,43	0,66	0,383
l	8	0,05	0,08	0,126	20	0,13	0,20	0,201
m	14	0,09	0,14	0,188	8	0,05	0,08	0,126

V ďalšom kroku boli zisťované bilaterálne rozdiely na odtlačkoch prstov zvlášť u dievčat a zvlášť u chlapcov – bez signifikantných bilaterálnych rozdielov (tab. 2).

Tab. 2. Bilaterálne rozdiely v počte minúcií na prstoch pravej a ľavej ruky u dievčat a chlapcov

Legenda: N – celkový počet, f (%) – frekvencia udávaná v %, μ - priemer, SD – smerodajná odchýlka, (p) – p hodnota, a – ukončenie, b – vidlica, c – fragment, d – bodka, e – zlom, f – očko, g – prekrytie, h – „crossbar”, i – mostík, j – skríženie, k – trojitá vidlica, l – „dock”, m – otočenie

Typ	Dievčatá – pravá ruka				Dievčatá – ľavá ruka				Dievčatá – Bilaterálne rozdiely (p)
	N	f (%)	μ	SD	N	f (%)	μ	SD	
a	2579	33,16	58,58	6,381	2453	32,38	49,06	4,883	0,426
b	4571	58,77	91,42	9,115	4497	59,36	89,94	9,205	0,401
c	117	1,50	2,34	0,923	124	1,64	2,48	0,962	0,834
d	75	0,96	1,5	0,713	69	0,91	1,38	0,594	0,674
e	56	0,72	1,12	0,513	70	0,92	1,40	0,568	0,186
f	130	1,67	2,6	0,793	118	1,56	2,36	0,756	0,395
g	21	0,27	0,42	0,343	25	0,33	0,50	0,338	0,630
h	21	0,27	0,42	0,278	18	0,24	0,36	0,259	0,602
i	137	1,76	2,74	0,859	129	1,70	2,58	0,808	0,588
j	27	0,35	0,54	0,348	22	0,29	0,44	0,298	0,466
k	29	0,37	0,58	0,333	37	0,49	0,74	0,428	0,298
l	12	0,15	0,24	0,214	9	0,12	0,18	0,187	0,439
m	3	0,04	0,06	0,109	5	0,07	0,10	0,14	0,480
Typ	Chlapci – pravá ruka				Chlapci – ľavá ruka				Chlapci – Bilaterálne rozdiely (p)
	N	f (%)	μ	SD	N	f (%)	μ	SD	
a	2781	33,71	55,62	8,014	2631	32,84	52,62	5,641	0,170
b	4801	58,19	96,02	12,078	4730	59,04	94,60	9,239	0,983
c	113	1,37	2,26	0,801	102	1,27	2,04	0,954	0,239
d	124	1,50	2,48	0,746	118	1,47	2,36	0,723	0,778
e	45	0,55	0,90	0,495	53	0,66	1,06	0,529	0,509
f	145	1,76	2,90	0,880	116	1,45	2,32	0,734	0,095
g	32	0,39	0,64	0,380	27	0,34	0,54	0,348	0,542
h	11	0,13	0,22	0,224	12	0,15	0,24	0,232	0,849
i	139	1,68	2,78	0,744	160	2,00	3,20	0,877	0,282
j	31	0,38	0,62	0,330	28	0,35	0,56	0,363	0,734
k	18	0,22	0,36	0,302	23	0,29	0,46	0,290	0,484
l	3	0,04	0,06	0,109	5	0,06	0,10	0,140	0,480
m	8	0,10	0,16	0,198	6	0,07	0,12	0,178	0,644

Pri porovnávaní bilaterálnych rozdielov početnosti minúcií medzi pohlaviami boli preukázané signifikantné rozdiely (tab. 3).

Tab. 3. Intersexuálne rozdiely v početnosti jednotlivých typov minúcií na prstoch pravej ruky, ľavej ruky a oboch rukách celkom

Legenda: N – celkový počet, f (%) – frekvencia udávaná v %, μ - priemer, SD – smerodajná odchýlka, (p) – p hodnota, a – ukončenie, b – vidlica, c – fragment, d – bodka, e – zlom, f – očko, g – prekrytie, h – „crossbar”, i – mostík, j – skríženie, k – trojitá vidlica, l – „dock”, m – otočenie

Typ	Intersexuálne rozdiely pravá ruka (p)	Intersexuálne rozdiely ľavá ruka (p)	Intersexuálne rozdiely obe ruky celkom (p)
A	0,420	0,079	0,580
B	0,843	0,071	0,157
C	0,599	0,226	0,638
D	< 0,001	< 0,001	< 0,001
E	0,166	0,082	0,027
F	0,560	0,985	0,687
G	0,050	0,760	0,110
H	0,043	0,185	0,018
I	0,344	0,850	0,059
J	0,344	0,613	0,296
K	0,043	0,224	0,024
L	0,018	0,279	0,014
M	0,200	0,995	0,363

Pri porovnávaní intersexuálnych rozdielov výsledných hodnôt pravých prstov rúk sme zaznamenali signifikantné rozdiely pri minúciách typu bodka ($p = < 0,001$), „dock“ ($p = 0,018$), „crossbar“ ($p = 0,043$) a trojitá vidlica ($p = 0,043$). U chlapcov bolo celkovo na pravých prstoch rúk 124 minúcií typu bodka, 3 minúcie typu „dock“, 11 minúcií typu „crossbar“ a 18 minúcií typu trojitá vidlica. U dievčat bolo celkovo na pravých prstoch rúk 75 minúcií typu bodka, 12 minúcií typu „dock“, 21 minúcií typu „crossbar“ a 29 minúcií typu trojitá vidlica.

Intersexuálne rozdiely ľavej ruky boli signifikantné pri minúcii typu „dock“ ($p = < 0,001$). Celkovo sa u chlapcov nachádzalo na ľavých prstoch rúk 118 minúcií typu „dock“ a u dievčat sa celkovo nachádzalo na ľavých prstoch rúk 69 minúcií typu „dock“.

Viac signifikantných rozdielov bolo viditeľných pri intersexuálnom porovnávaní celkových počtov jednotlivých typov minúcií. Signifikantné intersexuálne rozdiely boli preukázané pri minúciách typu bodka ($p = < 0,001$), „dock“ ($p = 0,014$), „crossbar“ ($p = 0,018$), trojitá vidlica ($p = 0,024$) a „zlom“ ($p = 0,027$). Na odtlačkoch prstov rúk chlapcov sa nachádzalo celkovo signifikantne viac minúcií typu bodka, u dievčat sa nachádzalo signifikantne viac minúcií typu „dock“, „crossbar“, trojitá vidlica a zlom. U chlapcov bolo 242 minúcií typu bodka, 8 minúcií typu „dock“, 23 minúcií typu „crossbar“, 41 minúcií typu trojitá vidlica a 98 minúcií typu zlom. U dievčat bolo 144 minúcií typu bodka, 20 minúcií typu „dock“, 39 minúcií typu „crossbar“, 66 minúcií typu trojitá vidlica a 126 minúcií typu zlom.

V predošlej štúdií dermatoglyfických odtlačkov a výskytu minúcií na prstoch rúk u dospelých mužov Kramárová [7], zistila že medzi najčastejšie typy minúcií patrili vidlica (42,02 %) a ukončenie (35,94 %). Analýze minúcií na dermatoglyfických odtlačkoch prstov sa u zdravých chlapcov (vo veku od 2,75 rokov do 12,33 rokov) venoval Babiak [8], pričom medzi najčastejšie typy minúcií taktiež patrili vidlica (60,76 %) a ukončenie (31 %). Ostatné typy minúcií sa v daných výskumoch vyskytovali s nízkou frekvenciou.

V našom súbore medzi najčastejšie vyskytujúce sa typy minúcií u zdravých slovenských chlapcov patrí vidlica (58,61 %) a ukončenie (33,28 %). Podobné výsledky ako u chlapcov máme aj u dievčat, medzi najčastejšie vyskytujúce sa typy minúcií u zdravých slovenských dievčat je vidlica (59,06 %) a ukončenie (32,77 %).

Záver

Nami vytvorený referenčný súbor 50 slovenských chlapcov a 50 slovenských dievčat v predškolskom veku môže slúžiť v klinickej praxi, kde môžu byť dané výsledky použité pri doplnkovej včasnej diagnostike (porovnávaní výsledkov zdravých jedincov s výsledkami chorých jedincov) pri rôznych neurovývinových poruchách, napr. pri diagnostike autizmu. Do budúca by bolo dobré referenčný súbor ďalej rozširovať, pre získanie dôvernejšej relevancie. Najčastejšie vyskytujúce sa typy minúcií sú vidlica a ukončenie, ostatné typy minúcií sa vyskytujú v oveľa menšej frekvencii až jedinečne.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Zhu E., Yin J., Zhang, G. (2005) Pattern. Recognit. 38, p. 1685
- [2] Stosljević M., Adamović M. (2013) Vojnosanit Pregl. 70(4), p. 386
- [3] Galton F. (1892) Finger Prints. MacMillan and Co., London and New York, p. 148
- [4] Cummins H., Midlo C. (1961) Finger prints, Palms and Soles: An Introduction to Dermatoglyphics. Dover publications, New York, p. 40
- [5] Silva L. R. V., Mizokami L. L., Vieira P. R., et al. (2016) Forensic Sci. Int. 259, p. 41
- [6] Gutiérrez E., Galera V., Martínez J. M., et al. (2007) Forensic. Sci. Int. 172, p. 98
- [7] Kramárová D., Beňuš R., Masnicová S. (2012) Slov. Antropol. 15, p. 30
- [8] Babiak F. (2022) Analýza dermatoglyfických útvarov druhého stupňa u slovenských chlapcov. (Diplomová práca) Univerzita Komenského v Bratislave

Analýza mechanizmu adaptácie proteínu Teb1 na úlohu transkripčného faktora

Sofia Virágová, Filip Červenák

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; viragova21@uniba.sk

Abstract

Analysis of the mechanism of adaptation of the Teb1 protein to the role of a transcription factor

Ascomycetous yeasts show great variability in the length and sequence of telomeric repeats and a great diversity of telomeric-binding proteins. Our protein of interest is the Teb1 protein of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*, which is homologous to the Tay1 protein of the yeast *Yarrowia lipolytica*. While Tay1p is a key telomeric protein, binding the double-stranded part of the telomere, Teb1p is an essential transcription factor regulating the expression of many genes. Interestingly, this protein, according to available experimental observations, is not involved in telomere maintenance. Since both of these homologs had to be adapted to different functions during evolution, we inspected their affinities towards a number of DNA motifs including various types of telomeric repeats and promoter motifs. Our results suggest that these proteins differ in their DNA-binding properties, which likely predisposes them to perform their specific functions.

Keywords: co-evolution; hisbox; telomeres; telomere-binding proteins

Úvod a formulácia cieľa

Teloméry sú nukleoproteínové štruktúry chrániace konce eukaryotických chromozómov, ktoré sú tvorené dvojláknovým regiónom pozostávajúcim z krátkych tandemových opakovaní a jednovláknovým 3' prečnievaním, pričom s obidvomi regiónmi interagujú telomerické proteíny, ktoré zabezpečujú správnu funkciu telomér [1 – 2]. Napriek tomu, že u väčšiny eukaryotov je dĺžka a sekvencia telomerických opakovaní obvykle reprezentovaná kanonickou sekvenciou 5'-TTAGGG-3', naprieč kvasinkovými druhmi táto sekvencia výrazne varíruje. Najvýraznejšie variácie boli pozorované v podkmenei *Saccharomycotina*, kde sú tieto sekvencie veľmi heterogénne a ich dĺžka môže byť aj viac ako 20 báзовých párov [3 – 4].

Na tandemové opakovania dvojláknového regiónu sa viažu telomerické väzbové proteíny (dsTBP – *doublestrand telomere-binding proteins*), ktorých spoločným zankom je, že obsahujú aspoň jednu Myb doménu zodpovednú za rozpoznávanie tandemových opakovaní a za väzbu na dsDNA. Tieto proteíny sú naprieč kvasinkovými druhmi veľmi diverzifikované, pričom ich môžeme rozdeliť do dvoch skupín na základe ich flexibility pri väzbe na dsDNA: (i) striktné proteíny rozpoznávajúce sekvenciu 5'-TTAGGG-3' alebo sekvencie jej príbuzné (Tay1p/Teb1p) a (ii) menej striktné proteíny, ktoré sú schopné rozpoznávať aj sekvencie s vysokým stupňom heterogenity (Rap1p a Taz1p) [5 – 6].

Pre skupinu *Yarrowia clade*, patriacu do podkmeňa *Saccharomycotina* je typický telomerický motív 5'-TTNNNNAGGG-3', so štyrmi centrálnymi nukleotidmi, ktoré sú variabilné, pričom konzervovaná časť sekvencie je identická s kanonickým opakovaním. V prípade *Yarrowia lipolytica* je telomerická sekvencia 5'-TTAGTCAGGG-3' rozpoznávaná DNA-väzbovým proteínom Tay1, ktorý obsahuje dve tandemové Myb domény [7 – 8].

Homológom tohto proteínu je proteín Teb1 kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*. Napriek tomu, že Teb1p, rovnako ako iné dsTBP, obsahuje dve Myb domény, plní úlohu transkripčného faktora regulujúceho aktivitu mnohých promótorov, vrátane tých, ktoré kontrolujú expresiu histónových génov [9]. Tento proteín vykazuje vysokú afinitu k sekvencii 5'-TTAGGG-3', pričom výskyt tejto sekvencie na telomérach *S. pombe* je veľmi zriedkavý, čo mohlo spôsobiť, že bol v priebehu evolúcie Teb1p nahradený flexibilnejším Taz1p [10].

Cieľom práce je preto porovnať DNA-väzbové vlastnosti Tay1p a Teb1p, čo môže napomôcť lepšiemu pochopeniu procesov ko-evolúcie telomerických proteínov a nimi rozpoznávaných repetícií. Budeme študovať afinitu daných proteínov k vybraným telomerickým a hisbox-ovým (promótorová oblasť histónových génov) sekvenciám pomocou kompetičnej gélovej retardácie, ktorá nám umožní porovnať relatívnu afinitu proteínov k daným sekvenciám.

Materiál a metódy

Príprava značených sond a neznačených kompetítorov. Rádioaktívne značené sondy *YTEL* a *SpHisbox1* (Tab.1) boli pripravené inkubáciou jednovláknového oligonukleotidu s 1x T4 PNK *Buffer A*, v prítomnosti [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP a T4 polynukleotid kinázy 1 h, 37°C. Následne boli značené vlákna a komplementárne neznačené vlákna reasociované na dvojvláknovú formu pri 100°C, 5 min a následným vychladnutím na laboratórnu teplotu. Kompetítory boli pripravené reasociáciou bez značenia pri rovnakých podmienkach.

Kompetičná gélová retardácia. Reakcie pozostávajú z purifikovaného Tay1p alebo Teb1p, rádioaktívne značenej sondy (*YTEL* - prirodzený substrát Tay1p alebo *SpHisBox1* - prirodzený substrát Teb1p), kompetítorov v 30-násobnom (reakcie s Tay1p) alebo 80-násobnom (reakcie s Teb1p) molárnom nadbytku a tlmivých roztokov HN [20 mM HEPES-NaOH (pH 7,5), 1 mM EDTA-NaOH (pH 8,0), 100 mM NaCl] pre Tay1p a HNE [20 mM HEPES-NaOH pH (7,5), 1 mM EDTA-NaOH (pH 8,0), 100 mM NaCl] pre Teb1p.

Vzorky boli centrifugované (*short spin*) a inkubované 10 min pri laboratórnej teplote, následne bol pridaný 1 μl 50 % glycerolu. Vzorky boli nanesené na vychladený 6 % polyakrylamidový gél, ktorý bol po stuhnutí zaliaty 0,5x TBE [45 mM Tris-borate, 1 mM

EDTA-NaOH (pH 8,0)]. Po nanosení vzoriek bola spustená natívna elektroforéza, ktorá prebiehala 20 min, pri 20 mA. Po elektroforéze bol gél preložený do 50 ml fixačného roztoku [10% (v/v) kyselina octová a 10% (v/v) metanol] a inkubovaný 10 min. Po fixácii bol gél premiestnený na *Wattman*® 3 MM papier, prekrytý fóliou a sušený 1,5 h pri 80°C. Vysušený gél bol zatavený do priehľadného obalu a exponovaný na autorádiografický skrin (*Storage Phosphor Screen*), po 24 hod. bol skrin skenovaný prístrojom *Amersham Typhoon* a získané výsledky boli analyzované pomocou softvéru *ImageJ*.

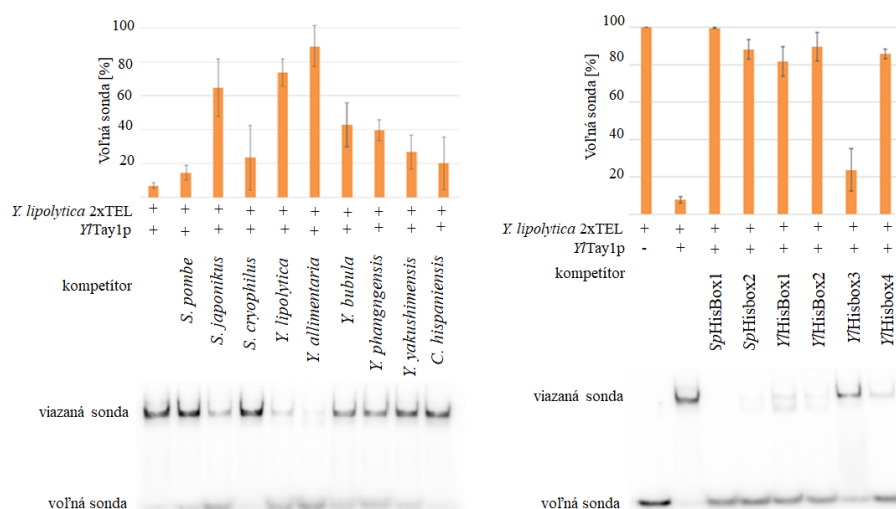
Tab. 1. Zoznam použitých oligonukleotidov

Sekvencie telomerických opakovaní (TEL)		Sekvencie hisbox-ov	
Názov	5'→3'	Názov	5'→3'
<i>Y. lipolytica</i> G	TTAGTCAGGGTTAGTCAGGG	<i>SpHisbox1</i> G	AGGGTTAGGGTTGTGAT
<i>Y. lipolytica</i> C	CCCTGACTAACCCTGACTAA	<i>SpHisbox1</i> C	ATCACAACCCTAACCCT
<i>Y. alimentaria</i> G	TTAGGCAGGGTTAGGCAGGG	<i>SpHisbox2</i> G	AGGGTTAGGGTTTGTAT
<i>Y. alimentaria</i> C	CCCTGCCTAACCCTGCCTAA	<i>SpHisbox2</i> C	ATCAAAAACCCTAACCCT
<i>Y. bubula</i> G	TTAGCGAGGGTTAGCGAGGG	<i>YHisbox1</i> G	AGGGTTAGGGCGCTCCA
<i>Y. bubula</i> C	CCCTCGCTAACCCTCGCTAA	<i>YHisbox1</i> C	TGGAGCGCCCTAACCCT
<i>Y. phangngensis</i> G	TTAGCCAGGGTTAGCCAGGG	<i>YHisbox2</i> G	AGGGTTAGGGGAGCTGG
<i>Y. phangngensis</i> C	CCCTGGCTAACCCTGGCTAA	<i>YHisbox2</i> C	CCAGCTCCCCCTAACCCT
<i>Y. yakushiminsis</i> G	TTATACAGGGTTATACAGGG	<i>YHisbox3</i> G	AACTTTAGGGGGCCATTG
<i>Y. yakushiminsis</i> C	CCCTGTATAACCCTGTATAA	<i>YHisbox3</i> C	CAATGGCCCCCTAAAGTT
<i>C. hispaniensis</i> G	TTGACGAGAGTTGACGAGAG	<i>YHisbox4</i> G	AGCTTTAGGGTTAGGGC
<i>C. hispaniensis</i> C	CTCTCGTCAACTCTCGTCAA	<i>YHisbox4</i> C	GCCCTA ACCCTAAAGCT
<i>S. pombe</i> G	TTACAGGGGGTTACAGGG		
<i>S. pombe</i> C	CCCTGTAACCCCCTGTAA		
<i>S. japonicus</i> G	GTCTTAGGGTTTAGTCTTA		
<i>S. japonicus</i> C	TAAGACTAAACCCTAAGAC		
<i>S. cryophilus</i> G	T TACTTGGGTTACTTGGG		
<i>S. cryophilus</i> C	CCCAAGTAACCCAAGTAA		

Výsledky a diskusia

Vykonalí sme štyri experimenty, pri ktorých sme analyzovali afinitu Tay1p a Teb1p k vybraným sekvenciám (Tab. 1), pričom uvedené hodnoty sme získali z troch replík. Ako referenčnú sekvenciu sme si pri analýze afinity Tay1p zvolili telomerickú repetíciu *Y. lipolytica*. V prvom experimente slúžili ako neznačené kompetítory telomérické sekvencie troch druhov zo skupiny *Taphrinomycotina* a šiestich druhov zo skupiny *Yarrowia clade*. V druhom experimente sme ako neznačené kompetítory použili sekvencie predpokladaných hisbox-ov *Y. lipolytica* a hisbox-ov *S. pombe* (Obr. 1). Najvyššiu afinitu Tay1p vykazoval k sekvencii *Y. alimentaria* a taktiež sme pozorovali relatívne vysokú afinitu k sekvencii *Y. lipolytica*. V prípade ostatných kompetítorov zo skupiny *Yarrowia clade* sme pozorovali postupný pokles afinity (Obr. 1A). Taktiež bolo pozorované, že Tay1p vykazuje vyššiu afinitu ku kanonickej sekvencii 5'-TTAGGG-3' ako ku svojej prirodzenej sekvencii [11]. Tieto výsledky spolu s predošlými pozorovaniami naznačujú, že Tay1p vyžaduje na vykonávanie

svojej funkcie nižšiu ako maximálnu afinitu, vďaka čomu mohol zostať zachovaný ako telomerický proteín. Taktiež predpokladáme, že sekvencia štyroch centrálnych nukleotidov do určitej miery ovplyvňuje afinitu Taylp, nakoľko medzi sekvenciami *Y. lipolytica*, *Y. alimentaria* a *Y. phangngensis* je rozdiel iba v jednom nukleotide, no rozdiely v afinite sú pomerne výrazné. Najnižšiu afinitu Taylp sme pozorovali pri sekvencii *C. hispaniensis*, ktorá má okrem 4 rozdielnych nukleotidov v centrálnych pozíciách aj zámenu v konzervovanej časti sekvencie (5'-TTgacgGaG-3'). Preto predpokladáme, že zachovanie časti kanonickej sekvencie zohráva rolu pri väzbe Taylp na telomerickú DNA.



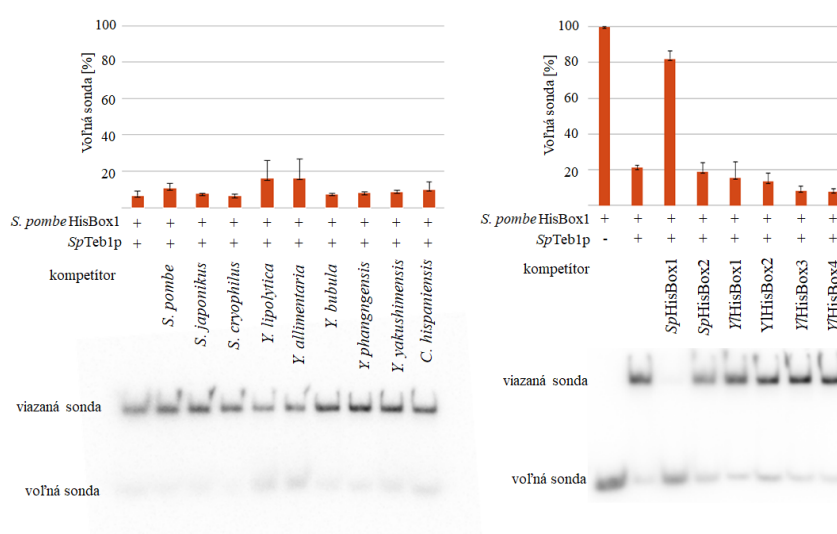
Obr. 1. Kompetičná gélová retardácia: porovnanie afinity Taylp k vybraným sekvenciám

Grafy zobrazujú relatívne množstvo voľnej sondy v percentách. Ako substrát pre Taylp boli použité neznačené kompetítory (sekvencie druhov uvedených v grafe) a značená sonda (YTEL). Chybové čiary reprezentujú smerodajné odchýlky. V spodnej časti sa nachádza výsledok z príslušnej kompetičnej gélovej retardácie

V rámci testovaných telomerických kompetítorov z rodu *Schizosaccharomyces* vykazuje Taylp najvyššiu afinitu k sekvencii *S. japonicus*, ktorá obsahuje motív 5'-TTAGGG-3', čo je pravdepodobne dôvodom, prečo je afinita k tejto sekvencii porovnateľná s afinitou k sekvencii *Y. lipolytica*. Najnižšiu afinitu vykazuje Taylp k sekvencii *S. pombe* a *S. cryophilus*, pričom v daných sekvenciách absentuje motív 5'-TTAGGG-3' (Obr. 1A).

Nakoľko Taylp je homológom Teb1p, ktorý viaže hisbox-y obsahujúce motív 5'-TTAGGG-3', predpokladá sa, že Taylp by mohol viazať tieto sekvencie s vysokou afinitou a rovnako aj sekvencie predpokladaných hisbox-ov z *Y. lipolytica*, ktoré obsahujú rovnaký motív [9 – 10]. Tento predpoklad vyplýva aj z našich výsledkov, nakoľko Taylp viaže takmer všetky testované sekvencie s vysokou afinitou. S najvyššou afinitou viaže Taylp sekvenciu *SpHisbox1*, v prípade ďalších sekvencií je sila väzby nižšia, pričom najnižšia afinita bola

Následne sme analyzovali afinitu Teb1p k daným sekvenciám, pričom sme pre tento proteín použili ako referenčnú sekvenciu *SpHisBox1*. Pri všetkých sekvenciách telomerických opakovaní sme pozorovali veľmi nízku afinitu Teb1p aj napriek tomu, že pri druhoch rodu *Yarrowia clade* sa nachádza čiastočne zachovaný kanonický motív (Obr. 2A).



Grafy zobrazujú relatívne množstvo voľnej sondy v percentách. Ako substrát pre Teb1p boli použité neznačené kompetitory (sekvencie druhov uvedených v grafe) a značená sonda (*SpHisbox1*). Chybové čiary reprezentujú smerodajné odchýlky. V spodnej časti sa nachádza výsledok z príslušnej kompetičnej gélovej retardácie

642

Naše pozorovania naznačujú, že aj keď *Teb1p* v minulosti vykonával funkciu telemetrického proteínu, pravdepodobne sa nedokázal počas evolúcie prispôbiť vznikajúcim zmenám v telomerických opakovaniach *S. pombe*. Napriek tomu sa prispôbil na vykonávanie funkcie transkripčného faktora, kde sa taktiež viaže na DNA, pričom jeho substrátová sekvencia obsahuje kanonický motív a dokáže ju viazať s vysokou afinitou. Taktiež na základe týchto výsledkov môžeme predpokladať, že aj *Tay1p* by sa mohol viazať na promótory histónových génov a mohol by slúžiť aj ako transkripčný faktor.

Záver

Proteíny *Tay1* a *Teb1* boli počas evolúcie prispôbené na vykonávanie rozličných funkcií. Z našich experimentov vyplýva, že dané proteíny majú rozličnú flexibilitu pri väzbe na DNA. Zatiaľ čo *Tay1p* dokáže do istej miery tolerovať prerušenie kanonickej sekvencie 5'-TTAGGG-3' aj zmeny v okolí tohto motívu v hisbox-ových promótoroch, afinita *Teb1p* k DNA je ovplyvnená aj najmenšími zmenami v kanonickej sekvencii alebo jej okolí. Preto predpokladáme, že ich flexibilita pri väzbe na DNA bola dôvodom ich prispôbenia sa na vykonávanie rozličných funkcií.

PodĎakovanie

Táto práca bola zrealizovaná vďaka podpore grantov APVV-19-0068 a VEGA (1/0061/20).

Zoznam použitej literatúry

- [1] McEachern M., Krauskopf A., Blackburn E. (2000) *Ann. Rev. Genet.* 34(1), p. 331
- [2] De Lange T. (2009) *Science* 326(5955), p. 948
- [3] Meyne J., Ratliff R., MoYzIs R. K. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86(18), p. 7049
- [4] Lue N. F. (2010) *Trends Biochem. Sci.* 35(1), p. 8
- [5] Smogorzewska A., de Lange T. (2004) *Ann. Rev. Biochem.* 73(1), p. 177
- [6] Červenák F., Juríková K., Sepšiová R., et al. (2017) *Cell cycle* 16(17), p. 1568
- [7] Červenák F., Jurikova K., Devillers H., et al. (2019) *Sci. Rep.* 9(1), p. 13365
- [8] Kramara J., Willcox S., Gunisova S., et al. (2010) *J. Biol. Chem.* 285(49), p. 38078
- [9] Valente L. P., Dehé P. M., Klutstein M., et al. (2013) *The EMBO J.* 32(3), p. 450
- [10] Sepšiova R., Necasova I., Willcox S., et al. (2016) *PLoS One* 11(4), p. e0154225
- [11] Visacka K., Hofr C., Willcox S., et al. (2012) *J. Biol. Chem.* 287(38), p. 322

Magnetické častice v bioafinitných interakciách za účelom implementácie v diagnostike onkologických ochorení

Veronika Vráblová, Anna Blšáková, Ján Tkáč

Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Glykobiotechnológie, Dúbravská cesta 9, Bratislava 841 04, Slovenská republika; veronika.vrablova@savba.sk

Abstract

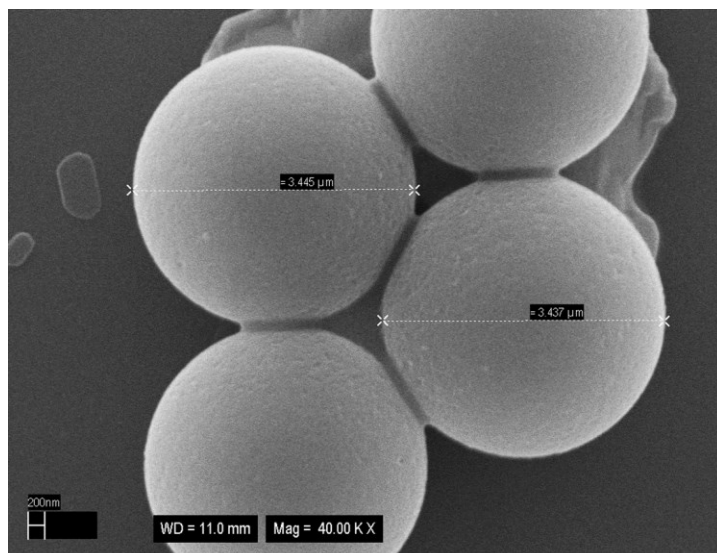
Magnetic particles in bioaffinity interactions for the purpose of implementation in the diagnosis of oncological diseases

In this study, an assay for detection of the cancer biomarker Thomsen-nouvelle (Tn) antigen on the ELISA plates format was designed and developed. The effects of size and functional groups of magnetic beads (MBs) on the specific sensitivity of the bioaffinity interaction were studied. Four different MBs were used in the study, i.e. carboxy-modified MBs of 250 nm, 500 nm, 1000 nm and 2800 nm. In order to evaluate which MBs are the best suited for detection of the analyte anti-Tn antibodies, sensitivities of detection (slopes from calibration curves) were calculated. Then, we evaluated the effect of size on the specific sensitivity of detection of anti-Tn antibodies in order to understand the immobilisation process on nanoscale. We obtained a limit of detection (LOD) (0.31 ± 0.01) ng mL⁻¹ or (2.10 ± 0.04) pM for analyte detection. In addition, the optimal assay configuration was highly selective and enabled reliable detection of the analyte in human serum with a recovery index in the range of 102 -104%.

Keywords: *anti-glycans antibody; biomarkers; magnetic beads; detection*

Úvod a formulácia cieľa

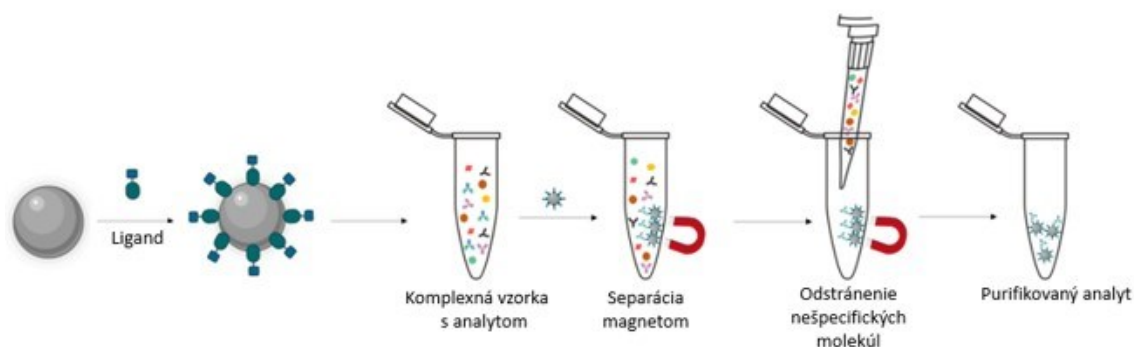
Onkologické ochorenia globálne a dlhodobu partiu k najčastejším príčinám smrti. Štatistiky a prognózy naznačujú, že tento trend sa v budúcnosti bez intervencie nezmení [1]. Zohľadniac špecifitu diagnózy v intenciách unikátnosti a jedinečnosti osobných faktorov, ktoré prispievajú k rozvoju ochorenia (geografický pôvod, osobná história, genetika, socioekonomické faktory, psychické rozpoloženie) a vzájomne sa ovplyvňujú, je zrejmé, že hľadanie uniformného lieku na rakovinu je prinajmenšom komplikované. Kľúčovým prvkom k zlepšeniu prognózy pacientov a zvýšeniu počtu vyliečených je skrining a skorá diagnostika. Jedným z úskalí skorej diagnostiky je nízka koncentrácia onkologických biomarkerov vo vzorkách krvi alebo iných telesných tekutin. Zvýšiť senzitivitu a selektivitu skriningových testov by mohlo použitie magnetických častíc so špeciálne upraveným povrchom. Upravené častice na obrázku 1 oplývajú novými vlastnosťami v závislosti od prítomných biomolekúl na ich povrchu. Malý objem v kombinácii s ich veľkým povrchom prispieva k zvýšeniu účinnosti detekčných testov [2].



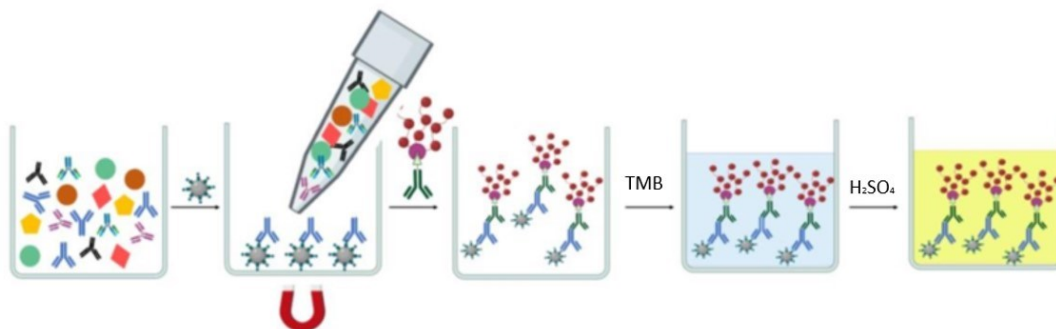
Obr. 1. Snímka magnetických častíc zo skenovacej elektrónovej mikroskopie (SEM).

Komerčne dostupné častice sú pokryté vrstvou funkčných skupín, ktoré v optimálnych podmienkach umožňujú naviazanie ligandu s afinitou k analytu. Na obrázku 2 je schematicky znázornená aplikácia magnetických častíc na zvýšenie koncentrácie analytu (onkologického biomarkeru) za účelom purifikácie analytu z komplexnej vzorky (krvné sérum alebo iné telesné tekutiny) a magnetická separácia od nešpecifických biomolekúl [2-4].

SUSPENSION Magnetic Bead-based Assay (SUMBA) je analytická metóda používaná na detekciu a kvantifikáciu proteínov, antigénov a ďalších biomolekúl v biologických vzorkách. Táto metóda využíva magnetické častice (magnetic beads), ktoré sú funkčne modifikované na zachytenie cieľových molekúl. Schéma pracovného postupu SUMBA je znázornená na obrázku 3. Prístup môže byť použitý pri skúmaní účinku vlastností rozhrania širokého spektra nanočastíc a mikročastíc na bioafinitné interakcie [3].



Obr. 2. Použitie magnetických častíc na zvýšenie koncentrácie analytu z komplexných vzoriek.



Obr. 3. SUMBA: Kroky zahrnuté vo formáte analýzy založenej na SUSPENSION Magnetic-Bead Assay (SUMBA) použitej v súčasnej práci na detekciu AGA (anti-glykánové protilátky). Test pozostáva z nasledujúcich krokov (zľava doprava): pridanie vzorky/štandardu obsahujúceho AGA ako rakovinové biomarkery do jamky ELISA; inkubácia vzorky/štandardu s MB s imobilizovaným glykonanokonjugátom a následnou magnetickou separáciou; pridanie sekundárnej protilátky voči AGA s enzýmom poly-HRP pre amplifikáciu signálu; pridanie substrátu tetrametylbenzidínu (TMB) do jamky a nakoniec ukončenie enzymatickej reakcie H_2SO_4 a generovanie optického signálu [4].

Materiál a metódy

Chemikálie a materiály: Tablety fosfátového pufru fyziologickej soli (PBS, 10 mM fosfátový pufr, 0,0027 M chlorid draselný a 0,137 M chlorid sodný, pH 7,4), tablety PBS-TWEEN (PBST, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 0,05% detergent TWEEN 20, 10 mM fosfátový pufr, pH 7,4), sérový hovädzí albumín z (BSA), 1-Etyl-3-[3-dimetylamínopropyl]karbodiimid hydrochlorid (EDC), N-hydroxysukcinimid (NHS), 2-(N-morfolino)etán-sulfónová kyselina (MES), kyselina sírová (H_2SO_4) boli zakúpené od spoločnosti SigmaAldrich (USA). Pierce™ streptavidín poly-HRP (HRP = chrenová peroxidáza) konjugát bol získaný od spoločnosti Thermo Fisher Scientific (USA).

Pufre a reagenty: PBST premývací pufr (PBS s 0,05% Tween 20); blokačné činidlo (0,1% BSA v PBST); Tris HCl (0,050 M, pH 7,4); 25 mM MES, pH 6,0; 25 mM glycín v 0,01 M PBS a 0,1 M sodný fosfát (pH 7,0).

Glykonanokonjugáty: Tn antigén (α -D-GalNAc) viazaný na BSA (Tn-BSA; ~ 20 glykánov na proteín) bol získaný od spoločnosti GLYcoDiag (Francúzsko).

Protilátky: Použité nasledujúce primárne protilátky: protilátka proti Thomsen Friedenreich antigénu (CD176) (Antibodies online, ABIN3025629, Nemecko); protilátka voči sialyl-Tn antigénu (Antibodies online, ABIN2151589, Nemecko); protilátka proti sialyl-Tn antigénu (Genetex, GTX82967, klon sTn 219). Primárna protilátka anti-Tn GOD3-2C4 (2C4), myšia IgG1 κ protilátka špecifická pre syntetické Tn antigény a Tn antigény slizníc. V experimentoch bola ako sekundárna protilátka použitá Goat anti-Mouse IgG H&L (Biotin; ab 6788; Abcam, UK).

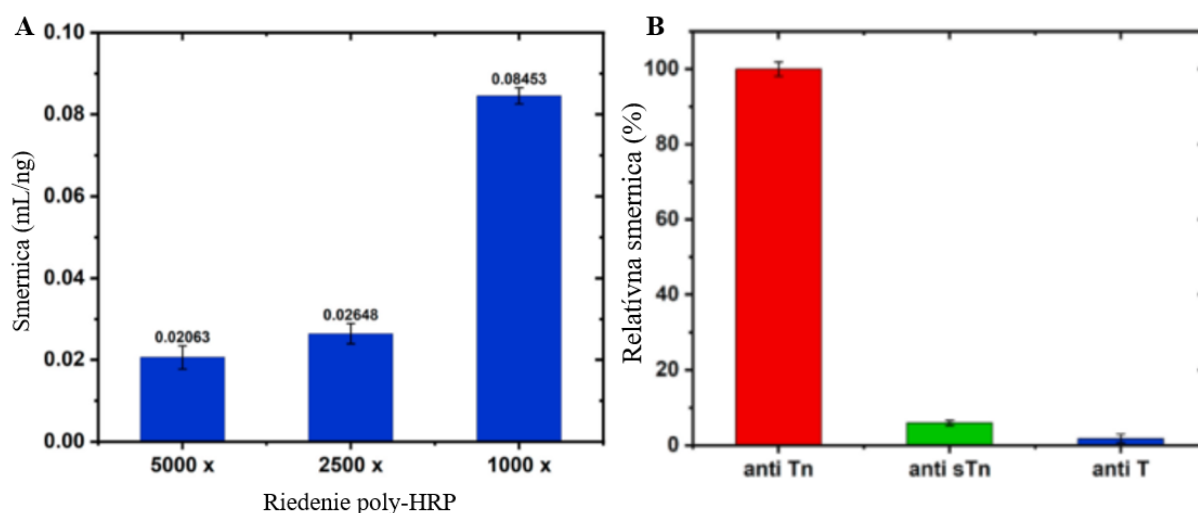
Magnetické častice: Nanomag®-D magnetické častice s funkčnou skupinou karboxyl ($d = 250$ nm) a Nanomag®-D magnetické častice s funkčnou karboxylovou skupinou ($d = 500$ nm) sme obdržali od spoločnosti Micromod (Nemecko). Magnetické častice s funkčnou karboxylovou skupinou DynaBeads MyOne ($d = 1000$ nm) a Dynabeads M-270 s karboxylovou kyselinou na svojom povrchu ($d = 2800$ nm), sme zakúpili od spoločnosti Thermo Fisher Scientific (USA).

SUMBA (SUSpension magnetic bead-based assay) Objemy 3, 5, 10 alebo 20 μL magnetických častíc (každého z prípravkov) boli pridané do jamiek ELISA platničky. 100 μL roztoku s rôznymi koncentráciami anti-glykánových protilátok (AGA) sme pridali do platničky a inkubovali pri izbovej teplote za mierneho miešania po dobu 1 h. Sekundárnu biotinylovanú protilátku ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) sme inkubovali súbežne so streptavidínom a poly-HRP v pomere 1:1. Platničku sme pripevnili na magnet a následne premyli trikrát s 250 μL PBST. 200 μL sekundárnej protilátky konjugovanej s poly-HRP sme pridali do každej jamky a nechali reagovať 1 h pri konštantnom miešaní. Po troch premytiach sme pridali 100 μL roztoku 1-Step Ultra TMB-ELISA na vygenerovanie signálu. Reakciu sme ukončili po 10 minútach pridaním 100 μL 1 M kyseliny sírovej. ELISA platničku sme miešali po dobu 5 s a zmerali sme absorbanciu pomocou multi-Mode čítačky (Synergy HT BioTek, Vermont, USA) pri vlnovej dĺžke 450 nm. Senzitivitu sme vypočítali ako smernicu kalibračnej krivky pomocou lineárneho prispôsobenia v softvéri OriginPro 2019b s kalibračnou krivkou zostavenou pre každý zo štyroch objemov magnetických častíc a pre všetky typy skúmaných magnetických častíc za použitia analytov o koncentrácii v rozmedzí od $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ do 100 ng mL^{-1} a kontrolou (t.j. čistým pufrom s koncentráciou analytu 0 ng mL^{-1}).

Výsledky a diskusia

V tejto práci sme vykonali integráciu metódy SUMBA do formátu ELISA platne s použitím magnetu pre magnetickú separáciu. Glykán prítomný na povrchu BSA v podobe glykonanokonjugátu bol kovalentne imobilizovaný na magnetické častice (MB). Modifikované MB sme následne použili na interakciu so vzorkou alebo štandardom obsahujúcim AGA ako nádorový biomarker. V nasledujúcom kroku sme do systému aplikovali peroxidázou (poly-HRP) označenú sekundárnu anti-AGA protilátku na generovanie optického signálu. Prvým parametrom, ktorý sme optimalizovali v tejto práci, bol účinok zriedenia enzýmu poly-HRP na citlivosť testu (obrázok 4 A). Optimalizáciou sme odhalili najvyššiu citlivosť (t.j. sklon lineárneho kalibračnej krivky) detekcie anti-Tn protilátky pri zriedení 1 000 x, t.j. $(0,0845 \pm 0,0020) \text{ mL ng}^{-1}$; avšak pri vyššej koncentrácii analytu sme pozorovali tvorbu

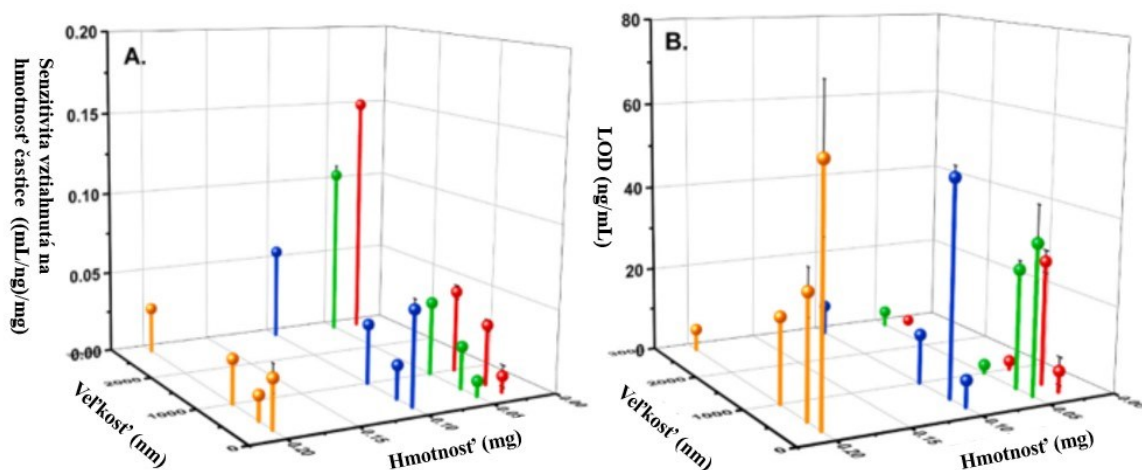
zrazenín ako výsledok enzymatickej premeny substrátu. Zriedenie anti-Tn protilátky 5 000 x viedlo k priaznivej citlivosti detekcie ($0,0206 \pm 0,0029$) mL ng⁻¹ bez vzniku agregátov zabráňujúcim stanoveniu pri vlnovej dĺžke 450 nm. Optimálne podmienky (t. j. 5 000-násobné riedenie pre poly-HRP; 3 µl Dynabeads® M270) sme použili na skúmanie špecificity detekcie analytu (obrázok 4 B). Výsledky naznačujú veľmi špecifickú detekciu analytu pre anti-Tn protilátku v porovnaní s inými AGA, t.j. anti-sTn protilátkou a anti-T protilátkou.



Obr. 4. Efekt riedenia enzýmu poly-HRP na senzitivitu a detekciu anti-Tn protilátok (A) a špecificita detekcie anti-Tn glykánových protilátok skúmaná použitím iných anti-sTn a anti-T (B).

Obrázok 5A znázorňuje závislosť špecifickej senzitivity od dvoch parametrov magnetických častíc (veľkosť MB v nm a hmotnosť MB vyjadrenej v mg). Zo skonštruovaného 3D grafu v sekcii s označením A vidíme, že najlepšiu špecifickú senzitivitu sme získali za použitia najmenšieho objemu (3 µl) v kombinácii s najväčšími MB, t. j. 2800 nm. Správanie častíc s veľkosťou 250 nm bolo odlišné od zvyšných druhov MB, pričom najvyššiu špecifickú senzitivitu sme dosiahli pri hmotnosti častíc 0,10 mg. Zo získaných dát sme usúdili, že použitím väčších MB je možné dosiahnuť vysokú špecifickú senzitivitu detekcie.

Pri skúmaní vplyvu hmotnosti MB na špecifickú senzitivitu sme pozorovali výrazný pokles so zvyšujúcou sa hmotnosťou MB pre tri rôzne veľkosti MB, t. j. 500 nm, 1000 nm a 2800 nm (obr. 4B), pričom najvyššia hodnota pre hmotnosť MB 0,03 mg bola $0,150 \pm 0,003$ ml ng⁻¹/mg MB.



Obr. 5. 3D grafy závislosti veľkosti a hmotnosti magnetických častíc (MB) od senzitivity (A) a LOD (B) pre detekciu AGA (anti-Tn protilátok) Boli použité nasledujúce farby pre rôzne hmotnosti MB (vyjadrené v mg) v skúšobnom systéme: 0,03 mg (červená), 0,05 mg (modrá), 0,10 mg (zelená) a 0,20 mg (oranžová).

Záver

Predkladaná práca sa zameriava na hľadanie riešení súčasných lokálnych aj globálnych problémov v spojitosti s výskytom onkologických ochorení a skúma využitie upravených magnetických častíc. Je potrebné poznamenať, že okrem vplyvu veľkosti častíc, je nutné venovať pozornosť aj povrchovým vlastnostiam ako je rozdelenie náboja na povrchu magnetických častíc v súvislosti s ich tendenciou sa zhlukovať vplyvom elektrických príťažlivých a odpudivých síl, čo ovplyvňuje schopnosť biokonjugácie molekúl.

PodĎakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: CEMBAM - Centrum medicínskeho bioaditívneho výskumu a výroby, ITMS: 313011V358, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Sung H., Ferlay J., Siegel R. L. et al. (2021) CA: CA Cancer J. Clin., 71(3), p. 209
- [2] Mani V., Chikkaveeraiah B.V., Rusling J.F. (2011) Expert Opin. Med., 5(5), p. 381
- [3] Blšáková A., Květoň F., Lorencová L. et al. (2022) Anal. Chim. Acta., 1195: p. 339444.
- [4] Vráblová V., Blšáková A., Lorencová L. et al. (2023) Anal. Chim. Acta., 1242: p. 340794

Žilová kresba ruky a jej distribúcia u populácie z juhozápadného Slovenska

Nikoletta Ziliziová, Radoslav Beňuš

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra antropológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; niki.zilizi@gmail.com

Abstract

Vein pattern of the hand and its distribution in the population from southwestern Slovakia

Vein pattern in the back of the hand is unique to each individual which can be used in biometry. In current study were analyzed 58 participants (39 females and 19 males) in age range from 18 to 64 years (mean 41 years) in Bratislava and Šaľa. Vein patterns were evaluated on photographs of the dorsum of the hand according to the method of Suchý (1951). The frequency of each occurring type was calculated from the obtained value, then the acquired data was processed by appropriate statistical methods. The most frequent vein patterns were branched vein pattern TYPE A, double branched vein pattern TYPE Y and compound vein pattern TYPE S. Finally, the results were compared with the results from previous works. This information may be useful in the field of forensic anthropology, especially for identification in criminal cases. No bilateral or intersexual significant differences in the occurrence of vein pattern on the dorsum of the hand were found in the group. Each vein pattern is individual, so no identical patterns were found.

Keywords: *biometrics; vein pattern; personal identification; forensic anthropology*

Úvod a formulácia cieľa

Slovo biometria pochádza z gréckych slov: *biós*-život; *metrikós*-merací, meraný [1]. Biometria teda znamená identifikáciu prostredníctvom telových častí [2]. Pod pojmom biometria rozumieme kombináciu technologických a vedeckých metód za účelom identifikácie osôb. Využíva rôzne jedinečné fyzické a behaviorálne znaky. Ďalej sa tieto poznatky využívajú na analýzu dát v biologických vedách, kde najprv sú prevedené do elektronickej podoby a následne je možné s nimi narábať, ako s jedinečným kódom. Biometria je určitou formou elektronického kľúča, kde kľúčom je samostatný človek [3]. Jedna z metód biometrie je identifikácia založená na žilovej kresbe chrbta ruky. Táto metóda sa v súčasnosti stáva čoraz populárnejšou v biometrickej identifikácii. Prepojené krvné tepny tvoria žilové vzory, ktoré sú jedinečné a nemenné, preto sa používajú na bezpečnostnú identifikáciu v biometrii. Tým, že voľným okom sú takmer neviditeľné nie je možné ich napodobňovať [1]. Riešenie tejto problematiky vytvára novú možnosť v oblasti identifikácií jednotlivca.

Cieľom práce bolo charakterizovať základné typy žilovej kresby na chrbte ruky a stanoviť frekvencie ich jednotlivých typov. Zistiť či existujú bilaterálne alebo intersexuálne rozdiely v sledovanom súbore a porovnať výsledky s predošlými prácami.

Výsledky práce, ako aj predošlých prác, môžu mať praktické využitie okrem biometrie aj v etnickej antropológii. Táto oblasť identifikácie nie je ešte celkom prebádaná a je potrebné ešte urobiť niekoľko výskumov na to, aby bola prakticky využiteľná.

Materiál a metódy

Pri vyšetrovaní daného znaku som použila vlastnú dokumentačnú metódu, ktorá je praktická, rýchla, jednoduchá a uskutočniteľná v rôznych typoch prostredia. Použila som hrubšiu gumičku na stiahnutie hornej končatiny, za účelom zvýšenia viditeľnosti žíl. V prípade potreby boli probandovi doporučené cviky prstov a zápästia. Žily som potom zvýraznila farbivom na telo, ktoré bolo ľahko odstrániteľné. Získaný obraz som odfotila nad tmavým kontrastom, na čo som použila čierny papier. Fotografie som vyhodnotila podľa metódy Suchého. Získané údaje boli spracované popisnou štatistikou v MS Excel. Na intersexuálne a bilaterálne porovnanie frekvencií výskytu vzorov som použila Fisherov test s hladinou významnosti 0,05. Materiál som získala vyšetrením 58 jedincov vo veku 18 do 64 rokov. Priemerný vek súboru bol 41 rokov. Súbor som si rozdelila do dvoch skupín na základe pohlavia. Celkovo som vyšetrila 39 žien a 19 mužov. Probandi boli vyšetřovaní v okolí Šale a v Bratislave.

Suchý rozlišuje základné varianty konfigurácie žilovej kresby [4]:

- I. jednokmeňovú žilovú kresbu, kde sa žily zbiehajú z druhej, tretej a štvrtej medzikĺbnej jamky do ulnárneho kmeňa *vena cephalica*
- 1. Rozvetvená žilová kresba – je tvorená troma žilami, hlavný kmeň vychádzajúci z tretej jamky prijímajúci vetvu z druhej a vetvu zo štvrtej jamky.
Varianty rozvetvenej žilovej kresby sú: TYP A, TYP B a TYP C
- 2. Dvakrát rozvetvená žilová kresba – TYP Y – hlavný kmeň je tvorený dvoma venóznymi ramenami, každé z nich sa Ypsilonovito vetví. Niekedy sa tu môže objaviť tvar YY, YV alebo VV.
- 3. Jednoduchá kresba – TYP N – tvorená je dvoma vetvami, tie vychádzajú z druhej a tretej jamky alebo tretej a štvrtej, prípadne z druhej a štvrtej. Celkový vzhľad kresby pripomína písmeno N alebo H.
- II. Zložená žilová kresba – TYP S – žily odvetvujúce sa z radiálneho kmeňa *vena cephalica*, zasahovanie žíl až do oblasti druhej medzikĺbnej jamky.

Výsledky a diskusia

V sledovanom súbore u mužov na pravej aj na ľavej ruke sa s najväčšou frekvenciou vyskytuje jednokmeňová žilová kresba typu rozvetvenej a dvakrát rozvetvenej, naopak s najmenšou frekvenciou sa u mužov na pravej ruke sa vyskytuje jednokmeňová jednoduchá žilová kresba a na ľavej ruke s rovnakou frekvenciou jednokmeňová jednoduchá a zložená žilová kresba. U žien v sledovanom súbore aj na pravej aj na ľavej ruke je najviac zastúpená jednokmeňová žilová kresba typu rozvetvenej a dvakrát rozvetvenej. Najmenej zastúpenou na pravej ruke je jednoduchá žilová kresba a na ľavej ruke je zložená žilová kresba (tabuľka 1).

Tab. 1. Vyjadrenie frekvencií základných typov žilovej kresby

KRESBA		RUKA	Ziliziová (2023)		
			muži (%)	ženy (%)	celý súbor (%)
Jednokmeňová	Rozvetvená a dvakrát rozvetvená	pravá	52,63	58,97	56,89
		ľavá	78,94	56,41	62,06
	Jendoduchá	pravá	15,78	12,82	13,79
		ľavá	10,52	25,64	22,41
Zložená		pravá	31,57	28,20	29,31
		ľavá	10,52	17,94	15,51

Tab. 2. Percentuálne zastúpenie variantov rozvetvenej a dvakrát rozvetvenej žilovej kresby

KRESBA	TYP	RUKA	Žiliziová (2023)		
			muži (%)	ženy (%)	celý súbor (%)
Rozvetvená a dvakrát rozvetvená	A	Pravá	30,00	47,82	42,42
	B		0,00	4,34	3,03
	C		10,00	4,34	6,06
	Y		60,00	43,47	48,48
Rozvetvená a dvakrát rozvetvená	A	Ľavá	33,33	31,81	32,43
	B		6,66	0,00	2,70
	C		6,66	22,72	16,21
	Y		53,33	45,45	48,64

V sledovanom súbore je u mužov na pravej aj na ľavej ruke najviac zastúpenou dvakrát rozvetvená žilová kresba TYP Y, u žien je na pravej ruke TYP A a na ľavej ruke TYP Y, najmenej zastúpenou, resp. chýbajúcou, je na pravej ruke u mužov rozvetvená žilová kresba TYP B, a na ľavej ruke u mužov sa s rovnakými frekvenciami vyskytujú rozvetvené žilové kresby TYP B a C (tabuľka 2).

U žien sú v sledovanom súbore na pravej ruke najmenej zastúpené rozvetvené žilové kresby TYP B a C, na ľavej ruke rozvetvená žilová kresba TYP B (tabuľka 2).

Pri porovnávaní frekvencií výskytu jednotlivých vzorov v analyzovanom súbore neboli zistené žiadne signifikantné rozdiely medzi pravou a ľavou rukou vo frekvenciách základných druhov žilovej kresby a jednotlivých typov rozvetvenia. Nenašla som ani signifikantné intersexuálne rozdiely. Moja dokumentačná metóda nie je validovanou metódou. V ostatných štúdiách všetci autori používali jednotnú dokumentačnú metódu zviditeľňovania žilovej kresby podľa Suchého (1951).

Porovnanie výsledkov

Výsledky som porovnala s výsledkami Suchého (1951), Sobčákovej (2001) a Matušíkovej (2018).

V sledovaných súboroch u mužov i žien aj na pravej aj na ľavej ruke najviac zastúpenou žilovou kresbou je jednokmeňová žilová kresba typu rozvetvenej a dvakrát rozvetvenej. Jednotlivé varianty týchto typov sa vyskytujú v rôznych frekvenciách. Najmenej zastúpenú kresbu nemožno definovať z týchto výsledkov, lebo u Suchého [4] u mužov aj na pravej aj na ľavej ruke je to jednokmeňová jednoduchá žilová kresba, u žien aj na pravej aj na ľavej ruke zložená žilová kresba. Výsledky Sobčákovej [5] naznačujú, že u mužov i žien aj na pravej aj na ľavej ruke je najmenej zastúpenou zložená žilová kresba. Matušíková [6] má podobné výsledky, u mužov i žien aj na pravej aj na ľavej ruke je najmenej zastúpenou žilovou kresbou zložená žilová kresba.

Podľa Suchého [4] najviac zastúpenou žilovou kresbou u mužov na pravej ruke je TYP C a na ľavej ruke je TYP Y. U žien zasa najviac zastúpenou je aj na pravej aj na ľavej ruke TYP C. Najmenej zastúpenou je u oboch pohlaví TYP B.

Sobčáková [5] uvádza, že s najväčšou frekvenciou sa vyskytuje rozvetvená žilová kresba TYP A aj u mužov aj u žien na pravej ruke, na ľavej ruke u mužov TYP C a u žien TYP A. S najmenšou frekvenciou sa vyskytuje rozvetvená žilová kresba TYP B.

Výsledky Matušíkovej [6] naznačujú, že najviac zastúpenou u mužov aj na pravej aj na ľavej ruke je dvakrát rozvetvená žilová kresba TYP Y, u žien na pravej ruke je rozvetvená

žilová kresba TYP A a na ľavej dvakrát rozvetvená žilová kresba TYP Y. Najmenej zastúpenou je u mužov na pravej ruke rozvetvená žilová kresba TYP B, na ľavej ruke TYP C, u žien presne opačne na pravej ruke TYP C a na ľavej ruke TYP B.

Záver

V sledovanom súbore boli najviac zastúpenými žilovými kresbami rozvetvená žilová kresba TYP A, dvakrát rozvetvená žilová kresba TYP Y a zložená žilová kresba TYP S. V súbore neboli zistené žiadne bilaterálne ani intersexuálne signifikantné rozdiely vo výskyte vzorov žilovej kresby chrbta ruky. Každá žilová kresba je individuálna, takže som nenašla ani dva identické vzory. Výsledky mojej práce, ako aj predošlých prác, môžu mať aj praktické využitie v etnickej antropológii, hlavne na zistenie variability v tomto znaku medzi populáciami. Tieto poznatky sú využiteľné aj vo forenznej antropológii pri identifikácii jedincov.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Pleva M. (2021) Biometrické systémy bezpečnosti. Technická univerzita v Košiciach, p. 1
- [2] Sharif M., Raza M., Shah J. H., et al. (2019) An Overview of Biometrics Methods. In: Singh A. K., Mohan A. (ed.) Handbook of Multimedia Information Security: Techniques and Applications. Springer Cham, p. 15
- [3] Šipulová M. (2021) Študentská vedecká aktivita, Medzigeneračné vnímanie biometrických technológií, Banská Bystrica, SR, p. 25
- [4] Suchý J. (1951) Rozpravy II. třídy České akademie 61(27), p. 1
- [5] Sobčáková M. (2001) Variabilita utvárania rete venosum dorsale manus. (Diplomová práca) Univerzita Komenského v Bratislave
- [6] Matušíková Z. (2018) Variabilita žilovej kresby chrbta ruky v slovenskej populácii. (Diplomová práca) Univerzita Komenského v Bratislave

Využitie expresného systému *Escherichia coli* pre heterológnu expresiu ión-transportného peptidu z *Drosophila melanogaster* a jeho purifikácia

Gabriel Zorkócy^{1,2}, Zdenko Levarski^{1,2}, Stanislav Stuchlík^{1,2}, Ján Turňa^{1,2}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
zorkocy3@uniba.sk

²Univerzita Komenského v Bratislave, Vedecký park, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Utilisation of *Escherichia coli* expression system for heterologous expression of ion-transport peptide from *Drosophila melanogaster* and its purification

Ion-transport peptides (ITP) belong to neuropeptides found in insects. They are produced in a variety of different tissues and their functionality differs across various species. In this study we did heterologous expression of ITP from *Drosophila melanogaster* in *Escherichia coli* and its subsequent purification with multiple chromatography steps. The purified protein could be used in additional studies of its biological function.

Keywords: ITP; ion-transport peptide; *Escherichia coli*

Úvod a formulácia cieľa

Iónovo-transportné peptidy (ITP) patria medzi neuropeptidy u hmyzu, ktoré sú exprimované vo viacerých tkanivách a u rozličných druhov sa podieľajú na rôznych procesoch, napríklad u kobyliiek pri absorpcii chloridových iónov, či pri zvliekavaní u lišaja tabakového. U drozofily sa ITP exprimuje v laterálnych neurónoch a má úlohu v cirkadiánnom rytme [1,2,3].

Pre zisťovanie funkcie týchto neuropeptidov v organizme je taktiež dôležité zaoberať sa ich receptormi. Mnoho týchto receptorov patrí do skupiny receptorov spriahnutých s G proteínmi (GPCR). Nagai a kol. sa podarilo identifikovať u priadky morušovej 3 takéto receptory, ktoré sú aktivované pomocou ITP. Ortológy týchto receptorov sa nachádzajú u iných druhov hmyzu a je možno sa domnievať, že aj tam by funkcia ITP mohla byť objasnená, čo je zaujímavá cesta, ktorou by sa ďalšie štúdie mohli uberať [4].

ITP sa exprimuje ako 130 aminokyselín dlhý propeptid, ktorý post-translačne podlieha štiepeniu na 72 aminokyselín a C-terminálnej amidácii [5]. ITP u rozličných druhov majú spravidla 40 rovnakých aminokyselín na N-konci a obsahujú 6 konzervovaných cysteínov, rozdiely sú najmä na C-konci [4,5].

Uvedená práca sa zaoberá heterológnu expresiou a purifikáciou ITP z *Drosophila melanogaster* pre jej ďalšie štúdie v spolupráci s Ústavom zoológie SAV.

Materiál a metódy

Pre účel prípravy prvej transformácie konštruktu pJK100EK-DmITP sme zvolili kmeň *E. coli* E.cloni 10G a pre expresiu génu sme zvolili kmeň *E. coli* BL21 (DE3), ktorých genotyp je uvedený v (Chyba! Nenašiel sa žiaden zdroj odkazov.).

Tab. 1. Genotyp *E. coli* E.cloni 10G a BL21 (DE3).

Kmeň	Genotyp	Zdroj
E.cloni 10G	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrBC)$ <i>endA1 recA1</i> $\Phi80dlacZ\Delta M15 \Delta lacX74 araD139 \Delta(ara, leu)7697$ <i>galU galK rpsL nupG</i> $\lambda\text{-}tonA$	Invitrogen®
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)</i> <i>k(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	Novagen®

Plazmidový konštrukt pJK100EK-DmITP určený pre expresiu génu bol pripravený amplifikáciou génu *DmITP* pomocou PCR, následným štiepením vektora pJK100EK a amplifikovaného génu restriknými endonukleázami NaeI a EcoRI, ligáciou vektora a inzertu pri 4°C po dobu 16 hodín za využitia T4 DNA ligázy a transformáciou do hostiteľského kmeňa E.cloni 10G. Expresný plazmid bol následne izolovaný pomocou komerčného kitu QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) a transformovaný do produkčného kmeňa BL21 (DE3).

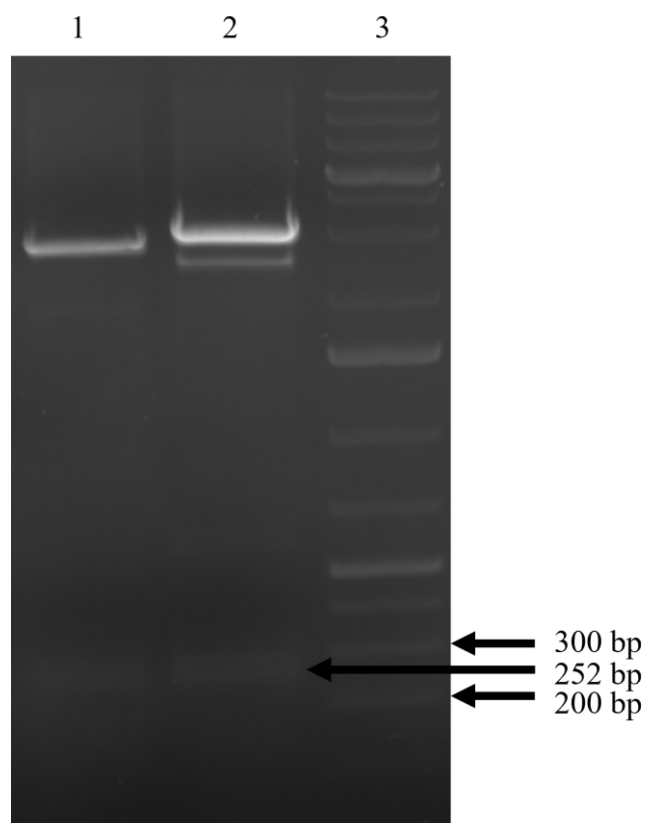
Pre nadprodukciu peptidu záujmu sme využili bioreaktor BIOSTAT® B (Sartorius Stedim Biotech) o objeme 1 litra Terrific Broth (TB) média, ktoré bolo inokulované 100 ml nočnej kultúry v TB médiu, ktoré sme suplementovali 1% glukózou a 100 µg/ml ampicilínu. Produkčné médium sme suplementovali 0,1% glukózou a kultúru nechali rásť za nasledovných podmienok: teplota 28°C, pO₂ 30%, pH 7,2 (udržiavané pomocou 27% NH₄OH a 7% HCl). Pri OD₆₀₀ v rozmedzí 5-6 sme indukovali expresiu pomocou 0,2 mM IPTG, znížili teplotu na 18°C a pokračovali v kultivácii po dobu 20 hodín. Výslednú biomasu sme spracovali centrifugáciou pri 4°C a 7690g na prístroji Universal 320 R (Hettich). Usadené bunky sme rozsuspendovali v roztoku obsahujúcom 50 mM TrisHCl pH 8 a 0,5 M NaCl a podrobili sme ich homogenizácii ultrazvukom využitím prístroja Sonopuls HD 3200 a sondy KE 76 (Bandelin). Podmienky homogenizácie boli: amplitúda 60%, celkový čas 14 minút 30 sekúnd, čas pulzu 30 sekúnd, čas chladenia 30 sekúnd. Proteínovú produkciu sme analyzovali pomocou 15% SDS-polyakrylamidového gélu [6] a vyhodnotili na prístroji ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare).

Purifikáciu fúzneho peptidu Trx-DmITP (nakoľko expresný vektor obsahuje gén pre tioredoxín pre účely lepšej solubility, ktorý sa transkribuje spolu s génom záujmu) sme

uskutočnili na prístroji ÄKTA AVANT 150 (GE Healthcare). Purifikácia prebiehala v troch krokoch: prvé dva pomocou afinitnej chromatografie na imobilizovaných iónoch kovu (IMAC) – na 100 ml kolóne IDA 200 a následne na 5ml kolóne HisTrap FF, kde sme využili skutočnosť, že náš fúzny peptid obsahuje His-tag kotvu. Pre ekvilibračiu sme využili roztok obsahujúci 50 mM TrisHCl pH 8 a 0,5 M NaCl, pre elúciu 50 mM TrisHCl pH 8 a 0,5 M NaCl a 0,5 M imidazolu. Tretím krokom purifikácie bola iónomeničová chromatografia na 1 ml kolóne HiTrap Q HP, kde ekvilibračný roztok pozostával z 20 mM TrisHCl pH 8 a elučný roztok 20 mM TrisHCl pH 8 a 1 M NaCl, pričom sme pri procese postupne zvyšovali obsah NaCl pomocou nastaveného gradientu.

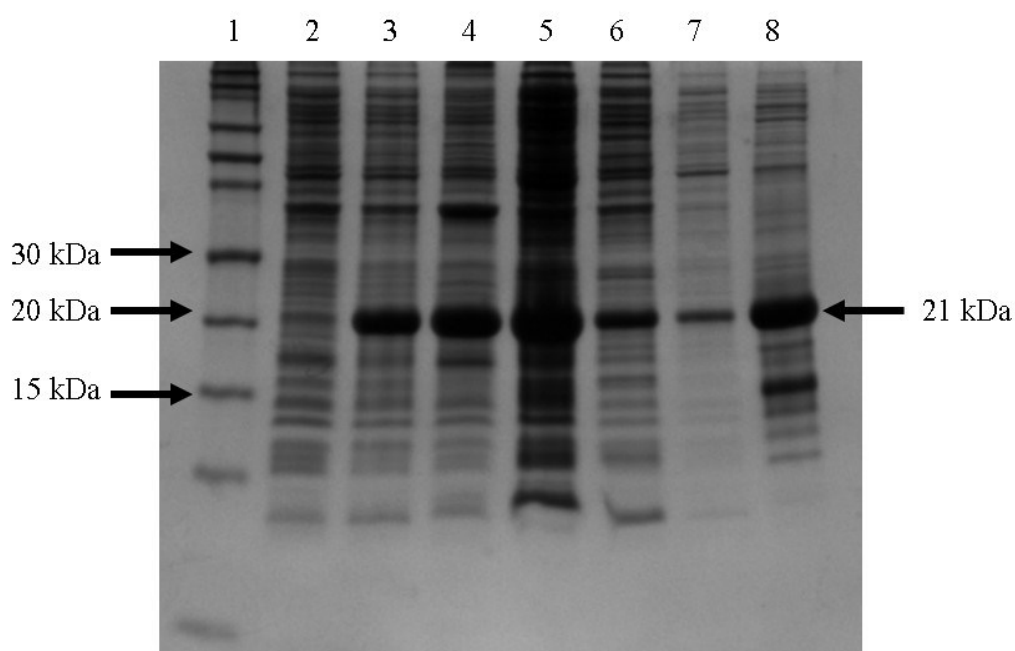
Výsledky a diskusia

Po transformácii buniek E.coli 10G ligačnou zmesou sme kolónie podrobili restriktčnému štiepeniu aby sme potvrdili prítomnosť génu záujmu v plazmide v transformovaných bunkách (Obr. 1).



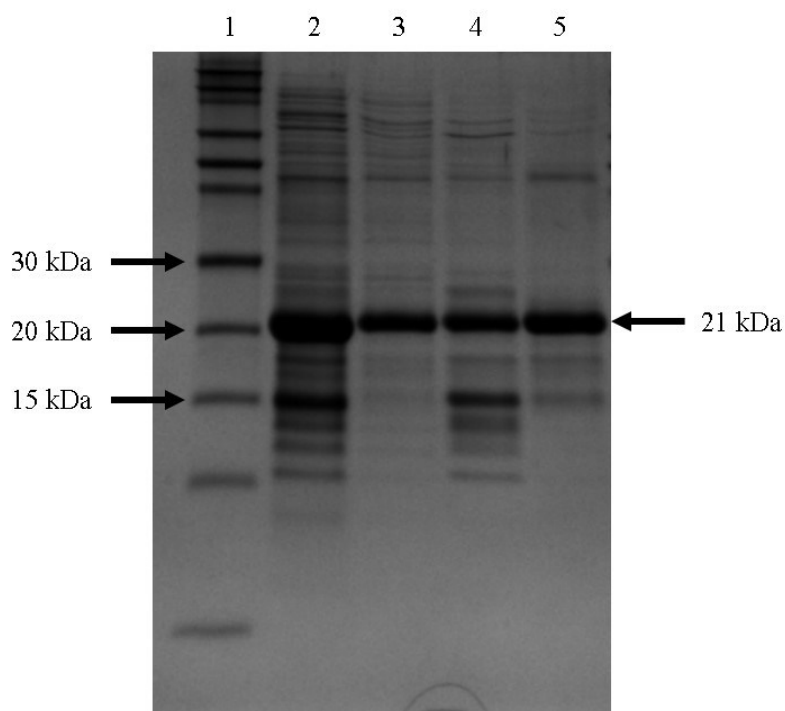
Obr. 1. Restriktčné štiepenie pre potvrdenie inzertu DmITP. Dráha 1: kontrolný plazmid pUC57-DmITP štiepený restriktčnými endonukleázami NaeI a EcoRI, dráha 2: vytvorený konštrukt pJK100EK-DmITP štiepený restriktčnými endonukleázami NaeI a EcoRI, dráha 3: DNA štandard.

Expresný plazmid pJK100EK-DmITP sme následne z buniek vyizolovali a transformovali do produkčného kmeňa BL21 (DE3). Pripravili sme 100 ml nočnej kultúry v TB médiu a inokulovali ňou bioreaktor o objeme 1 litra. Kultivačné podmienky pre produkciu solubilného peptidu v bioreaktore sme vybrali na základe predošlých skúseností v laboratóriu s obdobnými peptidmi. Produkcia a následný prvý krok purifikácie bol analyzovaný pomocou SDS-polyakrylamidovej elektroforézy (SDS-PAGE). Očakávaný produkt Trx-DmITP má molekulovú hmotnosť 21 kDa (Obr. 2).



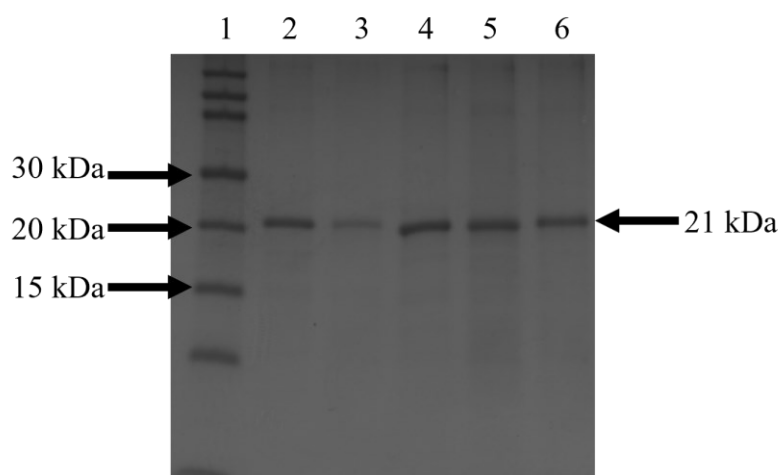
Obr. 2. Analýza SDS-PAGE produkcie Trx-DmITP v bioreaktore a prvej IMAC purifikácie. Dráha 1: štandard molekulovej hmotnosti proteínov, dráha 2: 0 hod expresie, dráha 3: 20 hod expresie, dráha 4: nesolubilná frakcia, dráha 5: solubilná frakcia, dráha 6: frakcia proteínov nezachytených na kolóne (flow-through), dráha 7: frakcia po premytí, dráha 8: frakcia elúcie.

Výsledok analýzy SDS-PAGE nám potvrdil, že možno použiť tie isté kultivačné podmienky ako pri podobných peptidoch nakoľko sme dosiahli produkciu peptidu v solubilnej forme. Avšak po prvotnej purifikácii bolo zrejmé, že bude nutné nasadiť ďalšie purifikačné kroky nakoľko sa mnoho bunkových proteínov naviazalo na matricu a uvoľnilo spolu s peptidom záujmu. Pretože prvotná purifikácia bola robená na veľkoobjemovej kolóne, rozhodli sme sa zaradiť druhý IMAC purifikačný krok na maloobjemovej kolóne s cieľom prečistiť a zakonzentrovat' proteínovú vzorku do menšieho objemu elúcie (Obr. 3).



Obr. 3. Analýza SDS-PAGE druhej IMAC purifikácie. Dráha 1: štandard molekulovej hmotnosti proteínov, dráha 2: vzorka elúcie z prvej chromatografie, dráha 3: frakcia proteínov nezachytených na kolóne (flow-through), dráha 4: frakcia po premytí, dráha 5: frakcia elúcie.

Po druhej chromatografii, ktorá nám zakoncentrovala vzorku do nižšieho objemu a čiastočne prečistila vzorku sme sa rozhodli zaradiť tretí purifikačný krok a to iónomeničovú chromatografiu, kde sme získali niekoľko elučných frakcií (Obr. 4).



Obr. 3. Analýza SDS-PAGE druhej IMAC purifikácie. Dráha 1: štandard molekulovej hmotnosti proteínov, dráha 2: vzorka elúcie z predchošej chromatografie, dráha 3: prvá elučná frakcia, dráha 4: druhá elučná frakcia, dráha 5: tretia elučná frakcia, dráha 6: štvrtá elučná frakcia.

Záver

V uvedenej práci sa nám podarila nadprodukcia hmyzieho neuropeptidu DmITP v solubilnej forme a jeho následná purifikácia vo viacerých krokoch. V nasledujúcich experimentoch sa budeme zaoberať ziskom vyššieho výťažku solubilného proteínu a jeho ďalším prečistením a jeho následnou aplikáciou v štúdiách u partnerov na Zoologickom ústave SAV.

PodĎakovanie

Príspevok je výsledkom realizácie projektov APVV-19-0196 a LISPER (ITMS2014:313011V446) na základe podpory operačného programu Integrovaná infraštruktúra financovaného z ERDF.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Begum K., Li B., Beeman R. W., et al. (2009) *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 39, p. 717
- [2] Drexler A.L., Harris C. C., Dela Pena M. G., et al. (2007) *Cell Tissue Res.* 329, p. 391
- [3] Johard H. A. D., Yoishii T., Dircksen H., et al. (2009) *J. Comp. Neurol.* 516, p. 59
- [4] Nagai C., Mabashi-Asazuma, H., Nagasawa H., et al. (2014) *J. Biol. Chem.* 289, p. 32166
- [5] Meredith J., Ring M., Macins A., et al. (1996) *J. Exp. Biol.* 199, p. 1053
- [6] Laemmli U. K. (1970) *Nature.* 227, p. 680

Vplyv polystyrénových mikroplastov na rastliny ľanu siateho (*Linum usitatissimum* L.)

Ingrid Zriniová¹, Marko Bajus², Dmitrij Bondarev³, Diana Hačkuličová², Danica Kučerová²,
Eva Labancová², Kristína Šípošová², Zuzana Vivodová², Karin Kollárová²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyziológie rastlín, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; zriniova2@uniba.sk

²Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika

³Ústav polymérov Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 845 41 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Influence of polystyrene microplastics on the flax plants (*Linum usitatissimum* L.)

Plastics, due to their large amount in the terrestrial ecosystem and their degradation into smaller particles, can pose a risk to higher plants and expose them to potential risks that can affect their growth and development. The aim of this study was to determine and compare the effect of three selected concentrations of microplastics on the growth of primary roots of flax plants. We also investigated the hydrogen peroxide content of primary roots and leaves and compared with control samples. Finally, we investigated the activity of enzymatic antioxidants guaiacol peroxidase, ascorbate peroxidase and catalase in the roots and leaves of flax. The obtained results will be the basis for our further studies focused on the impact of microplastics on flax plants.

Keywords: ascorbate and guaiacol peroxidase; catalase; hydrogen peroxide; microplastics

Úvod

Znečistenie životného prostredia mikroplastami (MPs) je jedným z najvážnejších environmentálnych problémov súčasnosti. MPs sú všeobecne definované ako plastové častice s veľkosťou do 5 mm [1]. Väčšina doterajších výskumov sa zameriavala na ich vplyv na vodný ekosystém. Zistilo sa však, že približne 80 % MPs znečistenia pochádza zo zemského / pôdneho prostredia, kde medzi hlavné zdroje znečistenia patria splašky, zvetrávanie a degradácia plastových odpadov a agrosystémy poľnohospodárstva. Plastové mulčovanie a zavlažovanie odpadovou vodou sú zdrojmi MPs v poľnohospodárskej pôde [2]. Nedávne štúdie pôsobenia MPs na vyššie rastliny ukázali, MPs môžu negatívne ovplyvňovať klíčenie semien a rast a vývin rastlín [3]. MPs pôsobia na rastliny ako stresový faktor a ich fytotoxicita súvisí s ich koncentráciou, typom plastu, veľkosťou a tvarom častíc [4].

Oxidačný stres je fyziologický jav, ktorý sprevádza prakticky všetky biotické a abiotické stresy vo vyšších rastlinách, a vzniká v dôsledku nadprodukcie a akumulácie reaktívnych foriem kyslíka. To spúšťa obranný antioxidačný systém, ktorý tvoria enzymatické a neenzymatické antioxidanty, ktorých úlohou je vychytávať reaktívne formy kyslíka. Medzi enzymatické antioxidanty patria antioxidačné enzýmy: kataláza (CAT), superoxid dismutáza,

askorbát peroxidáza (APX), guajakol peroxidáza (GPX) a medzi neenzymatické antioxidanty patria tokoferoly, glutatión, askorbát, karotenoidy a fenolové zlúčeniny.

Dôležitou molekulou počas oxidačného stresu je peroxid vodíka (H_2O_2) [5]. Zistilo, že zohráva úlohu pri regulácii procesov, ako je napr. starnutie, fungovanie prieduchov, riadenie bunkového cyklu, fotosyntéza, tolerancia voči stresu a antioxidačná obrana [6]. H_2O_2 je prospešný pre rastliny v nízkych koncentráciách, naopak škodlivý pri vyšších koncentráciách v bunkách.

V tejto práci sme skúmali vplyv troch koncentrácií polystyrénových mikroplastov na dĺžku primárneho koreňa, obsah peroxidu vodíka a aktivitu antioxidačných enzýmov, guajakol peroxidázy, askorbát peroxidázy a katalázy, v koreňoch a listoch ľanu siateho.

Materiál a metódy

Semená ľanu siateho (odroda Libra, OSIVO a. s., Zvolena) sme vysterilizovali v 0,47 % roztoku chlórnanu sodného a nechali napučiavať 2 hodiny. V papierových roľkách sme ich nechali klíčiť v kultivačnej miestnosti 3 dni v tme pri teplote 22 °C. Po vyklíčení sme rastliny ľanu pestovali v hydroponických podmienkach v kultivačných nádobách s Hoaglandovým živným roztokom [7] rozdelené na 4 varianty a to na: kontrolu (K), koncentrácia mikroplastov 50 mg/l (50MPs), 100 mg/l (100 MPs) a 250 mg/l (250 MPs). Rastliny sme nechali kultivovať 14 dní. Na 14. deň kultivácie sme zmerali dĺžku primárnych koreňov.

Mikropasty boli pripravené na Ústave polymérov SAV mikroprecipitáciou z roztoku polystyrénu a fluorescenčnej značky P33 [8]. Veľkosti častíc boli merané analyzátorom častíc (Zetasizer Nano) metódou dynamického rozptylu svetla. Ich veľkosť sa pohybovala v rozmedzí 300 – 400 nm.

Koncentráciu peroxidu vodíka (H_2O_2) sme stanovili na základe reakcie s jodidom draselným (KI), pri ktorej dochádza ku vzniku žltého zafarbenia roztokov [9]. Rastlinný materiál (korene a listy) sme zhomogenizovali v 50 mM Na-fosfátovom tlmivom roztoku a centrifugovali 10 minút pri 4 °C a zrýchlení 5 000 g. Supernatant sme rozpustili v 1 mM roztoku KI v pomere 1 : 2. Absorbanciu sme merali spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 390 nm a výsledné hodnoty koncentrácie peroxidu vodíka sme vypočítali z kalibračnej krivky. Hodnoty v grafoch sú prepočítané percentuálne ku kontrole (hodnota kontroly predstavuje 100 %).

Koncentráciu rozpustných proteínov vo vzorkách sme stanovili Bradfordovou metódou [10]. Spektrofotometricky sme stanovili aktivitu troch enzýmov: GPX, APX a CAT.

Stanovenie aktivity GPX [11] je založené na rýchlosti oxidácie guajakolu, pričom vzniká hnedý až hnedo-červený produkt tetraguajakol. Absorbanciu sme merali pri vlnovej dĺžke $\lambda = 440$ nm v časových intervaloch $t_0 = 0$ s a $t_1 = 15$ s.

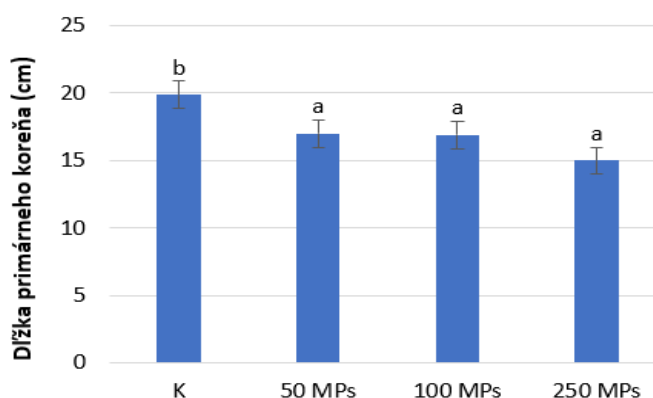
Stanovenie aktivity APX [12] je založené na redukcii H_2O_2 na H_2O a kyselinu dokosahexaenovú pomocou askorbátu. Absorbanciu sme merali pri vlnovej dĺžke $\lambda = 290$ nm v časových intervaloch $t_0 = 0$ s a $t_1 = 30$ s.

Pri stanovení aktivity CAT [13] sme využili pokles absorbancie následkom rozkladu peroxidu vodíka v reakčnej zmesi. Absorbanciu sme merali pri vlnovej dĺžke $\lambda = 290$ nm v časových intervaloch $t_0 = 0$ s, $t_1 = 30$ s a $t_2 = 60$ s. Hodnoty aktivít jednotlivých enzýmov v grafoch sú prepočítané percentuálne ku kontrole (hodnota kontroly predstavuje 100 %).

Výsledky našich meraní sme štatisticky spracovali metódou ANOVA a následne Tukeyho post hoc testom v programe Statistica, verzia 9.1.

Výsledky a diskusia

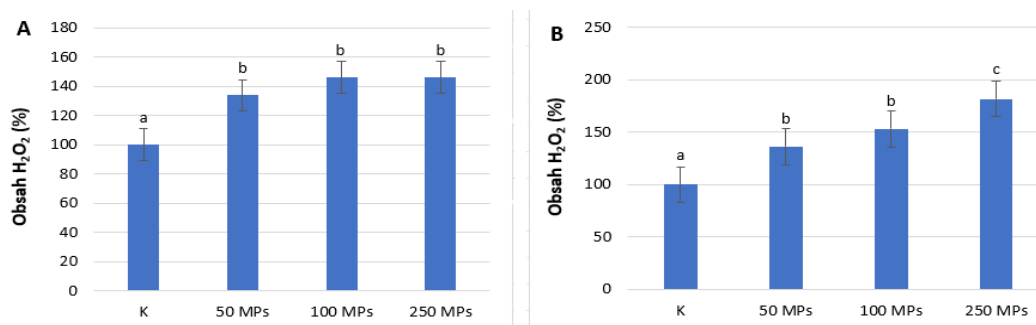
Sledovali sme vplyv troch rôznych koncentrácií MPs (50 mg/l, 100 mg/l a 250 mg/l) na rast primárneho koreňa ľanu. Mikroplasty inhibovali rast primárneho koreňa oproti kontrole vo všetkých testovaných variantoch (obr. 1). Medzi jednotlivými koncentráciami sme nezaznamenali štatisticky preukazný rozdiel v inhibícii rastu primárneho koreňa. Podobne Zantis a kol. [14] zistili, že v rastlinách šalátu dochádza pod vplyvom polystyrénových mikroplastov k inhibícii rastu primárneho koreňa.



Obr. 1. Dĺžka primárneho koreňa ľanu siateho. K – kontrola, bez prídavku mikroplastov; 50 MPs – koncentrácia mikroplastov 50 mg/l; 100 MPs – koncentrácia mikroplastov 100 mg/l; 250 MPs – koncentrácia mikroplastov 250 mg/l. Rôzne písmená označujú štatisticky preukazné rozdiely medzi variantami na úrovni preukaznosti $p < 0,05$.

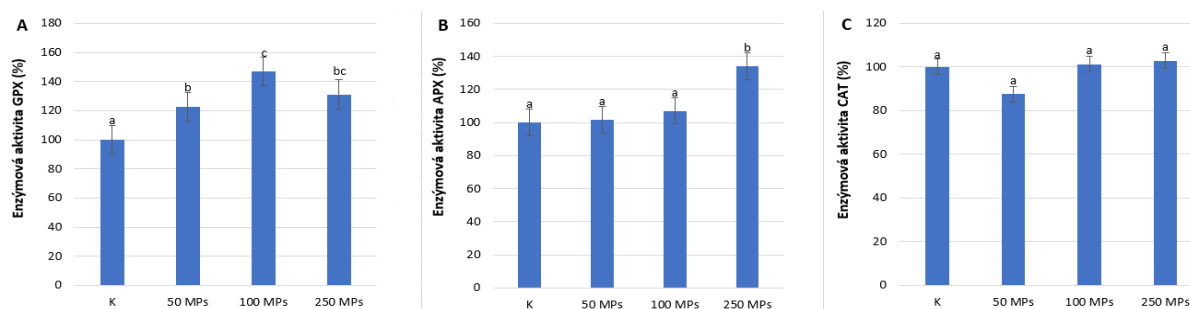
Ďalej sme stanovili koncentráciu peroxidu vodíka v koreňoch a v listoch. Zistili sme,

že pod vplyvom MPs sa zvýšila koncentrácia H_2O_2 v koreňoch aj v listoch, pričom medzi použitými koncentráciami MPs neboli štatisticky významné rozdiely (obr. 2A, 2B). Zvýšenie koncentrácie H_2O_2 pod vplyvom MPs indikuje, že v rastlinách ľanu spúšťa ich prítomnosť oxidačný stres [5]. V rastlinách ryže sa v prítomnosti polystyrénových mikroplastov taktiež zvýšila koncentrácia H_2O_2 , aj keď inhibíciu rastu koreňa nezistili [15].



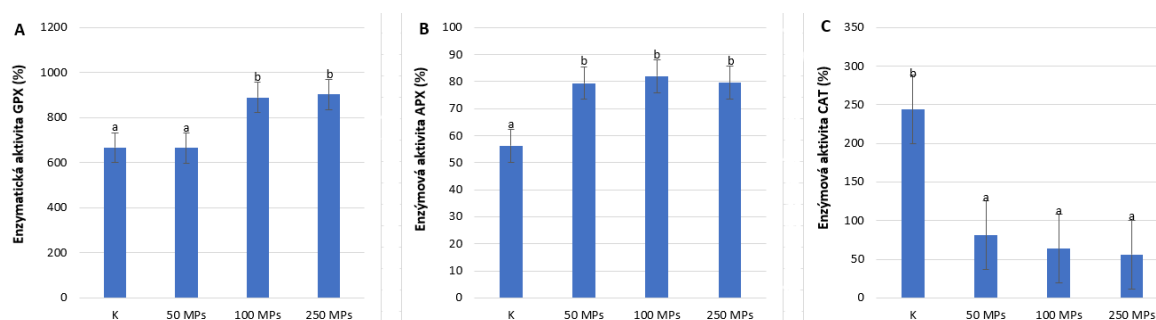
Obr. 2. Obsah peroxidu vodíka v koreňoch (A) a v listoch (B) ľanu siateho. K – kontrola, bez prídavku mikroplastov; 50 MPs – koncentrácia mikroplastov 50 mg/l; 100 MPs – koncentrácia mikroplastov 100 mg/l; 250 MPs – koncentrácia mikroplastov 250 mg/l. Hodnoty v grafoch sú prepočítané percentuálne ku kontrole (hodnota kontroly predstavuje 100 %). Rôzne písmená označujú štatisticky preukazné rozdiely medzi variantami na úrovni preukaznosti $p < 0,05$.

Zistili sme rozdiely v aktivite enzýmov GPX, APX a CAT v koreňoch a listoch. V koreňoch sa zvýšila aktivita GPX vo všetkých sledovaných koncentráciách MPs v porovnaní s kontrolou (obr. 3A). V prípade APX sme štatisticky preukazné zvýšenie aktivity enzýmu v koreňoch zaznamenali iba v najvyššej použitej koncentrácii MPs, 250 mg/l (obr. 3B). Aktivita CAT v koreňoch sa pod vplyvom MPs štatisticky významne nezmenila v porovnaní s kontrolou (obr. 3C).



Obr. 3. Aktivita GPX (A), APX (B) a CAT (C) v koreňoch ľanu siateho. K – kontrola, bez prídavku mikroplastov; 50 MPs – koncentrácia mikroplastov 50 mg/l; 100 MPs – koncentrácia mikroplastov 100 mg/l; 250 MPs – koncentrácia mikroplastov 250 mg/l. Hodnoty v grafoch sú prepočítané percentuálne ku kontrole (hodnota kontroly predstavuje 100 %). Rôzne písmená označujú štatisticky preukazné rozdiely medzi variantami na úrovni preukaznosti $p < 0,05$.

V listoch, podobne ako v koreňoch, sa pod vplyvom MPs zvýšila aktivita GPX, avšak iba v dvoch najvyšších koncentráciách MPs (obr. 4A). Vo variante 50 MPs sme nezaznamenali žiadny signifikantný rozdiel v porovnaní s kontrolou. Zvýšenie aktivity APX v listoch sme zaznamenali vo všetkých variantoch, pričom medzi jednotlivými variantami neboli štatisticky významné rozdiely (obr. 4B). V prípade CAT sme zistili rozdiel v porovnaní s koreňmi, aktivita enzýmu sa pod vplyvom MPs znížila. Rozdiely medzi jednotlivými koncentraciami MPs neboli štatisticky preukazné (obr. 4C). Zníženie aktivity katalázy počas oxidačného stresu je fenomén vyskytujúci sa vo viacerých rastlinách [16]. Súvisí to pravdepodobne s akumuláciou kyseliny salicylovej.



Obr. 4. Aktivita GPX (A), APX (B) a CAT (C) v listoch ľanu siateho. K – kontrola, bez prídavku mikroplastov; 50 MPs – koncentrácia mikroplastov 50 mg/l; 100 MPs – koncentrácia mikroplastov 100 mg/l; 250 MPs – koncentrácia mikroplastov 250 mg/l. Hodnoty v grafoch sú prepočítané percentuálne ku kontrole (hodnota kontroly predstavuje 100 %). Rôzne písmená označujú štatisticky preukazné rozdiely medzi variantami na úrovni preukaznosti $p < 0,05$.

Záver

MPs inhibovali rast koreňa v porovnaní s kontrolou vo všetkých testovaných koncentráciách. Nárast koncentrácie peroxidu vodíka indikuje, že MPs spúšťajú v koreňoch a listoch ľanu oxidačný stres, na ktorý rastliny reagujú zvýšením aktivity antioxidantných enzýmov. Aktivita antioxidantných enzýmov závisela od koncentrácie MPs a typu enzýmu. MPs si ako novo identifikovaný stresový faktor v rastlinách vyžadujú zvýšenú pozornosť. Na objasnenie mechanizmov ich pôsobenia bude potrebný ďalší výskum.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla za podpory grantov VEGA 2/0055/22 a APVV 19-0250.

Zoznam použitej literatúry

- [1] de Souza Machado A. A., Kloas W., Zarfl C. et al. (2018) *Global Change Biol.* 24, p. 1405
- [2] Cruz Sanchez F. A., Boudaoud H., Camargo H. et al. (2020) *J. Clean. Prod.* 264, p. 121602
- [3] Roy T., Dey T. K., Jamal M. (2022) *Environ. Monit. Assess.* 195, p. 27
- [4] Chen G., Li Y., Liu S. et al. (2022) *Sci. Total Environ.* 807, p. 150841
- [5] García-Caparrós P., De Filippis L., Gul A. et al. (2021) *Bot. Review* 87, p. 421
- [6] Lv X., Li H., Chen X. et al. (2018) *J. Exp. Bot.* 69, p. 4127
- [7] Hoagland D. R., Arnon D. I. (1950) *Calif. Agric. Exp. Stat.* 347, p. 1
- [8] Slusna L. P., Szocs V., Bondarev D. et al. (2020) *Chem. Select* 5, p. 14261
- [9] Velikova V., Yordanov I., Edreva A. et al. (2000) *Plant Sci.* 151, p. 59
- [10] Bradford M. M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, p. 248
- [11] Frič F., Fuchs W. H. (1970) *J. Phytopatol.* 67(2), p. 161
- [12] Nakano Y., Asada K. (1981) *Plant Cell Physiol.* 22(5), p. 867
- [13] Hodges D. M., Andrews C. J., Johnson D. A. et al. (1997) *J. Exp. Bot.* 48(5), p. 1105
- [14] Zantis L. J., Borch C., Vijver M. G., et al. (2023) *Sci. Total Environ.* 867, p. 161211
- [15] Zhang Q., Zhao M., Meng F. et al. (2021) *Toxics* 9, p. 179
- [16] Shim L.-S., Momose Y., Yamamoto A. et al. (2003) *Plant Growth Regul.* 39(3), p. 285

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA**



**eŠVK
PRIF UK
2023**

CHÉMIA

**ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2023
ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV**

Colloidal gold and silver nanocrystals for studies of antimicrobial activity

Ivana Božeková¹, Mária Mazúrová², Miroslava Horniačková², Milan Sýkora¹

¹*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Laboratory for Advanced Materials, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak republic; bozekova7@uniba.sk*

²*Slovak Medical University in Bratislava, Institute of Microbiology, Department of Microbiology, Limbová 12, 833 03 Bratislava, Slovak republic*

Abstract

An important characteristic of nanocrystals (NCs) is that their optical properties, chemical reactivity vary not only with their chemical composition, but also with their size and shape. Studies show that Au and Ag NCs in the size range <100 nm show activity as an effective antimicrobial agent. An essential first step towards such studies is preparation of NCs of various sizes, with narrow size-and shape dispersions, followed by an investigation of their stability in biological growth media and testing the antibacterial activity of metallic NCs with selected bacteria which are responsible for resistance of antibiotics. Herein, we describe preparation of aqueous Au and Ag NCs with well-defined sizes by reduction of Au and Ag salts with strong reducing agents in aqueous media, then monitoring of the stability our prepared NCs in biological growth media and the results of growth inhibition of specific bacteria caused by metal NCs.

Keywords: *Gold and silver nanoparticles/nanocrystals; antimicrobial activity*

Introduction and Objectives

Tunability of the physical and chemical properties of metal nanocrystals (NCs) by their size and shape makes them appealing materials for exploitation in applications ranging from electronics to medicine [1 – 5]. Metal NCs comprising Au, Ag or Cu, in the size range below 100 nanometers have shown activity as antimicrobial agents. Several recent studies suggest that these NCs can inhibit growth of bacteria with antibiotic resistance [6]. This is significant, as antibiotic resistance of bacteria represents a world-wide health problem, causing over a million deaths per year [7].

Motivated by these early reports, the goal of our study was: (a) synthesis of Ag and Au NCs with range of sizes 4-100 nm and size dispersions less than 20 %; (b) testing the stability of the NCs in biological growth media and identify the conditions and surface properties of NCs in media that will prevent their aggregation; (c) investigation of the effect of the synthesized NCs on the bacterial growth.

Materials and methods

Au and Ag NCs were prepared by colloidal synthesis in aqueous solution via chemical reduction of corresponding salts, e.g., HAuCl₄ or AgNO₃ (precursors) using reducing agents, tannic acid (TA) and sodium citrate (SC), which play role also as a ligands on the surface of

the NCs [8-10]. The materials were obtained from: SC 99.5 % Glentham; TA 99.5 % and HCl 35 % Centralchem; K_2CO_3 99 % and $AuCl_3$ 99 % Sigma Aldrich; $AgNO_3$ 99 % VWR and used without further purification. Transmission Electron Microscopy (TEM) images were obtained using Analytical transmission electron microscope JEM ARM 200cF. The absorption spectra of NCs were collected on diode-array spectrometer Agilent 8453. The biological growth media were obtained from several suppliers TSB (Tryptic soy broth) and BHI (Brain Heart Infusion Broth) from Neogen, USA; MHB (Mueller Hinton broth) from Bio-Rad, France; LB (Luria-Bertani broth) from BD, Difco Laboratories, France; DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) and PBS (Phosphate-buffered saline) Gibco, USA; and refrigerated until use. The changes in optical properties of NCs upon transfer to the biological growth media were analyzed by comparison of the turbidity (absorption spectra) of the NCs in water solution (control) and appropriate growth medium.

Results and discussion

Following the procedures reported previously in literature [8 – 10], we were able to prepare Au NCs in the range of 4 - 100 nm and Ag NCs in the range of 10 - 40 nm. The sizes of the prepared NCs were determined by TEM (see Fig. 1 a-c). The size dispersion of the prepared materials ranged from 10-20 % (Fig. 1 d-f). The example optical spectra of the Au NCs in water are shown in Fig. 2a. The spectra are characterized by a distinct plasmonic peak at 522 nm (2.37 eV). In aqueous media the absorption characteristics were stable for period of at least 1 year.

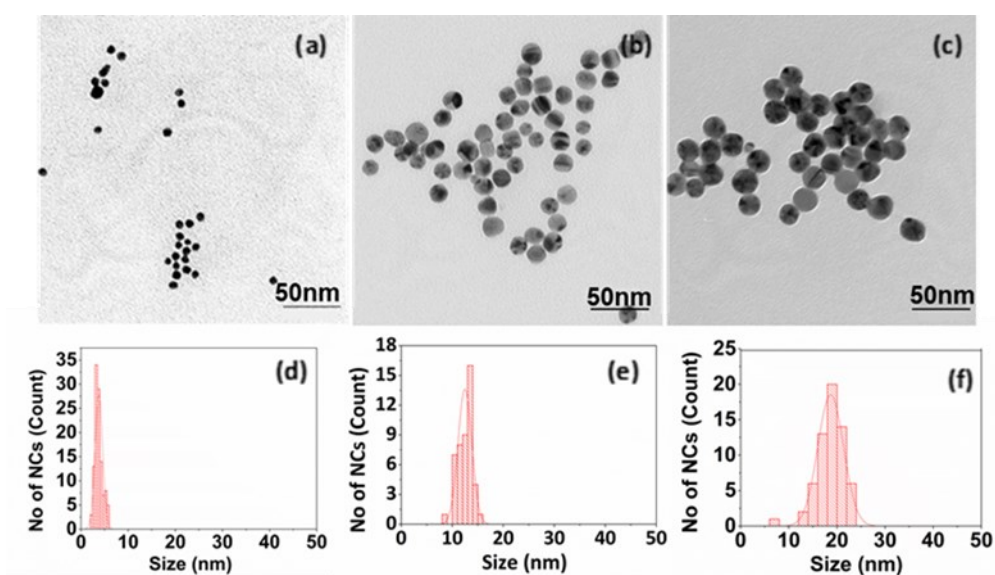


Fig. 1. (a-c) Examples of TEM images and (d-f) size dispersion histograms for the synthesized Au NCs.

Upon transferring to biological growth media, the absorption characteristics of NCs show distinct changes (Fig. 2b, c.). These observed changes were analyzed by fitting the experimental data in aqueous and biological media by methods described previously [11]. The differences in the fits were tentatively attributed either to the aggregation of the NCs, or creating the corona protein on the surface of the NCs, or binding, interacting, or exchanging components of the growth media with the surface of the NCs. Using this assumption, the analysis provides an indication of the relative stability of the NCs in various growth media. The results suggest that the stability of the Au and Ag NCs is best in TSB growth medium and PBS.

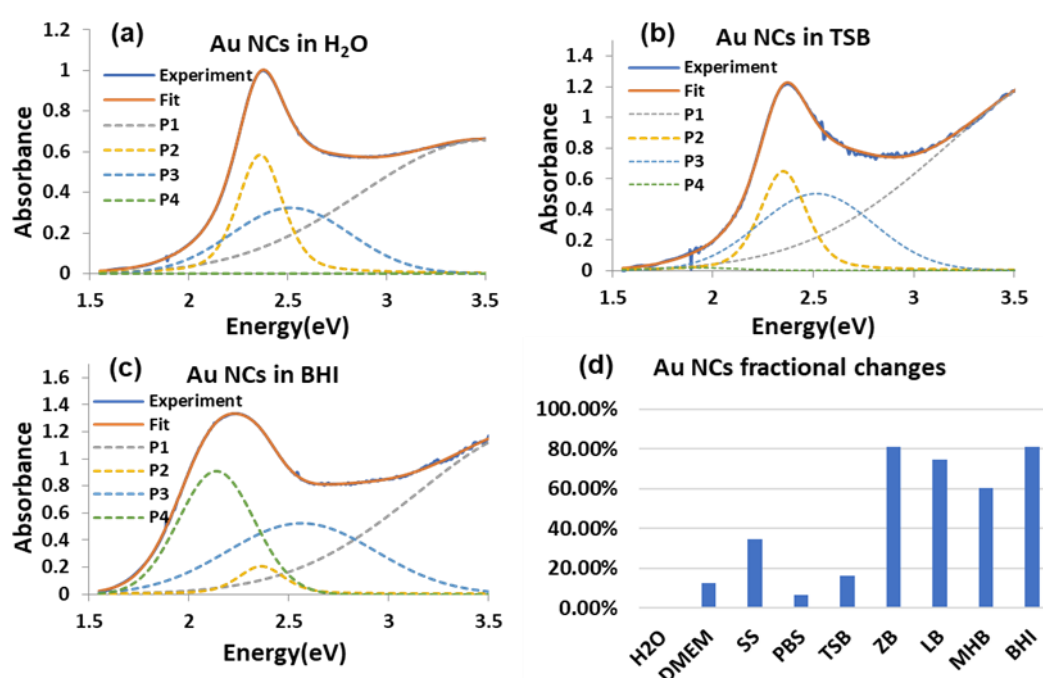


Fig. 2. A comparison of the absorption spectra of Au NCs (a) in water; (b) in TSB; (c) in BHI. The dashed lines show the modelled composition peaks used to reconstruct the best fit (orange trace) to the experimental data (blue trace). Panel (d) shows the Au NCs fractional changes extracted from the spectral fit analysis of Au NCs in various growth media.

The investigation of the interactions between the NCs and bacteria was performed using an analysis of the optical changes in the microbiological plate containing NCs and bacteria in TSB. The experiments were performed using four types of bacteria: *Escherichia coli* CCM 3954, *Enterococcus faecalis* CCM 4224 and two *Klebsiella pneumoniae* (CCM 4224 and ZPM 135) with Ag and Au NCs with sizes ranging from 3-25 nm. The typical NC concentration range was 25 – 150 mg/L. After mixing bacteria with NCs, the mixtures were incubated for 24 hours at 37 °C. Bacterial growth appeared as increased turbidity in the well, which was

quantified spectroscopically. The results indicated quantitatively the extent of the bacterial growth over the 24-hour period in the absence and presence of NCs. The example results for interaction between Ag NCs with size 22.6 nm and bacterium *E. coli* are shown in Fig 3. The results reveal that in this case the bacterial growth is fully inhibited at NC concentrations >100 mg/L. The bacterial growth was also analyzed by colorimetric approach, where the extent of the growth was tested using indicator dye MTT (methylthiazolyldiphenyl tetrazolium). The results of both methods were consistent.

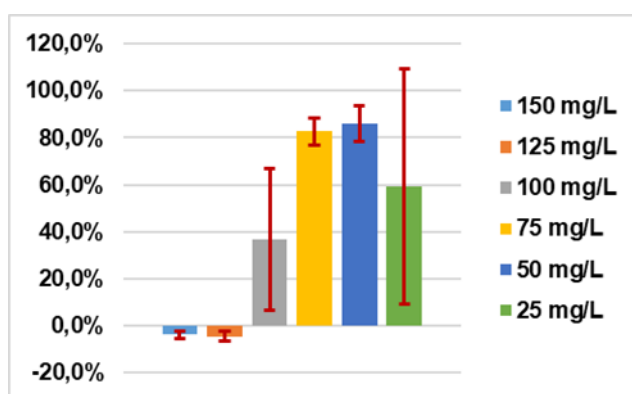


Fig. 3. An example of the growth for bacteria *E. coli* in the presence of Ag NCs with diameter 22.6 nm, as a function NC concentration (the bacterial growth is fully inhibited at NC concentrations >100 mg/L).

Conclusion

We prepared and characterized NCs of gold with sizes of 4-100 nm and silver with sizes of 10-40 nm. The materials are stable in aqueous solution and show characteristic plasmonic absorption peaks with the peak energy varying systematically with the NC size. The absorption characteristics of the plasmon bands are significantly distorted in the biological growth media. Using an assumption that the observed distortions are mainly due to the NC changes (aggregation or change of surface properties), we identified biological growth media most suitable for studies of the bacteria-NCs interactions. The initial studies of interactions of NCs with bacteria suggest that both Ag and Au NCs can inhibit the growth of specific bacteria at concentrations above 50-100 mg/L. More quantitative analysis of the inhibition concentration and the mechanism of NC bacteria interactions are currently in progress.

Acknowledgement

This work was financially supported by the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No. 810701, Slovak Research and Development Agency under grant agreement No. APVV-19-410, Slovak Ministry of education

under grant agreement No. 1/0892/21, Slovak Medical University in Bratislava Grant No 132021-SVG1 and by UK grant No. UK/425/2021.

References

- [1] An K., Somorjai G. A. (2012) ChemCatChem. 4(2) p. 1512
- [2] Anker J. N., Hall W. P., Lysanders O., et al. (2008) Nat. Mater. 7(2) p. 442
- [3] Rosi N. L., Mirin C.A. (2005) Chem. Rev. 105(4), p. 1547
- [4] Murphy C. J., Goole A. M., Stone J. W., et al. (2008) Acc. Chem. Res. 41(2), p. 1721
- [5] Hervés P., Pérez-Lorenzo M., Liz-Marzán L. M., et al. (2012) Chem. Soc. Rev. 41(2), p. 5577
- [6] Faramarzi M. A., Sadighi A. (2013) Advances in Colloid and Interface Science 189-190(1), p. 1
- [7] Pires D., Kraker M. E. A., Tartari E., et al. (2017) Clin. Inf. Diseases. 64(2), p. 1780
- [8] Piella J., Bastús N. G., Puentes V., et al. (2016) Chem. Mater. 28(2), p. 1066
- [9] Bastús N. G., Merkoçi F., Piella J., et al. (2014) Chem. Mater. 26(2), p. 2836
- [10] Bastús N. G., Comenge J., Puentes V., et al. (2011) Langmuir. 27(2), p. 11098
- [11] Ida T., Ando M., Toraya H., et al. (2000) J. Appl. Cryst. 33(2), p. 1311

In silico* návrh a testovanie možných inhibítorov enzýmu GlfT2 z *Mycobacterium tuberculosis

Monika Ďuračková¹, Barbora Stratilová², Stanislav Kozmon²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra biochémie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; durackova20@uniba.sk

²Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Oddelenie štruktúry a funkcie sacharidov, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

In silico design and testing of potential GlfT2 enzyme inhibitors from *Mycobacterium tuberculosis*

GlfT2 is an essential enzyme involved in cell wall biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. This glycosyltransferase catalyzes formation of β -(1 $\rightarrow$ 5) and β -(1 $\rightarrow$ 6) glycosidic bonds between Galf residues. Since it is not found in human cells, it is an excellent therapeutic target for the development of new antituberculosis drugs. The aim of our work was to find novel and effective inhibitors against GlfT2 by virtual screening of Chembridge database. Selected 92 structures were docked into model of GlfT2 without acceptor substrate, with acceptor in position allowing transfer of galactofuranose to O5 oxygen and with acceptor in position allowing transfer to O6 oxygen. From all of the structures were selected the best three ligands based on their binding affinity evaluated by means of docking score, and parameters like interaction with Mg²⁺ ions, catalytic aspartic acid 372 and other aspartic acids located in binding site.

Keywords: *GlfT2; molecular docking; Mycobacterium tuberculosis*

Úvod a formulácia cieľa

Enzým galaktofuranozyltransferáza 2 (GlfT2) sa nachádza v *Mycobacterium tuberculosis*. Tento enzým s homotetramérnou štruktúrou je jeden z kľúčových pri biosyntéze galaktánu, ktorý je nevyhnutný pre životaschopnosť baktérie, pretože jadro mykolyl-arabinogalaktán-peptidoglykánového komplexu (mAGP) je zložené z galaktánovej domény pozostávajúcej zo zvyškov galaktofuranózu (Galf) pospájaných peptidoglykánom [1]. GlfT2 je bifunkčný enzým, ktorý katalyzuje tvorbu β -(1 $\rightarrow$ 5) a β -(1 $\rightarrow$ 6) glykozidových väzieb medzi Galf rezíduami. Prenáša Galf z donora UDP-Galf na rastúci reťazec Galf, ktorý slúži ako akceptor [2].

V tejto práci sa sústredíme na hľadanie molekúl, ktoré by mohli slúžiť ako inhibítory pre enzým Galaktofuranozyltransferázu 2 nachádzajúcu sa v *M. tuberculosis*.

Materiál a metódy

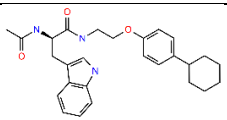
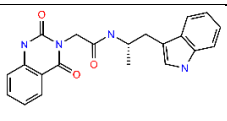
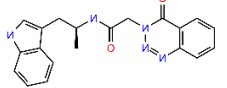
V spolupráci s Dr. Sean Ekins z Collaboration Pharmaceuticals, Inc. nám bolo poskytnutých 31 2D štruktúr, ktoré boli vybrané pre-skríningom databázy Chembridge založenej na chemoinformatickej metóde podobnosti s natívnymi ligandmi.

Poskytnuté štruktúry sme previedli pomocou programu Maestro do 3D formátu. Následne sme programom LigPrep [3] vygenerovali všetky ich tautomérmne formy. Týmto spôsobom bolo pripravených celkovo 93 3D štruktúr, ktoré boli využité na ďalšie skúmanie. Pripravené molekuly boli zoptimalizované do lokálneho energetického minima a zároveň sa pomocou programu Jaguar kvantovo-mechanickou metódou DFT B3LYP-D3 s použitím bázoého setu a 6-31G** [4] napočítali na jednotlivých molekulách parciálne elektrostatické náboje. Takto pripravené molekuly sme použili na dokovanie pomocou programu Glide [5] aplikáciou protokolu Standard Precision, pričom rozmery boxu, priestoru do ktorého sa umiestňoval ligand, boli nastavené na 14 Å x 14 Å x 14 Å. Stred priestoru je umiestnený vo väzobnom mieste UDP-Galf. Zo všetkých získaných polôh sme vybrali 3, ktoré mali najlepšie dokovacie skóre, ktoré predstavuje vypočítané nekovalentné 3D interakcie medzi ligandom a proteínom, vo všetkých troch modeloch enzýmu GlfT2.

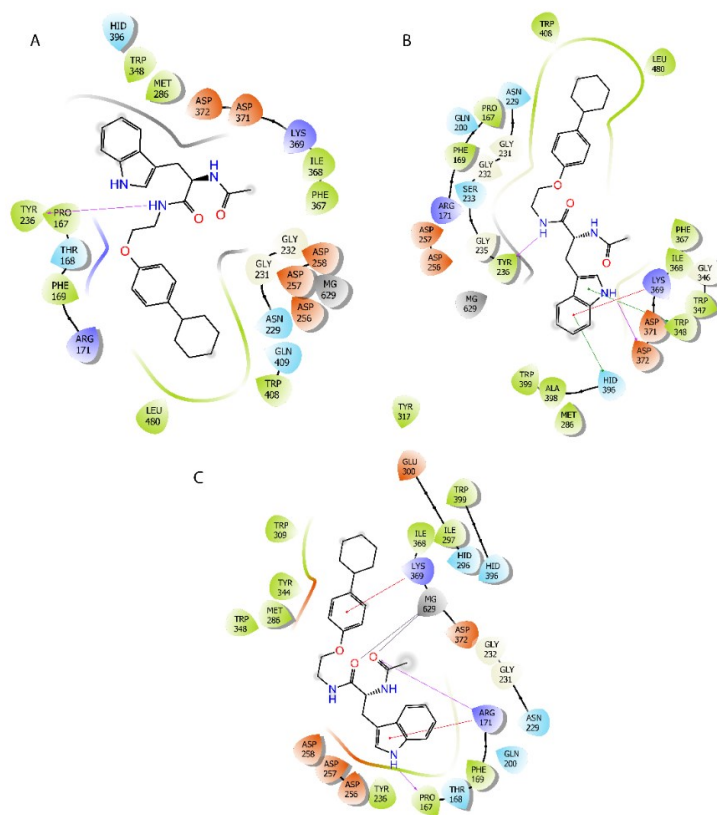
Výsledky a diskusia

Dokovanie ligandov prebiehalo do troch rôznych modelov enzýmu GlfT2. Najprv sme použili enzým, ktorý vo väzobnom mieste nemal akceptor. Potom sme dokovali do enzýmu s akceptorom β -(1→5), ktorý je v polohe umožňujúcej vznik O-5-glykozidovej väzby medzi Galf a akceptorovým reťazcom. V treťom prípade bol použitý enzým s akceptorom β -(1→6), ktorý sprostredkováva prenos Galf na O-6 akceptorovej Galf. Zo získaných výsledkov dokovania sme vybrali tri komplexy akceptor-ligand, ktoré mali najlepšie skóre, čiže najnižšie číslo, vo všetkých troch väzobných miestach. Tiež sme hľadali ligandy, ktoré budú interagovať s aminokyselinou Asp372 a horečnatým iónom (Mg^{2+}).

Tab. 1. Výsledky dokovacieho skóre pre vybrané ligandy a ich názvy

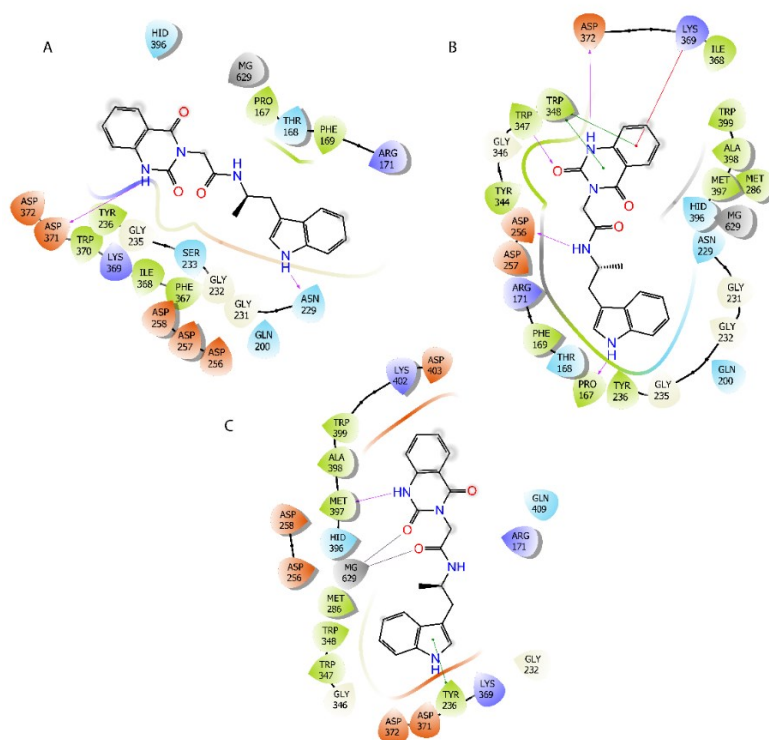
Štruktúra	Názov	Skóre v mieste bez akceptora	Skóre v mieste s akceptorom β -(1→5)	Skóre v mieste s akceptorom β -(1→6)
	N-acetyl-N-[2-(4-cyclohexylphenoxy)ethyl]tryptophanamide	-9,282	-4,841	-6,967
	2-(2,4-dioxo-1,4-dihydro-3(2H)-quinazoliny)-N-[2-(1H-indol-3-yl)-1-methylethyl]acetamide	-8,448	-5,761	-7,844
	N-[2-(1H-indol-3-yl)-1-methylethyl]-2-(4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3(4H)-yl)acetamide	-8,132	-5,091	-6,571

Najlepšie dokovacie skóre -9,282 mal ligand 7953864 v aktívnom mieste, v ktorom sa nenachádzal vo väzobnom mieste akceptor. V aktívnom mieste s akceptorom β -(1 $\rightarrow$ 6) mal tento ligand tretie najlepšie skóre spomedzi všetkých dokovaných ligandov -6,967. Pri akceptore β -(1 $\rightarrow$ 5) mal skóre -4,841. Vo všetkých troch prípadoch ligand interagoval s katalytickou bázou Asp372 a aj s iónom Mg^{2+} . Pri porovnaní interakcii, ktoré má ligand v jednotlivých väzobných miestach, si môžeme všimnúť, že v modeloch s akceptorom ligand interaguje okrem Asp372 aj s Asp371 (Obr.1). Ligand mal v aktívnom mieste s naviazaným β -(1 $\rightarrow$ 5) akceptorom silnú interakciu prostredníctvom vodíkovej väzby (Obr.1, šípky) iba s Tyr236. S ďalšími aminokyselinami ako aj s Mg^{2+} vytváral slabé interakcie (Obr.1A). S ligandom s β -(1 $\rightarrow$ 6) akceptorom vytvárali pi-pi „stacking“ Tyr236, Trp348, Lys369, Asp372 a His396. Za interakciu medzi ostatnými aminokyselinami zodpovedali van der Waalsove sily (Obr.1B). V modeli bez akceptora oxo skupiny na ligande vytvárali s kovom koordináciu väzbu. Vodíkovú a pi-katión väzbu mali s ligandom aminokyseliny Pro169, Arg171, Lys369. Ostatné aminokyseliny interagovali s ligandom iba prostredníctvom van der Waalsových síl (Obr.1C).



Obr. 1. Interakčné diagramy zobrazujúce aminokyselinové reziduá interagujúce s ligandom 7953864 (A) – s β -(1 $\rightarrow$ 5) akceptorom, (B) – s β -(1 $\rightarrow$ 6) akceptorom, (C) – bez akceptora

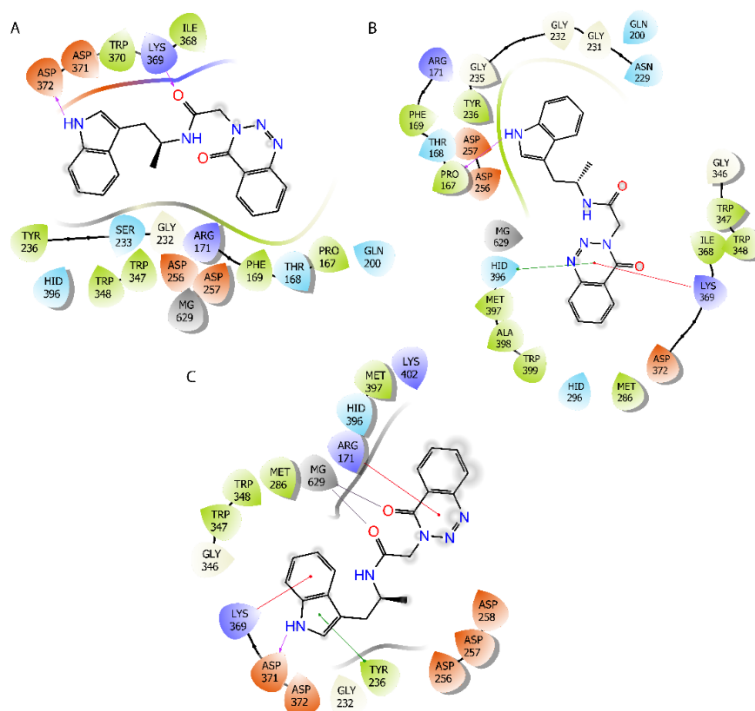
Druhým ligandom, ktorý sme vybrali na vyhodnotenie bol 9219493. Pre tento ligand vychádzalo najlepšie skóre, čiže -8,448 pre model enzýmu, ktorý nemal vo väzobnom mieste akceptor. -5,761 vyšlo skóre v aktívnom mieste, v ktorom bol naviazaný akceptor β -(1 $\rightarrow$ 5). Pre enzým s naviazaným β -(1 $\rightarrow$ 6) akceptorom vychádzalo dokovacie skóre -7,844, čo je oveľa lepšie ako s akceptorom β -(1 $\rightarrow$ 5). Ligand interagoval vo všetkých troch miestach s Mg^{2+} a aj s aminokyselinou Asp372 (Obr.2). V modeli s β -(1 $\rightarrow$ 5) akceptorom interagoval okrem Asp372 aj s trojicou aspartátov 256, 257 a 258. Silnú vodíkovú väzbu mal s Asp371 a Asn229 (Obr.2A). V modeli s β -(1 $\rightarrow$ 6) akceptorom mal interakcie aj s Asp256, Asp257, pričom s Asp256 a Asp372 tiež interagoval prostredníctvom vodíkovej väzby. Okrem aspartátov mali silné pi-pi interakcie aj Pro167, Trp347, Trp348 a Lys369 (Obr.2B). Ligand v modeli bez akceptora vytváral koordinačnú väzbu s Mg^{2+} , Tyr236 a Met397. S Asp256, 258, 371, 372 a 403 interagoval prostredníctvom slabých síl (Obr.2C). Podľa polohy, v ktorej sa ligand nachádzal po dokovaní vo väzobnom mieste, je pravdepodobné, že by bol účinný ako inhibítor.



Obr. 2. Interakčné diagramy zobrazujúce aminokyselinové reziduá interagujúce s ligandom 9219493 (A) – s β -(1 $\rightarrow$ 5) akceptorom, (B) – s β -(1 $\rightarrow$ 6) akceptorom, (C) – bez akceptora

Ligand pomenovaný ako 9260193 mal najlepšie (najnižšie) skóre v aktívnom mieste bez akceptora (-8,132). Ligand, ktorý bol dokovaný do miesta s akceptorom β -(1 $\rightarrow$ 6) mal skóre -6,571. O niečo horšie skóre mal ligand dokovaný s β -(1 $\rightarrow$ 5) akceptorom (-5,091). Pri

porovnaní interakčných diagramov (Obr.3) môžeme vidieť, že sa ligandy niektorými interakciami líšia, avšak vo všetkých troch prípadoch dochádzalo k interakciám s katalytickou bázou a aj Mg^{2+} . Ligand s β -(1→5) akceptorom mal silnú interakciu s Asp372 a taktiež aj s Lys369, ale Asp256, 257 a 371 už mali iba slabé interakcie, tak ako aj ďalšie aminokyseliny v okolí (Obr.3A). Pri ligande s β -(1→6) akceptorom mal vodíkovú väzbu iba Pro167, Lys369 a His396 interagovali prostredníctvom pi-pi „stacking“ a pi-katión väzby. Asp256, 257 a 372 mali iba slabé interakcie (Obr.3B). Koordinačnou väzbou interagoval Mg^{2+} v prípade ligandu bez akceptora s oboma ketónovými kyslíkmi, Arg171 a Lys369 vytvárali pi-katión väzbu a Asp371 vodíkovú väzbu. Ďalšie aminokyseliny a aspartáty 256, 257, 258 a 372 mali len slabé interakcie (Obr.3C). Vzhľadom na svoju veľkosť, tvar a aj polohu, v ktorej bol ligand umiestnený vo väzobnom mieste enzýmu je možné predpokladať jeho schopnosť inhibovať priebeh reakcie.



Obr. 3. Interakčné diagramy zobrazujúce aminokyselinové reziduá interagujúce s ligandom 9260193 (A) – s β -(1→5) akceptorom, (B) – s β -(1→6) akceptorom, (C) – bez akceptora

Záver

Z výsledkov získaných molekulovým dokovaním je možné považovať za najperspektívnejší ligand 9219493, ktorý mal najlepšie skóre v modeli s β -(1→6) (-7,844)

a taktiež aj s β -(1 $\rightarrow$ 5) (-5,761) akceptorom. V oboch modeloch ligand spĺňal podmienky interakcie s katalytickým Asp372 a iónom Mg^{2+} .

PodĎakovanie

Autori ďakujú Dr. Seanovi Ekinsovi za poskytnutie 31 vybraných molekúl z preskríningu Chembridge databázy a prof. Kataríne Mikušovej za početné diskusie. Táto práca bola podporená Slovenskou vedeckou grantovou agentúrou (VEGA 2/0137/20) a Slovenskou agentúrou pre vývoj a výskum (APVV-20-0230).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Konyariková Z., Savková K., Kozmon S., et al. (2020), *Antibiotics* 9(1), p. 20
- [2] Janoš P., Tvaroška I., Dellago C., et al. (2020), *ACS Omega*, 5(34), p. 21374
- [3] Schrödinger Release 2022-3: LigPrep, “Schrödinger Release 2022-3: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021”
- [4] Schrödinger Release 2022-4: Jaguar, “Schrödinger Release 2022-4: Jaguar, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021”
- [5] Schrödinger Release 2022-3: Glide, “Schrödinger Release 2022-3: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021”

Fosfatidylglycerol znižuje expresiu génu pre interleukín 8 v bunkách A549

Ivana Ďurišová, Majlinda Meta, Mária Balážová

*Centrum biovied Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Ústav biochémie a genetiky živočíchov,
Oddelenie biochémie membrán, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovenská republika;
durisova.ivana2@gmail.com*

Abstract

Phosphatidylglycerol decreases interleukin 8 gene expression in A549 cells

The pulmonary surfactant participates in gas exchange by reducing surface tension during inspiration and preventing alveolar collapse during expiration. In addition to its mechanical function, it also plays a role in the lungs in suppressing an inadequate pro-inflammatory response, which causes many physiological failures. Part of this immune response is the phospholipid phosphatidylglycerol, which is able to modulate the function of macrophages and can antagonize the activation of the Toll-like receptor and prevent inflammatory processes that lead to a decrease in gas exchange in the alveolar compartment. We aim to increase PG (phosphatidylglycerol) production in surfactant-secreting cells using valproic acid, which affects phospholipid biosynthesis. Targeted increased PG production in surfactants could effectively prevent an uncontrolled immune response in patients.

Keywords: *phosphatidylglycerol; surfactant; cytokines; valproic acid; immunity reaction*

Úvod a formulácia cieľa

Fosfatidylglycerol (PG) je aniónový fosfolipid nachádzajúci sa najmä v pľúcnom surfaktante. Vytvárajú ho alveolárne bunky typu II a dokáže regulovať procesy vrodenej imunity [1]. Počas bakteriálnej infekcie kompetitívne súperí s LPS (endotoxín na vonkajšej membráne gramnegatívnych baktérií) o väzbové miesto na receptore TLR4, čím narúša LPS-závislú aktiváciu tohto receptorového komplexu zohrávajúceho ústrednú úlohu v odpovedi buniek na patogény. Naviazaním sa na TLR4 blokuje MAP-kinázovú signálnu kaskádu a inhibuje následnú produkciu a sekréciu cytokínov ako je TNF α (*tumor necrosis factor α*) alebo IL-8 (*interleukín 8*), čím potláča zápalovú reakciu [2].

Potlačenie imunitnej reakcie má perspektívu pre pacientov so syndrómom akútnej respiračnej tiesne (ARDS), spôsobený prehnanou imunitnou odpoveďou, ktorá je najbežnejšou príčinou smrti u pacientov s ochorením COVID-19. Vysoké hladiny cytokínov majú za následok cytokínovú búrku, ktorá vedie k zvýšenému riziku vaskulárnej hyperpermeability, multiorgánového zlyhania a nakoniec smrti. Z tohto dôvodu je potlačenie imunitnej odpovede u týchto pacientov esenciálne [3].

Zvýšenie množstva PG v pľúcnom surfaktante by pomohlo predchádzať neadekvátnej imunitnej odpovedi buniek. Jednou z možností podávania a navýšenia PG je implementácia surfaktantu priamo do alveolárneho priestoru pacientov [4]. Tento proces je však náročný na

realizáciu. Naším cieľom je pokúsiť sa zvýšiť vnútrobunkovú hladinu PG ovplyvnením jeho biosyntetickej dráhy. Potenciálnym spôsobom vedúcim k zvýšeniu hladiny PG sa zdá byť použitie liečiva VPA (kyselina valproová). V kvasinkách VPA indukovala pokles vnútrobunkového inozitolu, čo viedlo k defosforylácii a aktivácii PGP (fosfatidylglycerofosfát) syntázy a k akumulácii PG v bunkách [5]. Vplyv VPA na biosyntetickú dráhu PG v ľudských bunkových líniiach však zatiaľ nebol preskúmaný.

Naším prvotným cieľom je pomocou VPA indukovať vnútrobunkovú syntézu PG v pľúcnych bunkách modelovej nádorovej línie A549, ktoré produkujú surfaktant. Syntézu PG budeme sledovať pomocou *in vitro* aktivity PGP syntázy (PGS1). Navyše sa zameriame na zmenu hladiny PG v týchto bunkách po ovplyvnení s VPA prostredníctvom stanovenia množstva fosfátu vo fosfolipidoch. Ďalším cieľom bude stanoviť mieru zápalu v bunkách A549 a v imunitných bunkách U937 (alveolárne makrofágy) po ovplyvnení s LPS. Mieru zápalu stanovíme relatívnou expresiou vybraných cytokínov, ktoré sú produkované pri zápale. Následne využijeme exogénne podávaný PG na utlmenie vyvolaného zápalu.

Materiál a metódy

Bunkové línie a podmienky kultivácie

Ľudské nádorové línie buniek A549 a U937 rástli v kultivačnom médiu DMEM s prídavkom 10 % *Fetal bovine serum* a 100 U streptomycín/penicilín. Bunky boli kultivované v inkubátore pri 37 °C a 5 % CO₂ a pasážované každý druhý až štvrtý deň.

Stanovenie *in vitro* aktivity enzýmu PGS1

Na stanovenie *in vitro* aktivity PGS1 v ľudskej bunkovej línii A549 sme použili homogenát buniek ovplyvnených s VPA. K homogenátu buniek sme pridali substráty CDP-DAG a rádioaktívne značený [¹⁴C] glycerol-3-fosfát. Po inkubácii za zvolených podmienok sme reakciu zastavili pridaním zmesi chloroform:metanol:HCl (100 : 100 : 0,6) a H₂O. Vzniknuté rádioaktívne značené produkty nie sú rozpustné vo vode. Vodnú fázu sme oddelili od organickej centrifugáciou a spodnú organickú fázu sme odobrali do scintilačnej skúmavky. Po odparení sme pridali scintilačné činidlo a rádioaktívny signál sme zmerali pomocou scintilačného počítaču (Perkin). Z množstva rádioaktívneho produktu sme vypočítali *in vitro* aktivitu enzýmu PGS1.

Stanovenie množstva fosforu vo fosfolipidoch

Relatívne zastúpenie fosfolipidov v bunkách A549 po ošetrovaní s VPA sme určili prostredníctvom kvantifikovania množstva fosforu vo vzorke. Z buniek sme vyextrahovali fosfolipidy pomocou zmesi organických rozpúšťadiel chloroform:metanol (6 : 3). Pridaním

vodnej fázy sme oddelili fosfolipidy, ktoré zostanú v organickej fáze, od ostatných menej hydrofóbných molekúl v bunke. Fosfolipidy v organickej fáze sme zakoncentrovali pod prúdom dusíka a následne sme ich separovali tenkovrstvovou chromatografiou (TLC). Oddelené fosfolipidy sme vizualizovali na platni v parách jódu, ktoré sa reverzibilne zabudujú do dvojítych väzieb fosfolipidov. Silikagél s jednotlivými fosfolipidmi sme vyškrabali, vysušili a povarili v pieskovom kúpeli pri teplote 200 °C, 30 min, v zmesi H₂SO₄ : HClO₄ (9 : 1). Pridali sme zmes ANSA a molybdátu a vzorky sme inkubovali 30 min pri 105 °C. Spektrometrom sme zmerali OD₈₃₀ (optická hustota pri 830 nm) pre jednotlivé vzorky. Množstvo fosforu v jednotlivých vzorkách sme stanovili na základe kalibračnej krivky zostrojenej z rôznych koncentrácií K₂HPO₄.

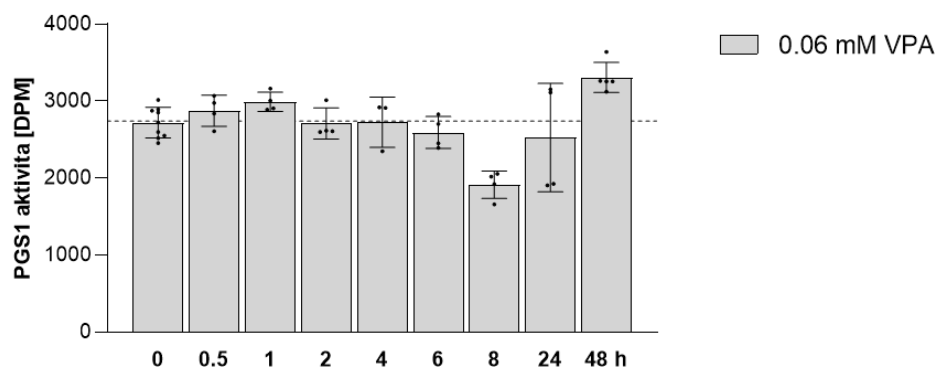
Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia (qPCR)

Po vyvolaní zápalu resp. po tlmení zápalu v bunkách sme merali relatívne množstvo mRNA pre cytokíny, ktoré určujú mieru zápalovej reakcie. Z buniek sme vyizolovali mRNA (*GeneJET RNA Purification Kit* (Thermo Fisher)) a prepísali ju do stabilnejšej cDNA (*LunaScript® RT SuperMix Kit* (BioLabs))), ktorú sme využili ako templát v qPCR. Pri práci s komerčnými súpravami sme postupovali podľa pokynov výrobcu. Princípom je opakované cyklovanie amplifikačného procesu, ktoré vedie k exponenciálnej expanzii počtu kópií cieľovej oblasti. Tá je sledovaná buď pomocou interkalačného farbiva alebo sekvenčne-špecifickej sondy, ktorej fluorescencia sa potom deteguje v zariadení qPCR a vynesie sa do výstupného grafu.

Výsledky a diskusia

Stanovenie *in vitro* aktivity enzýmu PGS1

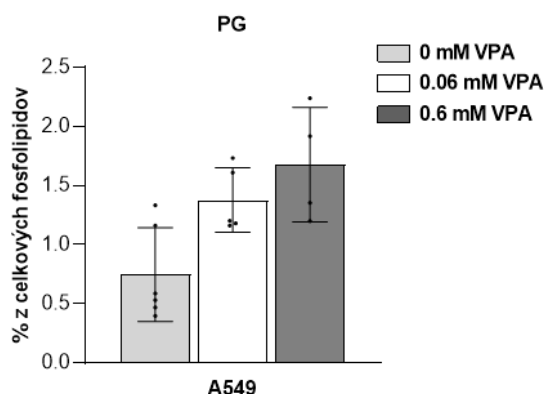
Aktivitu PGS1 sme sledovali ako množstvo rádioaktívneho ¹⁴C inkorporovaného do fosfolipidov. V prvých šiestich hodinách po ovplyvnení s VPA sa aktivita výrazne nelíšila od neovplyvnenej vzorky. V ôsmich hodinách sa znížila a následne sa začala zvyšovať. Po 48 hodinách vykazoval enzým PGS1 najvyššiu aktivitu spomedzi meraných časov (Obr. 1). Tieto dáta naznačujú, že až po dvoch dňoch od stimulácie buniek s VPA sa zvýši aktivita PGS1, ktorá potenciálne zvýši aj množstvo PG v bunkách.



Obr. 1. *In vitro* aktivita PGS1 v bunkách A549 po stimulácii s VPA v čase. Aktivita v čase 0 bola nastavená ako 1. Dáta predstavujú priemerné hodnoty minimálne troch nezávislých experimentov $\pm$ SD.

Stanovenie množstva fosforu vo fosfolipidoch po ovplyvnení s VPA

S cieľom sledovať zmenu v hladine PG v bunkách A549 po ovplyvnení s VPA na 48 hodín, sme v bunkách stanovili množstvo fosforu. So zvyšujúcou sa koncentráciou VPA narastá aj množstvo fosforu, ktoré zodpovedá množstvu PG v bunkách (Obr. 2). PG sa v bunkových štruktúrach nachádza len v stopových množstvách, avšak v pľúcnom surfaktante tvorí 8-15 % [6]. Ten je generovaný alveolárnymi bunkami typu II (A549), preto predpokladáme, že zvýšené množstvo PG po stimulácii buniek s VPA sa týka najmä množstva PG v surfaktante.

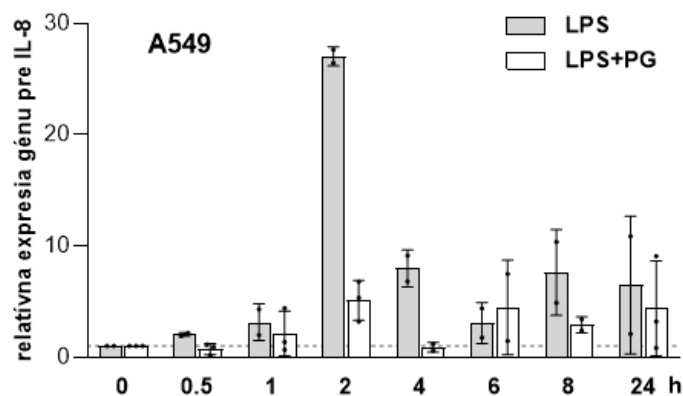


Obr. 2. Množstvo fosforu v bunkách A549 ovplyvnených s VPA. Bunky A549 boli 48 hodín kultivované s rôznymi koncentraciami VPA. Dáta predstavujú priemerné hodnoty minimálne 4 nezávislých experimentov $\pm$ SD

Sledovanie relatívnej mieri zápalu pomocou qPCR

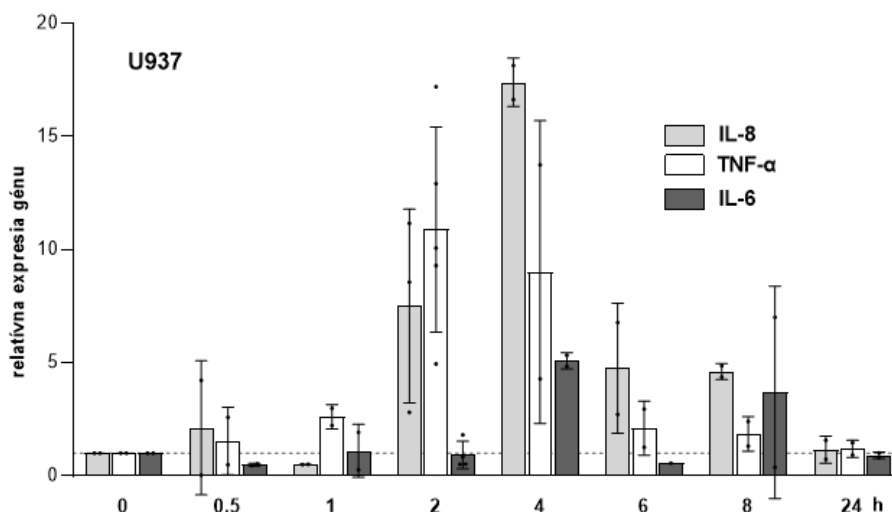
Hoci bunky A549 predstavujú epiteliárne pľúcne bunky, ktorých hlavná úloha je tvorba a vylučovanie surfaktantu, na svojom povrchu majú receptory pre LPS [2]. Preto sme sledovali relatívnu mieru zápalu v týchto bunkách v čase prostredníctvom exprese génu pre cytokín IL-

8. Najvyššiu expresiu sme pozorovali po dvoch hodinách kultivácie s LPS. V rovnakých časových intervaloch sme bunky ovplyvňovali aj s kombináciou LPS a PG. Na základe výsledkov sme pozorovali, že pridanie LPS spolu s PG významne ovplyvnilo expresiu génu *IL-8*, čo naznačuje jeho protizápalovú úlohu aj v bunkách A549 [1] (Obr. 3).



Obr. 3. Relatívna expresia génu pre *IL-8* po stimulácii s LPS a LPS + PG. Expresia v čase 0 bola nastavená ako 1. Dáta predstavujú priemerné hodnoty minimálne troch nezávislých experimentov $\pm$ SD.

Bunky U937 predstavujú alveolárne makrofágy, imunitné bunky. Rovnako ako A549 sme ich ovplyvnili s LPS v čase. Najvyššia odpoveď cytokínov *IL-8* a *IL-6* prišla po 4 hodinách a cytokínu *TNF α* po dvoch hodinách stimulácie (Obr. 4). V ďalších experimentoch sa zameriame na tlmenie vyvolaného zápalu pomocou PG.



Obr. 4. Relatívna expresia génov pre vybrané cytokíny po stimulácii s LPS. Expresia v čase 0 bola nastavená ako 1. Dáta predstavujú priemerné hodnoty minimálne troch nezávislých experimentov $\pm$ SD.

Záver

Pomocou kyseliny valproovej sme zvýšili množstvo PG v bunkách A549. Navyše sme v nich dokázali vyvolať zápal pomocou LPS. Pridaním exogénneho PG sme zápal utlmili. V ďalších experimentoch sa budeme venovať tlmeniu zápalu v imunitných bunkách U937.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla s podporou VEGA 2/0030/22, VEGA 2/0042/21 a APVV-20-0129.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Kuronuma K., Mitsuzawa H., Takeda K., et al. (2009) J. Biol. Chem. 284(38), p. 25488
- [2] Voelker D. R., Numata M. (2019) J. Biol. Chem. 294(12), p. 4282
- [3] Parasher A. (2021) Clinical presentation and Treatment. Postgrad. Med. J. 97(1147), p. 312
- [4] Mirastschijsk U., Dembinski R., Maedler K. (2020) Front. Med. 7, p. 254
- [5] Shaltiel G., Shamir A., Shapiro J., et al. (2004) Biol. Psychiatry 56(11), p. 868
- [6] Wright J. R., Clements J. A. (1987) The American review of respiratory disease 136(2), p. 426

X-ray Characterization of new 1D Chain-Like Metalloporphyrin Metal-Organic Framework

Arash Ebrahimi¹, Lukáš Krivosudský²

¹*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Inorganic Chemistry, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak republic; ebrahimi4@uniba.sk*

²*Comenius University in Bratislava, Faculty of Pharmacy, Department of Chemical Theory of Drugs, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovak republic*

Abstract

Metalloporphyrins, due to their abundance in nature, have been explored during the last decades. Supramolecular materials constructed from self-assembly of metalloporphyrins are archetype instances of the exceptionally efficacious nano enzymes having potential applications in photosynthesis, oxygen transport, electron transfer and catalysis. Thus, porphyrins are excellent catalysts to be utilized highly efficiently in plethora catalytic reactions. Over the recent years, a great deal of effort has been allocated to the synthesis of individual types of these catalysts as structural units in MOFs (metal-organic frameworks). We have thus fabricated 1-dimensional metalloporphyrin-based MOF. They were then characterized by X-ray diffraction crystallography.

Keywords: Metalloporphyrin MOFs; Metal-Organic Frameworks; X-ray diffraction

Introduction and Objectives

The recently emerged porous materials, metal-organic frameworks (MOFs) - typically formed from metal ions/clusters bridged by multidentate ligands in an extended framework - have provided solutions to tackle challenges in areas such as catalysis [1], gas storage/separation [2], biomimetic applications [3], drug delivery [4], electrochemical applications [5] and biomedical chemistry [6]. Moreover, the structures can be tuned by replacing or incorporating specific linkers or suitable unsaturated metal ions, in addition to adjusting the pore size and/or geometry which substantially influence their catalytic behaviors toward many substances participating in the reaction [7]. Amongst the main categories of MOFs, porphyrin-based MOFs have demonstrated themselves as a tangible material able to provide the properties of both MOFs and metalloporphyrin complexes in one scaffold [8]. Despite being synthesized less frequently than other types of MOFs and less often explored in research, they have had considerable impact on multiple fields, particularly biomimetic and biomedical ones as catalysts, owing to their resemblance to some molecules discovered in nature [9,10].

Materials and methods

Meso-tetra(4-methoxyphenyl) porphyrin (TMPP) (0.073 g, 0.1 mmol), NH₄VO₃

(0.0468 g, 0.4 mmol), Mn (OAc)₃·2H₂O (0.027 g, 0.1 mmol) and 0.4 ml of 2 M HCl in 10 ml of water and 10 ml DMF was poured in situ in 50 mL Teflon-lined vessel and kept for 3 days at 160°C. In the case of remaining all the fabrication conditions except not adding NH₄VO₃ and HCl, the structure is identical. After cooling to room temperature, the violet crystals were collected and characterized by X-ray crystallography.

Results and discussion

Crystal Structures

Crystal structure of [Mn(ac) (TMPP)]_n consist of 1D polymer where MnTMPP units are axially coordinated to acetate along the a direction. From the structure of the porphyrinic MOF illustrated below, It can be deduced the Mn (III) ions are located at the top of the plane of the porphyrin adopting square pyramidal geometry which position somehow toward the center in which the acetate anions bridges the two [Mn(TMPP)]⁺ and also neutralizes both cations. Therefore, it provides 1D coordination polymer arranging like chain architectures.

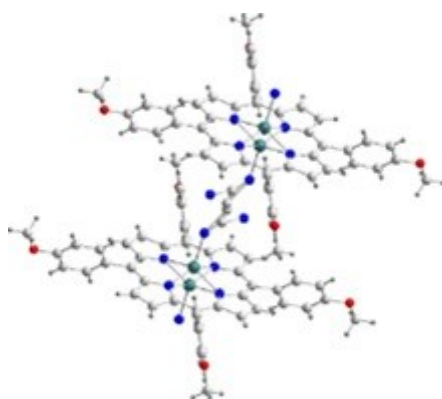


Fig. 1. Structural representation of as-synthesized [Mn(ac) (TMPP)]_n

Conclusion

Principally, the remarkable tunability, considerable porosity, biocompatibility, high surface areas and biodegradability of MOFs render them as a novel applicable material in many areas of chemistry. At the same time, porphyrin-based metal-organic frameworks integration can modify the possible instability and self-oxidation (quenching) deriving from free porphyrins in physiological environments as well as improve the physiochemical traits by incorporating the peripheral functionalities or multiple metal ions either on porphyrins or MOFs in a single architecture. The 1-dimensional coordination polymer synthesized and characterized by X-ray successfully has shown that TMPP porphyrin produce 1D polymers

with Mn (III). Stabilization of the network for Mn-TMPP compound takes place through crystallization of metalloporphyrins and molecules of porphyrin, via an extended π -bond system.

Acknowledgement

Honorably, we should express our supreme gratitude for the financial support of this work from department of Inorganic Chemistry at Comenius University in Bratislava.

References

- [1] Fernandez-Bartolome E., Santos J., Khodabakhshi S., et al. (2018) Chem. Commun. 54(36), p. 5526
- [2] Zaamani S., Abbasi A., Masteri-Farahani M., et al. (2022) New J. Chem. 46(20), p. 654
- [3] Zhang K., Goswami, S., Noh A., et al. (2022) J. Photochem. Photobiol. 10(7), p. 100111
- [4] Gutov O. V., Bury W., Gomez-Gualdron B. (2014) Chem. Eur. J. 20(4), p. 12389
- [5] Casas-Solvas J. M., Vargas-Berenguel A. (2022) Nanomaterials. 12(6), p. 507
- [6] Wu Z., Hou L., Li W., et al. (2022) J. Colloid Interface Sci. 610(15), p. 136
- [7] Liu G., Cui H., Wang S., et al. (2020) J. Mater. Chem. A. 8(5), p. 8376
- [8] Min H., Wang J., Qi Y., et al. (2019) Adv. Mater. 31(15), p. 1808200
- [9] Gharehdaghi Z., Rahimi R., Naghib S. M., et al. (2022) J. Iran. Chem. Soc. 19(2), p. 2227
- [10] Ebrahimi A., Krivosudský L. (2022) Molecules. 27(15), p. 4917

Vývoj novej analytickej metódy na analýzu triacylglyceridov používaných pri falšovaní éterických olejov pomocou GC-FID

Michal Fulín¹, Richard Gruchaľák¹, Jaroslav Blaško¹, Ľubomíra Duháčková¹, Janka Kubincová², Marcela Blažková³

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; fulin1@uniba.sk

²Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava, Slovenská republika

³Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Výskumný ústav potravinársky, Oddelenie technologických inovácií a spolupráce s praxou, Kostolná 7, Modra, Slovenská republika

Abstract

Development of a new analytical method for the analysis of triacylglycerides used in the adulteration of essential oils by GC-FID

Essential oils are extracts from various plant materials and are widely used in the food industry, cosmetics, and pharmaceuticals. From a chemical perspective, they are mixtures of different hydrocarbons, aldehydes, ketones and alcohols. Their price varies depending on the origin of the plant material and the method of essential oil extracting, which is why there are increasing cases of counterfeit extracts. The work is focused on developing a new gas chromatographic method which will enable the determination of triglycerides as undesirable additives in essential oils.

Keywords: essential oils; triglycerides; gas chromatography

Úvod a formulácia cieľa

Esenciálne oleje sú prírodné materiály široko používané v mnohých oblastiach po celom svete a stali sa neoddeliteľnou súčasťou každodenného života. Zvyšovanie dopytu po esenciálnych olejoch má za následok narastajúci počet prípadov falšovania. Autenticita takýchto produktov je teda záležitosťou kritického významu pre spotrebiteľov [1].

Výroba týchto olejov je výrazne závislá od dostupnosti rastlinných materiálov a od nasledovného spracovania. Niektoré éterické oleje sa vyrábajú vo veľkom rozsahu (niekoľko tisíc ton ročne), ako príklad možno uviesť mäťový alebo citrónový olej. Ďalšie oleje sa produkujú v oveľa menšej miere kvôli ich vzácnosti, čo sa výrazne odráža aj na cene napr. ružový olej 6 000-10 000 €/kg alebo kosatec 6 200-100 000 €/kg.

Na základe vyššie spomenutých faktov sa čoraz viac objavujú nové spôsoby falšovania a pančovania týchto prírodných produktov. Falšovanie esenciálnych olejov sa najčastejšie robí nasledujúcimi spôsobmi: pridaním lacnejšieho syntetického materiálu; pridaním lacných prechavých látok z iného prírodného zdroja, ktorý je cenovo dostupný [2]; alebo riedením esenciálneho oleja rastlinnými olejmi bez výraznejšej arómy na zvýšenie hmotnosti.

Falšovanie môže zahŕňať aj čiastočnú alebo úplnú náhradu časti pôvodných zložiek inými substanciami [3] alebo pridaním neprchavých komponentov. Všetky tieto spôsoby falšovania môžu zhoršiť kvalitu a pridanie jednej alebo viacerých syntetických zlúčenín môže viesť k výrazným problémom s bezpečnosťou používania prírodného produktu v kozmetike alebo potravinárstve.

V súčasnosti existuje veľké množstvo analytických metód na overenie autenticity esenciálnych olejov. Uplatňujú sa tu spektroskopické analýzy a chromatografické metódy (predovšetkým GC-MS alebo GC-FID) [4].

Cieľom našej práce je vývoj novej analytickej metódy na odhalenie rastlinných olejov ako prídavkov do éterických olejov. Rastlinné oleje nevynikajú výraznou arómou, veľmi dobre sa miešajú s éterickými olejmi a majú podstatne nižšiu cenu. Snahou bolo nájsť také plynovo-chromatografické podmienky na základe, ktorých odseparujeme zložky éterických olejov a triacylglyceroly (TAG) obsiahnuté v rastlinných olejov. Na základe získaného profilu TAG, ich retenčných charakteristík, môžeme následne zistiť či vzorky esenciálnych olejov obsahujú tieto pridané pančovadlá.

Materiál a metódy

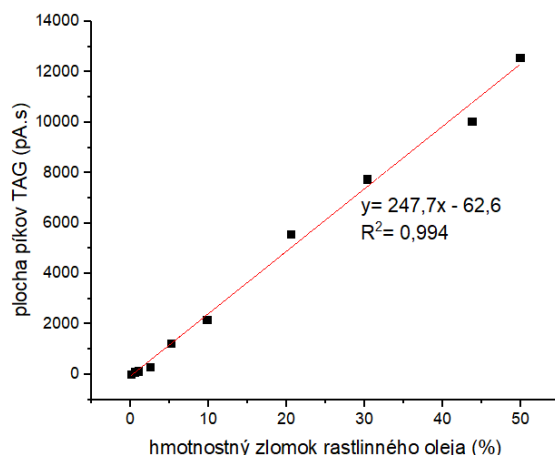
Na plynovo-chromatografickú separáciu sa použil plynový chromatograf Agilent Technologies 6890N s plameňovo-ionizačným detektorom (FID) a na separáciu sa použila kapilárna kolóna CP Sil 5CB s vnútorným priemerom 0,32 mm s dĺžkou 25 m a s hrúbkou filmu stacionárnej fázy 0,25 μm . Nosným plynom bol vodík s konštantným prietokom 2 ml/min. Dávkovaný objem bol 1 μl , teplota split/splitless dávkovača 350 °C s módom dávkovania splitless, teplota FID detektora 350 °C a teplotný program separácie od 60 °C so stúpaním 15 °C/min do teploty 380 °C držanej 10 min. Celková dĺžka analýzy bola 33 minút.

Na prípravu kalibračných roztokov sme použili pomarančový esenciálny olej s rôznymi prídavkami repkového oleja ako zdroja bežných triacylglycerolov. Vyvinutú metódu sme otestovali na 7 vzorkách esenciálnych olejov.

Výsledky a diskusia

Prvým krokom bol výber vhodných chromatografických podmienok. Chromatografické podmienky sme testovali na modelovej zmesi pomarančovej silice s 5 % prídavkom repkového oleja. Pri výbere podmienok boli dva kľúčové faktory a to chromatografické rozlíšenie závisle predovšetkým na dĺžke chromatografickej kolóny a mód dávkovania.

Druhým krokom bolo zostavenie kalibračnej priamky v dostatočne širokom koncentračnom rozsahu TGA. Ako štandardy sme zvolili pomarančovú silicu a repkový rastlinný olej. Pripravili sme sériu zásobných roztokov s percentuálnym obsahom rastlinného oleja od 0,05 % do 50 %. Následne sme zo zásobných roztokov pripravili 1 % roztoky do chloroformu. Kalibračná krivka zobrazená na obrázku 1 bola zostrojená ako závislosť sumy plôch jednotlivých TAG od hmotnostného percenta v kalibračných roztokoch.



Obr. 1. Závislosť sumy plôch píkov prislúchajúcich triacylglyceridom od hmotnostného percenta oleja v jednotlivých kalibračných roztokoch

Najnižšia možná koncentrácia triacylglyceridov, ktorú možno ešte spoľahlivo stanoviť danou chromatografickou metódou je 0,1%. Nižšie merané koncentrácie TAG sa nachádzali na úrovni šumu. Vzorky boli pripravené ako 1% roztoky do chloroformu a dávkové do plynového chromatografu za vyššie uvedených chromatografických podmienok.

Presnosť nami zvolenej analytickej metódy bola vyjadrená ako opakovateľnosť, pričom jednotlivé kalibračné body boli analyzované 3 krát. Spriemerované hodnoty, smerodajné odchýlky a relatívne smerodajné odchýlky sú zhrnuté v tabuľke 1.

Tab. 1. Chromatografické parametre jednotlivých analyzovaných triacylglyceridov (TAG) v troch kalibračných úrovniach a štatistické vyhodnotenie opakovateľnosti stanovenia. 16.16.18 – triacylglycerid obsahujúci masné kyseliny s počtom uhlíkov 16, 16, 18; 18.18.16 – triacylglycerid s obsahom masných kyselín s počtom uhlíkov 18, 18, 16; 18.18.18 – triacylglycerid s obsahom masných kyselín s počtom uhlíkov 18, 18, 18; 18.18.20 – triacylglycerid s obsahom masných kyselín s počtom uhlíkov 18, 18, 20. SD-smerodajná odchýlka. RSD – relatívna smerodajná odchýlka

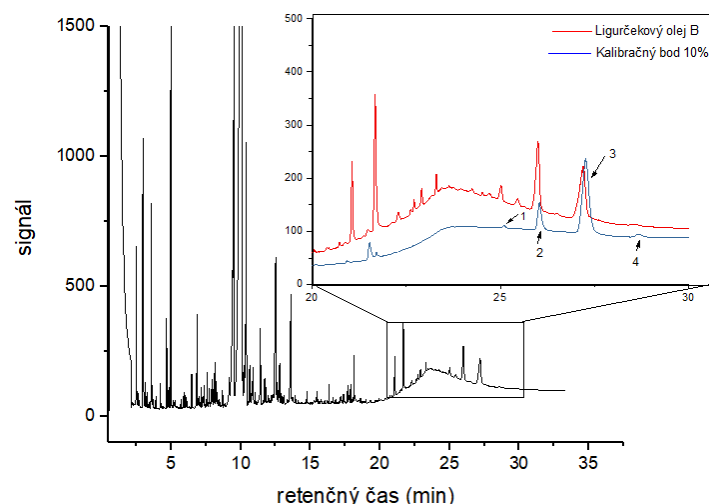
TAG	Ret.čas (min)	1. Meranie	2. Meranie	3. Meranie	Priemer	SD	RSD
16.16.18 (50 %)	25,03	150,4	142,9	169	154,1	13,4	8,7
16.16.18 (5 %)	25,06	13,5	12,98	13,72	13,40	0,38	2,84
16.16.18 (0,5 %)	25,07	1,1	0,98	1,13	1,07	0,08	7,42
18.18.16 (50 %)	26,05	2627	2565	2567	2587	34,9	1,35
18.18.16 (5 %)	26,02	205,6	204,4	208,3	206,1	2,02	0,98
18.18.16 (0,5 %)	25,97	17	15,23	16,48	16,24	0,91	5,60
18.18.18 (50 %)	27,47	11964	11953	11964	11964	9,79	0,08
18.18.18 (5 %)	27,30	985,7	976,3	980,5	980,5	4,77	0,49
18.18.18 (0,5 %)	27,11	78,1	76,98	77,14	77,14	0,9	1,16
18.18.20 (50 %)	28,68	495,2	452,3	464,6	464,6	26,7	5,74
18.18.20 (5 %)	28,66	30,9	28,3	30,26	30,26	1,73	5,71
18.18.20 (0,5 %)	28,59	2,4	2,11	2,29	2,29	0,16	6,95

Vyvinutou metódou sme analyzovali 7 vzoriek esenciálnych olejov, ktorých stanovené celkové obsahy sú uvedené v tabuľke 2. Vo vzorkách esenciálnych olejov Fialka, Červený pomaranč, Kokos, Ruža a Borievkový olej nebola zistená prítomnosť rastlinného oleja. Sú to bežné esenciálne oleje používané do aróma-lámp, ich cena je relatívne nízka, zatiaľ čo v oboch vzorkách ligurčekového oleja, sme jednoznačne stanovili prítomnosť TAG pochádzajúcich z pridaného rastlinného oleja.

Tab. 2. Analyzované vzorky esenciálnych olejov. Obsah TAG (triacylglyceridy) vypočítaný z rovnice kalibračnej krivky.

Vzorka esenciálneho oleja	Obsah TAG (%)
Fialka	0
Červený pomaranč	0
Kokos	0
Ruža	0
Borievkový olej – Juniperus	0
Ligurčekový olej A	0,47
Ligurčekový olej B	8,59

Na obrázku 2 je znázornený chromatografický záznam separácie ligurčekového oleja, a porovnanie separácie TAG z modelového kalibračného roztoku 10 %.



Obr. 2 Chromatografický záznam vzorky Ligurčekový olej B kontaminovaný triacylglyceridmi pochádzajúcich z prídavku rastlinného oleja - 1 – TAG 16.16.18 – triacylglycerid obsahujúci masné kyseliny s počtom uhlíkov 16, 16, 18. 2 - TAG 18.18.16 – triacylglycerid s obsahom masných kyselín s počtom uhlíkov 18, 18, 16. 3 - TAG 18.18.18 – triacylglycerid s obsahom masných kyselín s počtom uhlíkov 18, 18, 18. 4 - TAG 18.18.20 – triacylglycerid s obsahom masných kyselín s počtom uhlíkov 18, 18, 20.

Vzorky esenciálnych olejov boli analyzované tri krát za rovnakých podmienok separácie. Následne sme výsledné hodnoty spriemerovali. Hmotnostné percento TAG sme vypočítali z rovnice kalibračnej krivky. Zastúpenie jednotlivých identifikovaných TAG vo vzorkách ligurčekových olejov sú uvedené v tabuľke 3.

Tab.3. Relatívne zastúpenie (v %) jednotlivých triglyceridov v analyzovaných vzorkách – TAG 16.16.18 – triglycerid obsahujúci masné kyseliny s počtom uhlíkov 16, 16, 18. TAG 18.18.16 – triglycerid s obsahom masných kyselín s počtom uhlíkov 18, 18, 16. TAG 18.18.18 – triglycerid s obsahom masných kyselín s počtom uhlíkov 18, 18, 18. TAG 18.18.20 – triglycerid s obsahom masných kyselín s počtom uhlíkov 18, 18, 20.

Vzorka	TAG 16.16.18	TAG 18.18.16	TAG 18.18.18	TAG 18.18.20
Ligurčekový olej A	4,9	47,4	47,7	0
Ligurčekový olej B	6,4	43,1	50,5	0

Záver

Analýzou modelových vzoriek pomarančovej silice s prídavkom repkového oleja a postupnou optimalizáciou chromatografických podmienok sa nám podarilo vytvoriť vhodná metóda na analýzu triacylglycerolov vo vzorkách esenciálneho oleja, na úrovni 0,1 % obsahu triacylglycerolov. Tieto látky tvoria charakteristický chromatografický profil pre rastlinné oleje a v súčasnosti sa používajú na falšovanie éterických olejov, ktorých cena sa pohybuje rádovo v tisíckach eur za kilogram. Prítomnosť týchto látok je možné odhaliť vysokoteplotnou plynovou chromatografiou a tým zistiť autenticitu éterického oleja.

PodĎakovanie

Tento príspevok vznikol s podporou Agentúry na podporu výskumu a vývoja projektov APVV-18-0282, APVV-20-0317, APVV-19-0471 a APVV-21-0323.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Dubnicka M., Cromwell B., Levine M. (2020) Curr. Anal. Chem. 16(8), p. 1
- [2] Koenig W.A., Hochmuth D.H. (2004) J. Chromatogr. Sci. 42(8), p. 423
- [3] Schipilliti L. et al. (2010) J. Sep. Sci. 33(4-5), p. 617
- [4] Salgueiro L., Martins A.P., Correia H. (2010) Flavour Fragr. J. 25(5), p. 253

Vývoj novej analytickej metódy na analýzu voľných mastných kyselín v syroch

Richard Gruchaľák¹, Michal Fulín¹, Jaroslav Blaško¹, Ľubomíra Duhačková¹, Janka Kubincová², Marek Kunštek³

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; gruchalak4@uniba.sk

²Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava, Slovenská republika

³Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Výskumný ústav potravinársky, Kostolná 1540/7, 900 01 Modra

Abstract

Development of a new analytical method for the analysis of free fatty acids in cheese

Aroma-active compounds contained in cheeses are dependent on the presence of carboxylic acids with varying chain lengths. The aim of the paper is to develop a fast derivatization pre-treatment step for the analysis of carboxylic acids with short and medium chain lengths using gas chromatography coupled with a mass spectrometry detector. The relative standard deviation of the peak areas of carboxylic acids was calculated by analyzing multiple samples and calculating the standard deviation divided by the mean. The concentration of carboxylic acids in cheese was determined by comparing the peak area of the sample to that of a standard. The effect of the addition of HMDS on the peak area of the carboxylic acids was investigated by analyzing samples with varying amounts of HMDS. The results of this study provide valuable information on the quantification and analysis of carboxylic acids in food products using GC-MS.

Keywords: GC-MS; free fatty acids; cheese; gas chromatography

Úvod a formulácia cieľa

Dôležitými alebo dokonca prevládajúcimi zložkami chuti mnohých druhov syrov sú mastné kyseliny. Počas zrenia syra môžu voľné mastné kyseliny obsahujúce štyri alebo viac atómov uhlíka pochádzať z lipolýzy mliečneho tuku alebo chemického rozkladu aminokyselín. Lipolýza môže byť spôsobená pôsobením pôvodných lipáz mlieka, v prípade syra vyrobeného zo surového mlieka, alebo pôsobením mikrobiálnych lipáz. Baktérie mliečneho kvasenia prítomné v štartovacích kultúrach sú spravidla len slabolipolytické. Väčšina mastných kyselín so 4 až 20 atómami uhlíka však pochádza z lipolýzy triglyceridov. Nižší podiel voľných mastných kyselín, ktoré majú vo všeobecnosti 2 až 6 atómov uhlíka, pochádza z degradácie laktózy a aminokyselín. Mastné kyseliny s dlhým reťazcom (>12 atómov uhlíka) vo všeobecnosti zohrávajú v chuti menšiu úlohu, vzhľadom na ich relatívne vysoké prahy vnímania. Mastné kyseliny s krátkym a stredne dlhým reťazcom a párnym číslom (C₄ – C₁₂) majú oveľa nižšie prahy vnímania a každá z nich má charakteristický vôňu [1].

Aj keď existujú iné chromatografické metódy na separáciu a kvantifikáciu FFA (z ang. – *free fatty acid*), najpopulárnejšia metóda analýzy zahŕňa GC-FID kvôli jej presnosti a spoľahlivosti a relatívne nízkej cene. Tento prístup funguje bez potreby derivatizácie, pretože FFA sa môžu odparovať vo vyhrievanom vstrekovacom porte. Existujú komerčne dostupné kolóny so špecifickými FFA fázami, ktoré dosahujú úplnú separáciu FFA s dĺžkou reťazca od C₂ do C₂₂. Môže sa použiť dávkovanie Split/Splitless, ale môže sa použiť aj dávkovanie za studena na kolóne, po ktorom nasleduje naprogramovaný teplotný gradient injektora, pretože to umožňuje zvýšenú separáciu FFA na základe ich prchavosti v injektore. FFA interagujú s fázami kolóny, čo môže viesť k ireverzibilnej adsorpcii. Použitie kyseliny mravčej buď v nosnom plyne alebo ako rozpúšťadla znižuje výskyt týchto problémov a umožňuje kvantitatívne stanovenie pomocou GC, ale kyslá povaha extraktu znižuje životnosť kolóny [2].

Na základe dostupných vedeckých štúdií sa na analýzu FFA používajú aj metódy HPLC alebo CE, avšak ako najúčinnnejšie sa javí metóda GC-FID [3].

V rámci predloženej práce sme testovali novú techniku izolácie, derivatizácie a separácie voľných mastných kyselín s využitím metódy in-situ silanizácie, za účelom odstrániť krok extrakcie, ktorý je bežný v doteraz používaných metódach analýzy.

Materiál a metódy

Štandardy voľných mastných kyselín a derivatizačné činidlo hexametyldisilazán boli zakúpené od firmy Sigma Aldrich. Vzorky kravských syrov a kravského masla boli zakúpené v rôznych predajniach v Bratislave. Použité rozpúšťadlá chloroform a acetonitril boli zakúpené od firmy Sigma Aldrich.

GC-MS analýzy sa uskutočňovali na 6890 GC s 7683 Series Autosampler a 5973 MS systémom od Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Chromatografické separácie sa uskutočňovali na kapilárnej kolóne DB-17 s rozmermi 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Teplota pece sa nastavila na 50 °C na 1 minútu a postupne sa zvyšovala na 300 °C rýchlosťou 15 °C min⁻¹. Teplota injektora bola nastavená na 280 °C. Vzorky s injekčným objemom 1 µl boli nadávkované v split režime so split pomerom 5:1, časom nastaveným na 1 min. Ako nosný plyn sa použilo hélium s konštantným prietokom 45 ml/min. Získavanie a spracovanie údajov sa uskutočňovalo pomocou softvéru MSD ChemStation (Agilent). V režime SIM bolo monitorovaných 5 iónov pre vybrané voľné mastné kyseliny (145 m/z pre kyselinu butánovú; 173 m/z pre kyselinu hexánovú; 201 m/z pre kyselinu oktánovú; 229 m/z pre kyselinu dekánovú; 257 m/z pre kyselinu dodekánovú) s dobou zotrvania 20 ms.

Výsledky a diskusia

Pripravený bol zásobný roztok mastných kyselín s uhlíkovým reťazcom C₄, C₆, C₈, C₁₀, C₁₂ v pomere 1:1:1:1:1. Následne bol tento roztok zriedený v chloroforme v pomere 1:10. Potom sa z tohto roztoku odobrali objemy 100, 10 a 2 µl a následne boli derivatizované pomocou silylácie. Takto upravené vzorky boli následne merané metódou GC/MS za účelom zistenia reprodukovateľnosti daného postupu.

Z pevných vzoriek syrov sa do liekoviek navážilo 100 mg. Príprava vzorky sa uskutočnila jednostupňovou silyláciou pridaním 300 µl ACN, 200 µl chloroformu, 1000 µl HMDS a 2 µl TFA do vzoriek. Zmes sa zahrievala (50 °C) v otvorenej liekovke a pretrepávala v termotrepačke pri 400 otáčkach za minútu počas 30 minút.

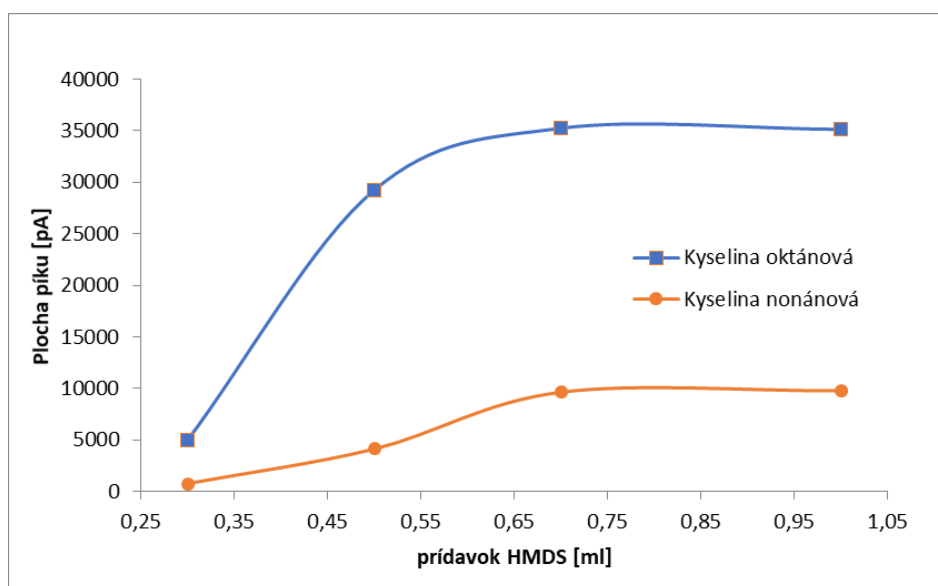
Tab. 1. Plochy pík, smerodajná odchýlka a relatívna smerodajná odchýlka

	Meranie 1 [pA.s ⁻¹]	Meranie 2 [pA.s ⁻¹]	Meranie 3 [pA.s ⁻¹]	Priemer [pA.s ⁻¹]	Smerodajná odchýlka [pA.s ⁻¹]	RSD [%]
Kyselina butánová	33925	33401	33150	33282	126	0,38
Kyselina hexánová	49014	49698	48513	48742	253	0,52
Kyselina oktánová	53187	53754	54005	53649	419	0,78
Kyselina dekánová	191426	192843	191233	191834	879	0,46
Kyselina dodekánová	242378	242396	241963	242246	245	0,1

V tabuľke 1 sú uvedené plochy pík jednotlivých mastných kyselín, smerodajná odchýlka a relatívna smerodajná odchýlka. Presnosť metódy bola hodnotená pomocou relatívnej smerodajnej odchýlky (RSD) z troch paralelných meraní. Relatívne smerodajné odchýlky (RSD) plochy pík pre jednotlivé mastné kyseliny uvedené v tabuľke 1 sa pohybovali od 0,1 % do 0,78 %. Z týchto hodnôt je zrejmé, že daná metóda poskytuje presné údaje z rozptylom výsledkom pod 1 %.

Na obrázku 1 je znázornená závislosť plochy pík kyseliny oktánovej a nonánovej od prídavku derivatizačného činidla hexametyldisilazánu. Sledovaním tejto závislosti sme aplikovali derivatizáciu in situ na 100 mg vzorky syru. Z grafu 1 môžeme usúdiť, že prídavky HMDS nad 0,7 ml do celkového objemu 1 ml nevykazovali zvyšovanie hodnoty plôch vybraných karboxylových kyselín. Zo vzorky syra sa do liekovky navážilo 100 mg. Príprava vzorky sa uskutočnila jednostupňovou silyláciou pridaním 300 µl ACN, 200 µl chloroformu, µl HMDS a 2 µl TFA do vzoriek. Zmes sa zahrievala (50 °C) v otvorenej liekovke a

pretrepávala v termotrepačke pri 400 otáčkach za minútu počas 30 minút. Následne sa vialky sцентрифуговали, supernatant sa preniesol do čistej vialky a analyzoval na GC/MS.



Obr. 1. Závislosť plochy pík kyseliny oktanovej a nonánovej od prídavku derivatizačného činidla hexametyldisilazánu

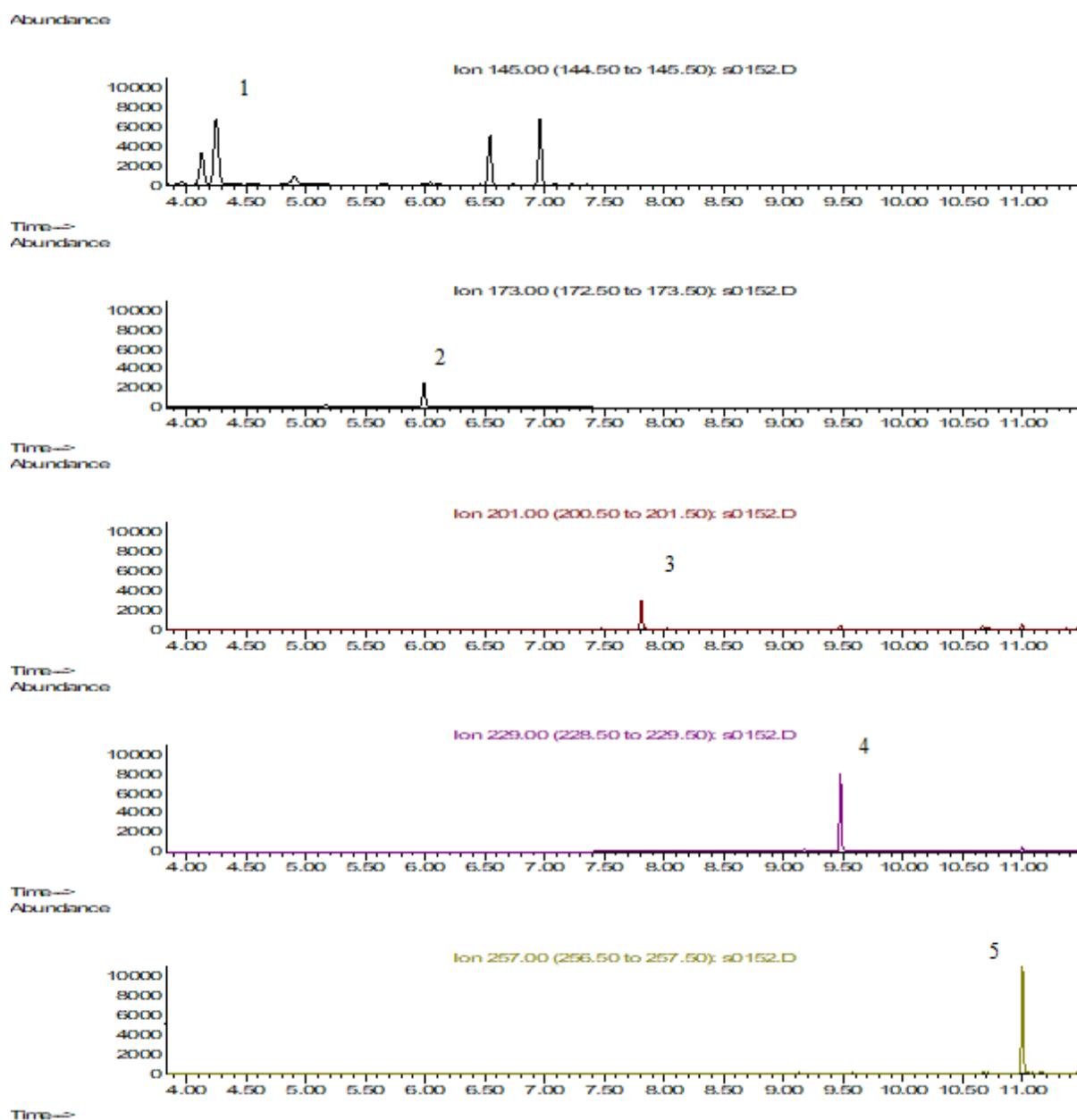
Z grafu 1 je zrejmé, že prídavok 0,7 ml je postačujúci na úplnú derivatizáciu prítomných mastných kyselín a premenu prítomnej vody na hexametyldisiloxán. Aby sme zabezpečili vysokú robustnosť metódy, v ďalšej práci sme používali 1 ml derivatizačného činidla HMDS, čím sme eliminovali vplyv prítomnosti vody na výsledok silylácie.

V tabuľke 2 sú uvedené koncentrácie pre jednotlivé mastné kyseliny namerané v zakúpených vzorkách syru. Koncentrácie boli vypočítané metódou externého štandardu.

Tab. 2. Zastúpenie vybraných karboxylových kyselín vo vzorkách syrov

	Kyselina butánová [mg/kg]	Kyselina hexánová [mg/kg]	Kyselina oktanová [mg/kg]	Kyselina dekánová [mg/kg]	Kyselina dodekánová [mg/kg]
Vzorka A	22,0	3,20	6,90	29,7	38,2
Vzorka B	16,7	1,80	2,60	8,9	16,2
Vzorka C	15,0	38,3	25,8	56,4	61,9
Vzorka D	135	10,1	26,4	53,1	56,1
Vzorka E	23,1	8,70	11,0	26,4	31,9
Vzorka F	36,1	35,3	26,7	70,7	74,6
Vzorka G	25,6	37,7	24,0	59,0	65,0

Na obrázku 2 je znázornený chromatografický záznam analýzy karboxylových kyselín pomocou GC/MS.



Obr. 2. Chromatografické záznamy pre vybrané ióny voľných mastných kyselín (1- kyselina butánová; 2- kyselina hexánová; 3- kyselina oktánová; 4- kyselina dekánová; 5- kyselina dodekánová)

Z obrázku 2 je zrejmé, že došlo k úplnej separácii jednotlivých voľných mastných kyselín navzájom. Je tiež zrejmé, že metóda má vysokú selektivitu na odlíšenie pozadia od signálu pre jednotlivé mastné kyseliny a taktiež dostatočnú citlivosť.

Celkovo bolo analyzovaných 7 rôznych vzoriek syrov novo vyvinutou metódou

GC-MS. Z tabuľky 2 je možné vidieť, že syry sa líšia obsahom voľných mastných kyselín, v niektorých prípadoch viac ako desaťnásobne. Najväčšie zastúpenie mala v priemere kyselina dodekánová, pričom najmenšie zastúpenie mala kyselina oktánová.

Záver

Vyvinuli sme vhodnú analytickú metódu na analýzu voľných karboxylových kyselín so stredne dlhým reťazcom obsiahnutých v mliečnych výrobkoch – syroch. Tieto látky sa podieľajú na charakteristickej aróme syrov. Derivatizácia prebehla jedнокrokovou silyláciou in situ bez akýchkoľvek predošlých úprav vzoriek syrov bez ohľadu na obsah vody, proteínov, prípadne sacharidov vo vzorke. Použitie takejto formy derivatizácie je vhodné v oblasti analýzy hlavných voľných mastných kyselín v ťažko definovaných matriciach ako sú syry. Prednosťou metódy je hlavne jednoduché spracovanie vzoriek, možnosť automatizácie a rýchly zber výsledkov. Najväčšie zastúpenie spomedzi analyzovaných karboxylových kyselín v nami meraných vzorkách mala kyselina dodekánová (laurová).

Podakovanie

Táto štúdia bola podporená z Operačného programu integrovanej infraštruktúry pre projekt Zvyšovanie kapacít a kompetencií univerzity vo výskume, vývoji a inováciách, ITMS2014+: 313021X329 a ITMS2014+: 313011AVA9 spolufinancovaný z Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Prácu podporila aj Agentúra na podporu výskumu a vývoja pod číslami zmlúv APVV-18-0282, APVV-20-0317, APVV-15-0466 a APVV-21-0323.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Ohtsuki T., Tada A., Tahara A. (2016) Applications of NMR Spectroscopy, Bentham Science Publishers, Sharjah, UAE, p. 222
- [2] Curioni P. M. G., Bosset J. O. (2002) International Dairy Journal, 12(12), p. 959
- [3] Pileire B., Beaune P., Laudat M. H. (1980) J. Chromatogr, 182(3-4), p. 269

Mechanizmus termickej izomerizácie fotochromných 3-fenylazaindolov

Lea Hegedúsová¹, Marek Cigán¹, Šimon Budzák²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;

hegedusova37@uniba.sk

²Univerzita Mateja Bela v Banskej Bystrici, Fakulta prírodných vied, Katedra chémie, Tajovského 40, 97401, Banská Bystrica, Slovenská republika

Abstract

Mechanism of back thermal isomerization of photochromic 3-phenylazaindoles

Azobenzenes belong to the most promising molecular photoswitches. Their back thermal isomerization can proceed via two competitive mechanism, inversion or rotation, depending on their structure and environment. The distinction between individual mechanisms is challenging for both theoretical calculation and experiment. In our contribution, we show experimental and theoretical study of mechanism of back thermal isomerization of four 3-phenylazaindoles with thermal half-lives at the level of milliseconds.

Keywords: phenylazaindoles; rotation; inversion; photoswitches

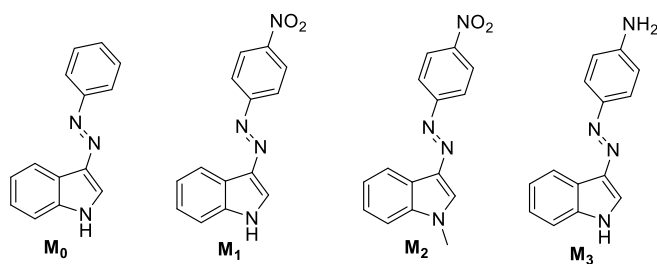
Úvod a formulácia cieľa

Azobenzény (AZBs) patria vďaka veľkej štruktúrálnej variabilite a možnosti cieleného ladenia ich fotochromných charakteristík medzi jedny z najatraktívnejších tried molekulových fotoprepínačov [1]. Výšku energetickej bariéry spätnej termickej $Z \rightarrow E$ izomerizácie možno efektívne modulovať štruktúrnou modifikáciou základného skeletu, čo umožňuje použitie AZBs v širokej škále „*hi-tech*“ aplikácii. AZBs dosahujúce polčasy spätných termických izomerizácií na úrovni nanosekúnd môžu nájsť svoje uplatnenie v medicínskych aplikáciách, napríklad pri obnove zraku, kedy je vyžadovaná rýchla odozva na vizuálny signál spolu s rýchlym obnovením pôvodného stavu receptora. Naopak, niektoré fotofarmakologické, či technologické aplikácie uprednostňujú prítomnosť bistabilných fotochromných molekúl, vykazujúcich prepínanie iniciované svetelným impulzom v oboch smeroch [2, 3].

Je známe, že spätné termické izomerizácie môžu u AZBs prebiehať prostredníctvom dvoch konkurenčných mechanizmov, inverziou a rotáciou. Inverzný mechanizmus je typický lineárnym usporiadaním väzieb $N=N-C$ v tranzitnom stave (TS_{inv}), zachovaním dvojitej $N=N$ väzby a súčasnou rehybridizáciou jedného z atómov dusíka z sp^2 na sp . Pri tranzitnom stave rotačného mechanizmu (TS_{rot}) nadobúda dihedrálny uhol $C-N=N-C$ hodnotu okolo 90° , dochádza k prerušeniu násobného charakteru $N=N$ väzby, ale hybridizácia atómov dusíka zostáva zachovaná [4].

Rozlíšiť jednotlivé mechanizmy je častokrát náročne ako experimentálne, tak aj použitím kvantovo-chemických výpočtov. Zatiaľ čo inverziu dobre opisujú *ab initio* metódy, z dôvodu degenerácie HOMO a LUMO orbitálov v TS_{rot} si štúdium rotačného mechanizmu štúdium vyžaduje multireferenčný prístup (MR). Pre chemicky relevantné, stredne veľké, molekuly sa zvyčajne kvôli vysokej výpočtovej náročnosti aplikujú metódy založené na teórii funkcionálu elektrónovej hustoty (DFT), pri ktorých však výber Kohn-Shamovho (KS) formalizmu (spinovo obmedzená/neobmedzená KS) môže zvýhodniť jeden z tranzitných stavov [5].

Cieľom práce bola príprava troch 3-fenylazaindolov M₁ – M₃ a štúdium mechanizmu ich spätnej termickej izomerizácie prostredníctvom dostupných experimentálnych a kvantovo-chemických výpočtových metód. Pre účely kvantovo-chemických výpočtov bola séria pripravených derivátov doplnená o východiskový nesubstituovaný 3-fenylazaindol M₀ opísaný v literatúre [6].



Obr. 1. Študované 3-fenylazaindoly M₀ – M₃

Materiál a metódy

Pri príprave študovaných zlúčenín boli použité komerčne dostupné chemikálie (Acros, Fluka, Fluorochem, Merck, SigmaAldrich, Merck). Priebeh reakcií bol sledovaný pomocou TLC (silikagél 60 F254, Merck) s vizualizáciou prostredníctvom UV detektora (254 nm). Na izoláciu derivátu M₂ z reakčnej zmesi bola použitá preparatívna TLC (Merck 2 mm PLC, silikagél 60 F254). NMR spektrá pripravených produktov boli namerané na prístroji *Varian VNMRs 600 spectrometer* s pracovnou frekvenciou 600 MHz pre ¹H a 151 MHz pre ¹³C alebo *Bruker Advance NEO spectrometer* s pracovnou frekvenciou 400 MHz pre ¹H a 100 MHz pre ¹³C v DMSO-*d*₆. Ako vnútorný štandard bol použitý tetrametylsilán (TMS). Absorpčné spektrá boli merané na spektrofotometri Evolution Array UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, USA). Ožarovanie vzoriek sa uskutočňovalo s použitím 470 nm svetelného zdroja LED (LIU470A 470 nm svetelného; Thorlabs). Absorpčné spektrá tranzientov boli merané na

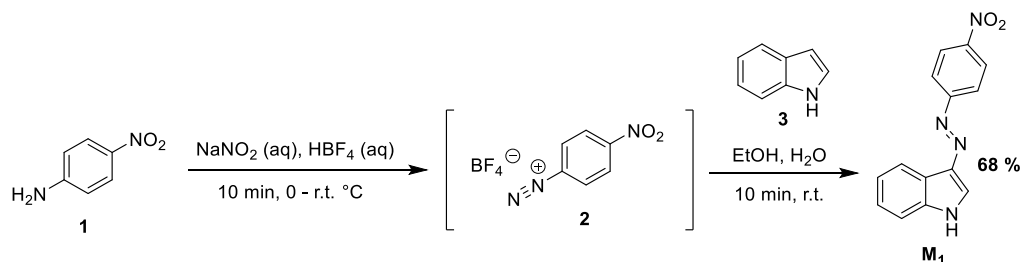
spektrometri LP980 Transient Absorption Spectrometer (Edinburgh Instruments; excitačný zdroj – Nd/YAG laser, $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$) použitím nanosekundovej zábleskovej fotolýzy. Spätne termické reakcie boli monitorované pomocou UV-Vis spektroskopie v štandardnom/ultraráchlom kinetickom režime alebo technikou nanosekundovej zábleskovej fotolýzy. Štúdium mechanizmu spätnej termickej izomerizácie bolo uskutočnené pomocou kvantovo-chemických výpočtov s použitím viacerých *ab initio* a DFT metód.

Výsledky a diskusia

Experimentálna časť práce je rozdelená na dve časti: syntetickú prípravu študovaných 3-fenylazaindolov a štúdium mechanizmu ich spätných termických izomerizácií prostredníctvom dostupných experimentálnych a kvantovo-chemických výpočtových metód.

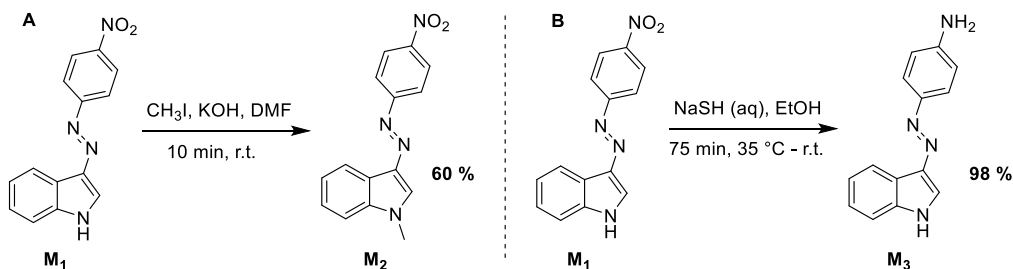
Syntetická príprava 3-fenylazaindolov

Príprava 3-fenylazaindolov $M_1 - M_3$ vychádzala z diazotačnej reakcie *p*-nitroanilínu (1) nasledovanej azo kaplingom s indolom (3). Produktom reakcie bol 3-fenylazaindol M_1 vo výťažku 68 %.



Obr. 2. Syntéza 3-fenylazandolu M_1

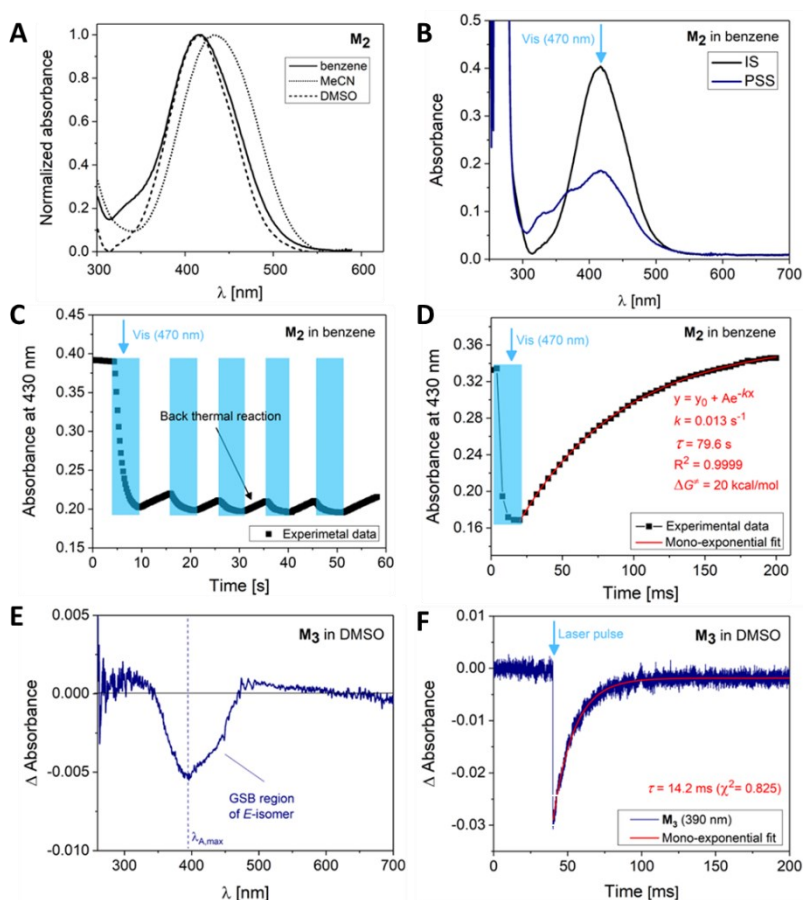
3-fenylazaindol M_1 bol ďalej použitý ako východisková zlúčenina pre prípravu derivátov M_2 a M_3 . *N*-metyláciou indolového heterocyklu sa získal 3-fenylazaindol M_2 vo výťažku 60 % a 3-fenylazaindol M_3 bol vo výťažku 98 % pripravený redukciou nitro skupiny.



Obr. 3. Syntéza 3-fenylazandolov M_2 (A) a M_3 (B)

Štúdium mechanizmu spätnej termickej izomerizácie

Pre štúdium mechanizmu spätnej termickej izomerizácie pripravených 3-fenylazaindolov bolo nevyhnutné experimentálne stanoviť polčasy ich spätnej termickej izomerizácie ($\tau_{1/2}$) a zodpovedajúce aktivačné Gibbsove energie ($\Delta G^\ddagger$) v polárnom DMSO ako aj v nepolárnom benzéne. Ako možno vidieť na obrázku 4, všetky pripravené deriváty patria medzi T-typ fotochromných zlúčenín a vykazujú správanie foto-oscilátorov s rýchlymi termickými $Z \rightarrow E$ izomerizáciami v rádoch milisekúnd.



Obr. 4. Fotochromatické správanie sa 3-fenylazaindolov M_2 a M_3 (prevzaté z lit. 5):

A) Normalizované UV-Vis spektrá M_2 v rôznych rozpúšťadlách; B) UV-Vis spektrum M_2 pred a po ožiarení (IS – počiatočný stav, PSS – fotostacionárny stav); C) fotochromatické cykly 3-fenylazaindolu M_2 v benzéne; D) spätá termická izomerizácia M_2 v benzéne po počiatočnom svetelnom impulze; E) absorpčné spektrum tranzientov M_3 v DMSO (GSB – pokles populácie základného stavu); F) kinetika zániku GSB signálu M_3 v DMSO zodpovedajúca kinetike spätnej termickej izomerizácie

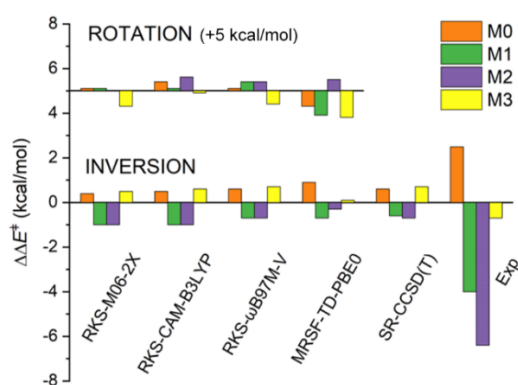
V porovnaní s materským 3-fenylazaindolom M_0 vedie prítomnosť nitro skupiny v *para* polohe fenylu a tým zvýšenie “push-pull” charakteru derivátov M_1 a M_2 k významnému skráteniu ich $\tau_{1/2}$ v polárnom prostredí a súčasnému významnému nárastu termickej stability v benzéne. Naopak, prítomnosť elektro-donorného *p*-substituenta znižuje termickú stabilitu 3-

fenylazaindolu M_2 voči materskému derivátu bez ohľadu na polaritu prostredia. Príslušné hodnoty $\tau_{1/2}$ sú spolu s hodnotami $\Delta G^\ddagger$ uvedené v Tabuľke 1.

Tab. 1. Polčasy spätných termických izomerizácií a aktivačné Gibbsové energie študovaných 3-fenylazaindolov $M_0 - M_3$.^a – údaje prebraté z lit. 6

Zlúčenina	Rozpúšťadlo	$\tau_{1/2}$	$\Delta G^\ddagger$ [kcal.mol ⁻¹]
M_0	benzén	54,4 ms ^a	16,0
	DMSO	4,51 s ^a	18,6
M_1	benzén	6,17 s	18,7
	DMSO	6,29 ms	14,7
M_2	benzén	53,3 s	20,0
	DMSO	1,21 ms	13,7
M_3	benzén	29,7 ms	15,6
	DMSO	9,84 ms	14,9

Mechanizmus spätnej termickej izomerizácie 3-fenylazaindolov $M_0 - M_3$ bol ďalej detailnejšie študovaný prostredníctvom kvantovo-chemických výpočtových metód (*ab initio* a DFT). Porovnanie experimentálne stanovených a kvantovo-chemickými výpočtami získaných rozdielov aktivačnej energie spätnej termickej izomerizácie v nepolárnom benzéne a polárnom DMSO jednoznačne poukazuje na fakt (obr.4.), že spätná termická izomerizácia prebieha v prípade molekúl M_0 , M_1 a M_2 inverzným mechanizmom, zatiaľ čo v prípade 3-fenylazaindolu M_3 je preferovanou cestou izomerizácie rotácia okolo N=N dvojitej väzby.



Obr. 5. Porovnanie experimentálnych a vypočítaných hodnôt rozdielov zmeny aktivačnej energie v benzéne a DMSO (prevzaté z lit. 5)

Záver

Pre štúdium mechanizmu spätnej termickej izomerizácie azoheteroarénových fotoprepínačov obsahujúcich vo svojej štruktúre indolový heterocyklus boli pripravené a plne

charakterizované 3-fenylazaindoly M_1 – M_3 . Pripravené deriváty vykazovali T-typ fotochromizmu, pričom polčasy ich spätnej termickej *Z-E* izomerizácie (po prvej svetlom indukovanej *E-Z* fotoizomerizácii) sa pohybovali v jednotkách až stovkách milisekúnd. Séria pripravených zlúčenín bola pri štúdiu mechanizmu spätnej reakcie pomocou kvantovo-chemických výpočtov doplnená o materský 3-fenylazaindol M_0 opísaný v literatúre. Na stanovenie výšky aktivačnej bariéry spätnej termickej reakcie vrátane vplyvu rozpúšťadla sa použilo niekoľko rôznych typov výpočtových metód, od DFT úrovne až po *ab initio* metódy. V prípade molekúl M_0 – M_2 je možné na základe porovnania vypočítaných a experimentálne stanovených hodnôt aktivačnej bariéry v rôznych rozpúšťadlách označiť za preferovaný mechanizmus spätnej termickej izomerizácie inverziu. Naopak, pre molekulu M_3 sa ukazuje byť preferovanou cestou izomerizácie rotácia.

PodĎakovanie

Tento príspevok je výsledkom realizácie APVV projektu (APVV-20-0098) podporeného Agentúrou na podporu výskumu a vývoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Jerca F. A., Jerca V. V., Hoogenboom R. (2021) Nat. Rev. Chem. 61, p. 51
- [2] Tochitsky I., Kienzler M. A., Isacoff E., et al. (2018) Chem. Rev. 118, p. 10748
- [3] Bléger D., Schwarz J., Brouwer A. M. et al. (2012) J. Am. Chem. Soc. 134, p. 20597
- [4] Schultz T., Quenneville J., Levine B., et al. (2003) J. Am. Chem. Soc., 125, p. 8098
- [5] Hegedúsová L., Kutel' R., Medved' M. et al. (2023) Int. J. Quantum. Chem. e27120
- [6] Simeth N. A., Bellisario A., Crespi S., et al. (2018) J. Am. Chem. Soc. 140, p. 2940

Prvková analýza korenín metódami atómovej spektrometrie

Mária Hodášová, Nicolas Milan Michalides, Radoslav Halko, Katarína Chovancová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; hodasova22@uniba.sk

Abstract

Elemental analysis of spices by slurry sampling technique

This thesis focuses on the development of an analytical method using atomic absorption spectrometry with electrothermal atomization in conjunction with the slurry sampling technique (SS-ETAAS) for the determination of heavy metals (aluminum and chromium) in spice samples. To achieve an effective analytical method is necessary, the optimization of critical factors, which are: the liquid medium, the concentration and volume of the liquid medium, weight of the solid spice sample, and the temperature program. The optimized SS-ETAAS parameters are as follows: the optimized liquid media are ultrapure water, 0,2 % HNO₃, and a mixture of 0,2 % HNO₃ + H₂O₂ and a weight range of solid spice samples from 30 to 100 mg. The optimal temperature of pyrolysis is in the interval from 1200 °C to 1800 °C and the optimal temperature of atomization is in the interval from 1900 °C to 2500 °C. For Al, the resulting LOD values were 0,051-0,41 µg g⁻¹ and LOQ 0,18-1,33 µg g⁻¹, for Cr the resulting LOD values were 0,091-0,23 µg g⁻¹ and LOQ 0,31-0,77 µg g⁻¹.

Keywords: *slurry sampling; heavy metals; spices*

Úvod a formulácia cieľa

Korenie alebo koreniny sú v domácnostiach využívané na dennej báze, a to najmä pre ich charakteristické dochucovacie vlastnosti. Sú to suché časti rastlín, ktoré môžu mať exotický alebo domáci pôvod. Pre organizmus môžu predstavovať zdroj prospešných, ale aj zdraviu škodlivých látok, ktorých zvýšená koncentrácia môže spôsobovať zdravotné komplikácie a riziká. Príkladom takýchto zdraviu škodlivých látok môžu byť ťažké kovy, konkrétne sa môže jednať o hliník (Al) a chróm (Cr). V rastlinách korenín sa ťažké kovy vyskytujú prirodzene, sú prijímané hlavne z pôdy a vody, avšak ich koncentrácia v koreninách sa môže náhle zvýšiť, ak sa rastlina pestuje v kontaminovanom životnom prostredí. Pestovanie korenín v prostredí so zvýšenou koncentráciou ťažkých kovov je hlavný spôsob kontaminácie korenín ťažkými kovmi. Druhým kľúčovým spôsobom kontaminácie korenín ťažkými kovmi je priemyselné spracovanie korenín, ktoré zahŕňa procesy od mechanickej úpravy korenia až po ich prepravu a skladovanie [1].

Nebezpečnosť ťažkých kovov spočíva najmä v ich schopnosti akumulácie, či už v životnom prostredí alebo aj v živých organizmoch. Ťažké kovy môžu mať negatívny vplyv na nervový, kardiovaskulárny, imunitný, reprodukčný alebo gastrointestinálny systém. Vzhľadom k toxickým účinkom ťažkých kovov na ľudské zdravie je potrebná pravidelná kontrola ich obsahu v poľnohospodárskych surovinách a v spracovaných produktoch korenia.

Taktiež je veľmi dôležité aj stanovenie limitných hodnôt ich prípustnosti v produktoch uvádzaných na trh. Tým sa zabezpečí kvalita tovaru, predíde sa falšovaniu potravín a spotrebiteľ sa ochráni pred zvýšeným príjmom ťažkých kovov [2 – 3].

Na prvkovú analýzu vzoriek korenín sú široko využívané techniky atómovej spektrometrie (AS), pri ktorých je v mnohých prípadoch nutná úprava vzoriek. Tá zahŕňa prevedenie tuhých vzoriek do roztoku pomocou rozkladu vzoriek mokrou alebo suchou cestou. Technika dávkovania jemnej suspenzie (SS) predstavuje zelenú alternatívnu techniku na úpravu tuhých vzoriek pred ich analýzou rôznymi technikami AS. Jednou z mnohých výhod techniky SS je jednoduchšia úprava vzoriek a skrátenie času celej analýzy, redukcia objemov rozpúšťadiel alebo zníženie rizika kontaminácie vzoriek a straty analytov redukciou krokov úpravy vzoriek. [4]

Cieľom práce bol vývoj analytickej metódy na prvkovú analýzu vybraných vzoriek korenín s dôrazom na stanovenie Al a Cr technikou dávkovania jemnej suspenzie v spojení s atómovou absorpčnou spektrometriou s elektrotermickou atomizáciou (SS-ETAAS).

Materiál a metódy

Z prístrojového vybavenia bol na stanovenie analytov v tuhých vzorkách korenín využitý atómový absorpčný spektrometer firmy Perkin-Elmer 5100 PC (Norwalk, Connecticut, USA) s elektrotermickým atomizátorom 5100 ZL v spojení s automatickým podávačom vzoriek AS – 70.

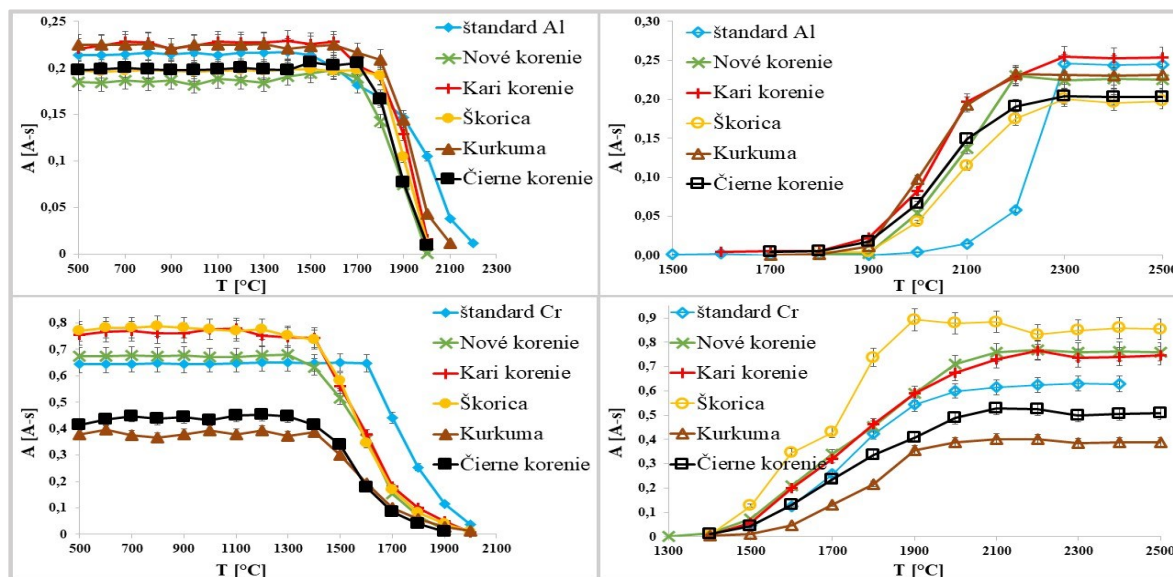
Potrebnými chemikáliami boli: 65 % (m/v) HNO_3 Suprapur; 37 % (m/v) HCl Suprapur od firmy Merck (Darmstadt, Nemecko); 35 % (v/v) H_2O_2 p. a. od firmy Mikrochem (Pezinok, Slovenská republika) a ultračistá H_2O . Štandardy Al a Cr na analýzu atómovou absorpčnou spektrometriou s elektrotermickou atomizáciou 1000 mg l^{-1} $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ v 0,5 mol l^{-1} HNO_3 CertiPUR (Merck, Darmstadt, Nemecko) a 1000 mg l^{-1} $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ v 0,5 mol l^{-1} HNO_3 CertiPUR (Merck, Darmstadt, Nemecko).

Výsledky a diskusia

Na dosiahnutie uvedeného hlavného cieľa práce bolo potrebné optimalizovať parametre metódy, ktoré zahŕňajú teplotný program, výber kvapalného média, objem kvapalného média a hmotnosť návažku vzorky.

Prvým parametrom optimalizácie bola optimalizácia teplotného programu jemných suspenzií vzoriek korenín v ETAAS, pričom sme zisťovali optimálnu teplotu pyrolýzy a atomizácie analytov. V teplotnom programe pyrolýzy sme pracovali v intervale teplôt od

500 °C do 2200 °C. Interval teplotného programu atomizácie sa odvíjal od optimalizovaných teplôt pyrolýzy. Najnižšiu hodnotu teplôt atomizácie sme volili o 100 °C vyššiu ako optimálnu teplotu pyrolýzy a pracovali sme až po teplotu 2500 °C. Priebeh kriviek pyrolýzy a atomizácie analytov Al a Cr vo vzorkách korenín je zobrazený na Obrázku 1.

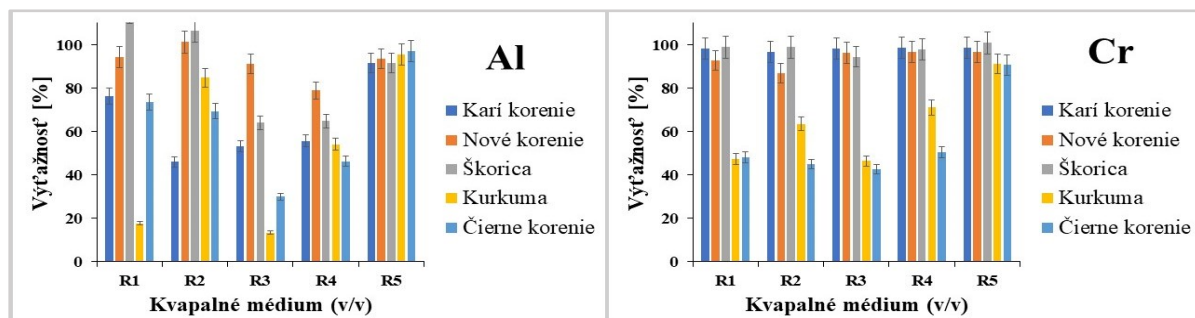


Obr. 1. Priebeh kriviek pyrolýzy a atomizácie na stanovenie analytov hliníka a chrómu vo vybraných vzorkách korenín. Prídavok štandardu Al a Cr v jemných suspenziách bol $50 \mu\text{g l}^{-1}$. Priebeh kriviek pre analyt Al: atomizácia (vľavo hore) a pyrolýza (vpravo hore). Priebeh kriviek pre analyt Cr: atomizácia (vľavo dole) a pyrolýza (vpravo dole). Chybové úsečky označujú štandardné odchýlky jednotlivých opakovaných meraní vzorky pre $n = 4$.

Na základe Obrázku 1 sme pre analyt Al určili teplotu pyrolýzy 1600 °C pre vzorky kurkumy a čierneho koreníe. Pre vzorky škorice a nového koreníe bola optimálna teplota pyrolýzy 1700 °C a najnižšiu optimálnu teplotu pyrolýzy sme zvolili pre vzorku karí koreníe, ktorá mala hodnotu 1500 °C. Optimálna teplota atomizácie pre vzorky kurkumy a nového koreníe bola 2200 °C, pre zvyšné vzorky bola o 100 °C vyššia, čiže 2300 °C. Pri stanovení Cr môžeme pozorovať väčšie rozdiely medzi optimálnymi teplotami pyrolýzy a atomizácie. Pre vzorky kurkumy, čierneho koreníe, škorice, nového koreníe a karí koreníe boli teploty pyrolýzy nasledovné: 1600 °C, 1800 °C, 1300 °C, 1200 °C a 1300 °C. Značné rozdiely sme pozorovali aj pri optimálnej teplote atomizácie. Pre vzorky kurkumy, čierneho koreníe a škorice boli stanovené teploty atomizácie 2400 °C, 2500 °C a 1900 °C. Vzorky nového koreníe a karí koreníe mali rovnakú teplotu atomizácie a to 2200 °C.

Ďalším optimalizovaným parametrom vyvíjanej metódy bol výber vhodného kvapalného média, ktoré zároveň slúži aj ako suspenzné činidlo eliminujúce možné interferencie matrice. V predkladanej práci sme ako potenciálne kvapalné médiá zvolili 0,2 %

(v/v) HNO_3 ; zmes 0,2 % (v/v) HNO_3 + 0,2 % (v/v) H_2O_2 ; zmes 0,2 % (v/v) HNO_3 + 0,2 % (v/v) HCl ; 0,2 % (v/v) HCl a ultračistú H_2O . Na Obrázku 2 môžeme pozorovať vplyv kvapalného média na výťažnosť stanovenia Al a Cr v tuhých vzorkách korenín. Optimálne kvapalné média sú uvedené v Tab. 1.



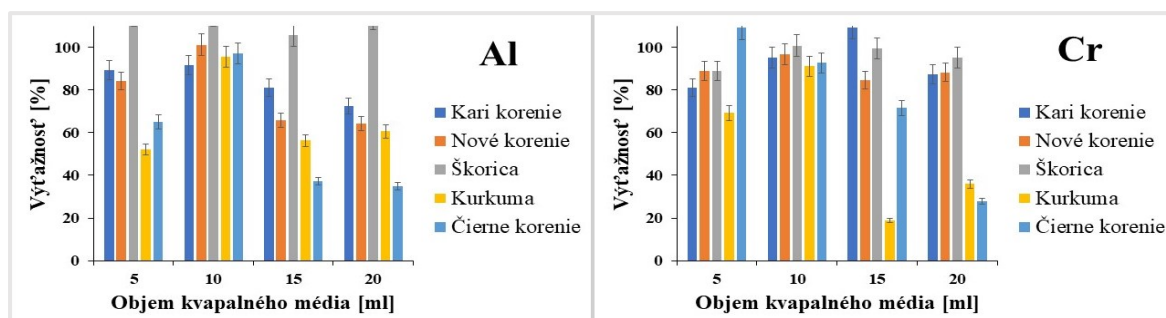
Obr. 2. Závislosť výťažnosti stanovenia hliníka a chrómu od druhu kvapalného média. Závislosť výťažnosti stanovenia Al od kvapalného média (vľavo), závislosť výťažnosti stanovenia Cr od kvapalného média (vpravo). R predstavuje druh kvapalného média: R1 je 0,2 % HNO_3 ; R2 je zmes 0,2 % HNO_3 + 0,2 % H_2O_2 ; R3 je zmes 0,2 % HNO_3 + 0,2 % HCl ; R4 je 0,2 % HCl ; R5 je ultračistá H_2O . Prídavok štandardu Al a Cr v jemných suspenziách bol $50 \mu\text{g l}^{-1}$. Chybové úsečky označujú štandardné odchýlky vzorky jednotlivých opakovaných meraní pre $n = 4$.

Pri stanovení Al a Cr bola vo väčšine prípadov vzoriek korenín optimálnym kvapalným médiom ultračistá H_2O . Výnimka nastala pri stanovení Al, konkrétne pri vzorke nového korenia, pre ktorú bola optimálnym kvapalným médiom HNO_3 a vzorka škorice, ktorá mala optimálne kvapalné médium zmes 0,2 % (v/v) HNO_3 + 0,2 % (v/v) H_2O_2 . V týchto prípadoch sme museli vykonať optimalizáciu koncentrácie konkrétneho kvapalného média. Optimalizácia sa uskutočnila s koncentraciami 0,1 % (v/v); 0,2 % (v/v); 1 % (v/v) a 5 % (v/v) optimalizovaného kvapalného média vybraného v predchádzajúcom kroku. V Tabuľke 1 sú uvedené výsledné optimálne kvapalné médiá s ich výslednou koncentráciou.

Tab. 1. Optimalizované parametre na stanovenie hliníka a chrómu v tuhých vzorkách korenín metódou SS-ETAAS

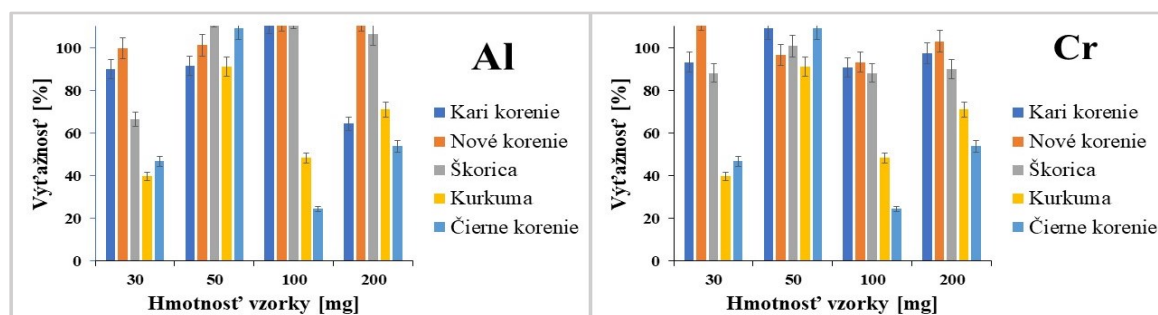
Vzorka	Hliník			Chróm		
	Kvapalné médium	Objem kvapalného média [ml]	Hmotnosť vzorky [mg]	Kvapalné médium	Objem kvapalného média [ml]	Hmotnosť vzorky [mg]
Kurkuma	H_2O	10	50	H_2O	10	50
Čierne koreníe	H_2O	10	50	H_2O	5	50
Škorica	0,2 % HNO_3	5	50	H_2O	10	50
Nové koreníe	0,2 % HNO_3 + H_2O_2	10	100	H_2O	10	30
Kari koreníe	H_2O	10	100	H_2O	15	50

Po optimalizácii výberu kvapalného média sme sa zamerali na optimalizáciu objemu kvapalného média. Pri tejto optimalizácii sme pracovali s objemami kvapalného média 5; 10; 15 a 20 ml. Na Obrázku 3 môžeme vidieť závislosť výťažnosti stanovenia Al a Cr od objemu kvapalného média. Optimálne objemy kvapalných médií sú uvedené v Tabuľke 1.



Obr. 3. Závislosť výťažnosti stanovenia hliníka a chrómu od objemu kvapalného média. Závislosť výťažnosti stanovenia Al od objemu kvapalného média (vľavo). Závislosť výťažnosti stanovenia Cr od objemu kvapalného média (vpravo). Prídavok štandardu Al a Cr v jemných suspenziách bol $50 \mu\text{g l}^{-1}$. Chybové úsečky označujú štandardné odchýlky jednotlivých opakovaných meraní vzorky pre $n = 4$.

Pri optimalizácii hmotnosti vzorky sme pracovali s predtým už optimalizovanými parametrami. Jediné zmeny sa týkali hmotnosti vzorky, ktorej konkrétne hodnoty boli 30; 50; 100 a 200 mg. Sledovali sme zmenu výťažnosti stanovenia Al a Cr v závislosti od hmotnosti vzorky, ktorá je znázornená na Obrázku 4. Optimálne hodnoty hmotnosti návažku vzoriek korenín na stanovenie Al a Cr sú uvedené v Tabuľke 1.



Obr. 4. Závislosť výťažnosti stanovenia hliníka a chrómu od hmotnosti vzorky. Závislosť výťažnosti stanovenia Al od návažku vzorky korenín (vľavo). Závislosť výťažnosti stanovenia Cr od návažku vzorky korenín (vpravo). Prídavok štandardu Al a Cr v jemných suspenziách bol $50 \mu\text{g l}^{-1}$. Chybové úsečky označujú štandardné odchýlky jednotlivých opakovaných meraní vzorky pre $n = 4$.

Po optimalizácii jednotlivých parametrov metódy SS-ETAAS sme boli schopní stanoviť koncentrácie ťažkých kovov Al a Cr v tuhých vzorkách korenín. Výsledné hodnoty sú zosumarizované v Tabuľke 2. V porovnaní, napríklad s prácou Manousi a kolektív [5], je

hlavnou výhodou našej vyvinutej metódy, že sme pracovali v súlade s princípmi zelenej analytickej chémie a úpravy vzoriek neboli uskutočnené mokrým rozkladom, pričom sme dosiahli porovnateľné hodnoty LOD.

Tab. 2. Výsledné stanovené koncentrácie hliníka a chrómu v tuhých vzorkách korenín vyvinutou metódou SS-ETAAS

Vzorka	Hliník				Chróm			
	Koncentrácia [$\mu\text{g g}^{-1}$]	RSD [%]	LOD [$\mu\text{g g}^{-1}$]	LOQ [$\mu\text{g g}^{-1}$]	Koncentrácia [$\mu\text{g g}^{-1}$]	RSD [%]	LOD [$\mu\text{g g}^{-1}$]	LOQ [$\mu\text{g g}^{-1}$]
Kurkuma	27,28	1,33	0,23	0,77	0,46	4,63	0,41	1,33
Čierne korenie	37,89	3,74	0,13	0,45	0,44	3,72	0,21	0,67
Škorica	58,82	2,39	0,091	0,31	0,31	4,25	0,18	0,61
Nové korenie	7,58	0,36	0,091	0,301	0,45	4,76	0,051	0,18
Karí korenie	33,52	1,62	0,101	0,35	0,49	2,71	0,14	0,46

Záver

Zo získaných výsledkov je zjavné, že najvyššia koncentrácia Al bola stanovená vo vzorke škorice, a to $58,82 \mu\text{g g}^{-1}$. Naopak, najnižšia koncentrácia Al bola vo vzorke nového korenia $7,58 \mu\text{g g}^{-1}$. Koncentrácia Al vo vzorkách korenia bola značne vyššia ako bola stanovená koncentrácia Cr vo vzorkách. Najvyššia koncentrácia Cr bola stanovená vo vzorke karí korenia, a to $0,49 \mu\text{g g}^{-1}$ a najnižšia koncentrácia $0,31 \mu\text{g g}^{-1}$ bola stanovená v škoricí. Hodnoty relatívnych smerodajných odchýliek (RSD) boli pre všetky vzorky do 5 %.

PodĎakovanie

Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-21-0323, Vedeckou grantovou agentúrou MŠ SR - projekt VEGA 1/0246/23 a Grantom Univerzity Komenského č. UK/129/2023.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Winiarska-Mieczan, A., Jachimowicz, K., Kwiecień, M. et al. (2022) Biol. Trace. Elem. Res. 200(10), p. 4370
- [2] Luo, L., Wang, B., Jiang, J. et al. (2020) Front. Pharmacol. 11, p. 595
- [3] Voica, C., Nechita, C., Iordache, A. M. (2021) Molecules. 26(23), p. 7081
- [4] Kriegerová, K., Procházková, S., Halko, R. (2019) Chem. Listy. 113(10), p. 574
- [5] Manousi, N., Issakidou, E., Zachariadis, G. A. (2022) Appl. Sci. 12(2), p. 534

Ekotoxická vybraných pesticídov a ich degradačných medziproduktov vzniknutých po pokročilom oxidačnom procese

Alexandra Horná, Ján Derco, Nikola Šoltýsová

Slovenská technická univerzita, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Oddelenie environmentálneho inžinierstva, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika, alexandrahorna@gmail.com

Abstract

Ecotoxicity of selected pesticides and its degradation products formed after an advanced oxidation process

Pesticides are mostly bio-resistant substances that cannot be removed from wastewater by biological processes. Therefore, the subject of many research papers is optimization of combined biological and chemical processes. These combined processes provide the economic availability of biological and the efficiency of chemical processes and therefore have a huge perspective. The aim of this work was the transformation of atrazine, alachlor and lindane by ozone-based processes, and subsequently the research of the toxicity of the aforementioned pesticides and their oxidation intermediates. The transformation of the studied substances into less toxic intermediates by the ozonation process was efficient, which was confirmed by the results of toxicity tests on *Sinapis alba* and *Allium cepa*. Thus, in the case of atrazine, lindane and alachlor, further research of the combined removal processes for these substances is important.

Keywords: alachlor; atrazine; lindane; ozonation; ecotoxicity

Úvod a formulácia cieľa

V predkladanej práci sa zameriavame na degradáciu alachlóru, atrazínu a lindánu procesom ozonizácie pri zvýšenom pH a následným skúmaním ekotoxicity na *Sinapis alba* a *Allium cepa*. Zvýšením pH sme podporili tvorbu HO[•] radikálov, čo znamená, že prebiehala nepriama reakcia, čím sme zvýšili účinnosť degradácie týchto rezistentných organických látok [1].

Alachlór (C₁₄H₂₀ClNO₂) patrí do skupiny chlóracetanilídových herbicídov, v Európskej únii je jeho používanie zakázané od roku 2006. Alachlór sa zvykol používať ako herbicíd na kontrolu rastu trávy, na kontrolu pestovania semien, kukurice a zeleniny. Ide o vysoko toxickú látku pre vodné organizmy. Je potvrdený živočíšny karcinogén s neznámou relevanciou pre ľudí. Vo vodnom prostredí bioakumuluje a dostáva sa tak do potravinového reťazca [2].

Atrazín (C₈H₁₄ClN₅) patrí do skupiny triazínových herbicídov. Jedná sa o herbicíd, ktorý je hrozbou pre životné prostredie hlavne kvôli nízkej biologickej odbúrateľnosti. Väčšinou sa používal v poľnohospodárstve a na farmách na ničenie buriny. V Európskej únii je jeho používanie zakázané od roku 2005 [3].

Lindán (C₆H₆Cl₆) patrí do skupiny organochlórovaných pesticídov a má tendenciu

hromadiť sa v potravinovom reťazci. Používal sa ako insekticíd na ovocie, zeleninu a zvieratá. Pri dlhodobej expozícii lindánom môže dôjsť k problémom s pečeňou, spôsobuje neurologické poruchy a kardiovaskulárne ochorenia a má negatívny vplyv na imunitný systém. Lindán je endokrinný disruptor. V Európskej únii je zakázaný od roku 2010 [4].

Aj napriek tomu, že sú tieto látky v Európskej únii zakázané, neustále ich nachádzame vo všetkých zložkách životného prostredia, a preto je veľmi dôležité sa týmto látkam naďalej venovať.

Podľa Nariadenie vlády Slovenskej republiky, o environmentálnych normách kvality v oblasti vodnej politiky č. 167/2015 je najvyššia prípustná koncentrácia alachlóru vo vnútrozemských a ostatných vodách $0,7 \mu\text{g.l}^{-1}$, atrazínu $2 \mu\text{g.l}^{-1}$ a lindánu $0,04 \mu\text{g.l}^{-1}$ vo vnútrozemských vodách a $0,02 \mu\text{g.l}^{-1}$ v ostatných povrchových vodách [5].

Materiál a metódy

Pri procesoch s využitím ozónu bol použitý reaktor s vonkajšou recirkuláciou reakčnej zmesi.

Koncentrácia študovaných pesticídov na začiatku experimentu bola $0,03 \text{ mmol.l}^{-1}$, objem reaktora bol $V = 3 \text{ l}$.

Podmienky experimentu boli nasledovné: prietok kyslíka $Q_{O_2} = 60 \text{ l.h}^{-1}$, výkon generátora ozónu $P = 50 \%$ z maximálneho výkonu generátora ozónu, $t = 23 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 101\,325 \text{ Pa}$, $\text{pH} = 10$, reakčný čas bol 180 minút.

Testy toxicity na *Sinapis alba* boli realizované v Petriho miskách. Do Petriho misiek sme napipetovali vzorku skúmanej látky a riediacu vodu v pomere 1:1, následne sme na Petriho misku položili filtračný papier a pomocou pinzety sme naň uložili 30 semien horčice bielej v geometrickom usporiadaní. Pre každú skúmanú látku sme robili 3 paralelné Petriho misky. Po 72 hodinách sme odmerali dĺžku každého vyklíčeného semena [6].

Testy toxicity na *Allium cepa* boli realizované v skúmavkách. Pozorovali sme nárast dĺžky a zmenu v hmotnosti koreňov. Najprv sme približne rovnako veľké cibulky ošúpali a umiestnili sme ich na 24 hodín do fľaše s vodou na tmavé miesto pri laboratórnej teplote. Pre každú vzorku sme si pripravili 6 skúmaviek, do ktorých sme umiestnili cibulky s vyklíčenými koreňmi tak, aby boli ponorené do roztoku s prítomnými toxickými látkami. Cibulky klíčili na svetlom mieste pri laboratórnej teplote 7 dní. Nakoľko mohlo počas testu prísť k odparovaniu roztokov, do skúmaviek sme príslušné vzorky priebežne dopĺňali. Po skončení experimentu sme si odmerali dĺžku všetkých koreňov pre všetky vzorky a vypočítali aritmetický priemer. Korene sme následne vysušili pri teplote $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Po vychladnutí sme ich odvážili. Výsledky hmotností sme pre jednotlivé vzorky spriemerovali a vyhodnotili [7].

V prípade analýzy medziproduktov po ozonizácii pri pH = 10 sme uvažovali o zvolení skupinových parametrov ako CHSK (chemická spotreba kyslíka), avšak nízke koncentrácie pesticídov ($c = 0,03 \text{ mmol.l}^{-1}$) a taktiež nízke hodnoty teoretickej spotreby kyslíka túto možnosť neumožnili. Preto sa pri práci pozoroval vplyv vzniknutých medziproduktov na vybrané rastliny a na základe týchto výsledkov sa vyhodnotila účinnosť procesu ozonizácie.

V ďalšom výskume by sme sa zamerali na posudzovanie účinnosti degradácie vybraných pesticídov podľa koncentrácie chloridov. Chloridy by sme stanovili argentometrickou titráciou podľa Mohra. Vybrané pesticídy obsahujú vo svojej molekule rôzny počet naviazaných atómov chlóru. Cieľom tejto práce bola produkcia menej toxických oxidačných medziproduktov ako bol pôvodný pesticíd. Prítomnosť chloridov v molekule má veľký vplyv na toxicitu. Taktiež by sme v prípade analyzovania vzniknutých medziproduktov mohli ako metódu analýzy zvoliť plynovú chromatografiu a hmotnostnú spektrometriu.

Výsledky a diskusia

Tab. 1. Vyhodnotenie testov toxicity na *Sinapis alba* pre vzorku atrazínu, alachlóru a lindánu pred procesom ozonizácie

vzorka	Dĺžka koreňa (cm)	Inhibícia (%)	Smerodajná odchýlka (cm)
voda	$2,2 \pm 0,1$	štandard	0,023
atrazín	$1,8 \pm 0,1$	19,85	0,077
alachlór	$1,1 \pm 0,1$	51,71	0,094
lindán	$2,1 \pm 0,2$	4,32	0,246

Tab. 2. Vyhodnotenie testov toxicity na *Sinapis alba* pre vzorku atrazínu, alachlóru a lindánu po procese ozonizácie

vzorka	Dĺžka koreňa (cm)	Inhibícia (%)	Smerodajná odchýlka (cm)
voda	$4,2 \pm 0,1$	štandard	0,161
atrazín po O ₃ /pH=10	$4,3 \pm 0,2$	-1,34	0,262
alachlór po O ₃ /pH=10	$4,5 \pm 0,1$	-6,49	0,195
lindán po O ₃ /pH=10	$3,9 \pm 0,2$	8,73	0,162

V prípade oxidačných medziproduktov atrazínu a alachlóru môžeme pozorovať pokles

inhibičného vplyvu na rast koreňov *Sinapis alba*. Na základe týchto výsledkov môžeme vyhodnotiť, že proces ozonizácie bol pre vzorku atrazínu a alachlóru účinný v produkcii menej toxických medziproduktov. V prípade lindánu pozorujeme zvýšenie inhibičného vplyvu. To môže znamenať, že sa lindán pri procese ozonizácie transformoval na inú látku, ktorá má väčší inhibičný vplyv na rast koreňov *Sinapis alba* ako pôvodný pesticíd lindán.

Tab. 3. Porovnanie dĺžky koreňov *Allium cepa* pre vzorku atrazínu, alachlóru a lindánu pred procesom ozonizácie

vzorka	Dĺžka koreňa (cm)	Inhibícia (%)	Smerodajná odchýlka (cm)
voda	7,9 ± 0,1	štandard	0,660
atrazín	3,9 ± 0,1	50,80	2,145
alachlór	1,8 ± 0,1	76,80	0,532
lindán	1,4 ± 0,1	81,90	0,596

Tab. 4. Porovnanie dĺžky koreňov *Allium cepa* pre vzorku atrazínu, alachlóru a lindánu po procese ozonizácie

vzorka	Dĺžka koreňa (cm)	Inhibícia (%)	Smerodajná odchýlka (cm)
voda	7,9 ± 0,1	štandard	0,660
atrazín po O ₃ /pH=10	6,8 ± 0,2	14,60	0,723
alachlór po O ₃ /pH=10	6,0 ± 0,1	24,50	1,071
lindán po O ₃ /pH=10	5,2 ± 0,2	34,00	1,361

Tab. 5. Porovnanie hmotnosti sušiny koreňov *Allium cepa* pre vzorku atrazínu, alachlóru a lindánu pred procesom ozonizácie

vzorka	Hmotnosť koreňa (g)	Inhibícia (%)
voda	0,1720 ± 0,0001	štandard
atrazín	0,0788 ± 0,0001	54,20
alachlór	0,0531 ± 0,0001	69,10
lindán	0,0588 ± 0,0001	65,80

Tab. 6. Porovnanie hmotnosti sušiny koreňov *Allium cepa* pre vzorku atrazínu, alachlóru a lindánu po procese ozonizácie

vzorka	Hmotnosť koreňa (g)	Inhibícia (%)
voda	0,1720 ± 0,0001	štandard
atrazín po O ₃ /pH=10	0,1289 ± 0,0001	25,10
alachlór po O ₃ /pH=10	0,0778 ± 0,0001	54,80
lindán po O ₃ /pH=10	0,1378 ± 0,0001	19,90

Cieľom testov toxicity s *Allium cepa* bolo pozorovať inhibíciu rastu koreňov na inhibíciu hmotnosti sušiny (biomasy) koreňov v prítomnosti atrazínu, alachlóru a lindánu a ich oxidačných medziproduktov.

Výsledky testu toxicity na *Allium cepa*, kde je sledovaným parametrom inhibícia rastu koreňov sú zobrazené v Tab. 3 a 4. V prípade všetkých oxidačných produktov môžeme vidieť pokles inhibície rastu koreňov do dĺžky oproti pôvodným pesticídnym látkam. Toxicita príslušných oxidačných medziproduktov sa oproti atrazínu znížila o 72 %, alachlóru o 68 % a lindánu o 59 %.

Výsledky testu toxicity na *Allium cepa*, kde je sledovaným parametrom inhibícia nárastu hmotnosti koreňov sú uvedené v Tab. 5 a 6. Toxicita príslušných oxidačných medziproduktov sa oproti atrazínu znížila o 54 %, alachlóru o 21 % a lindánu o 64 %.

Na základe týchto údajov môžeme vyhodnotiť, že proces ozonizácie vybraných pesticídov bol účinný v produkcii oxidačných produktov, ktoré mali menší inhibičný vplyv na rast vybraných rastlín, než pôvodné polutanty.

Záver

Pri ekotoxikologických testoch bolo naším cieľom porovnať účinky atrazínu, alachlóru, lindánu a ich oxidačných medziproduktov na rast koreňov *Sinapis alba* a na rast a hmotnosť koreňov *Allium cepa* pred ozonizáciou a po ozonizácie.

Transforácia študovaných pesticídov na menej toxické medziprodukty procesom ozonizácie pri pH = 10 bola účinná. Výsledky ekotoxikologických testov na *Allium cepa*, kde sme sledovali rast koreňov *Allium cepa*, mali lepšiu výpovednú hodnotu ako výsledky, kde sme sledovali hmotnosť koreňov. Toxicita príslušných oxidačných medziproduktov sa oproti atrazínu znížila o 72 %, alachlóru o 68 % a lindánu o 59 %. Atrazín, alachlór a lindán mali väčší inhibičný vplyv na rast koreňov *Allium cepa* v porovnaní s vplyvom na rast koreňov *Sinapis alba*.

PodĎakovanie

Na tomto mieste by som sa chcela poĎakovať môjmu vedúcemu práce prof. Ing. Jánovi Dercovi DrSc. a Ing. Nikole Šoltýsovej za ich odborné rady, usmernenia a ochotu pomôcť pri písaní predkladanej práce.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Rekhate Chhaya V., Srivastava J. K. (2020) Chemical Engineering Journal Advances 3, 100031
- [2] Tirmenstein M.A., Mangipudy R. (2014) Alachlor. In: Wexler P. (ed.) Encyclopedia of Toxicology. Academic Press, London, England, Third edition, p. 107
- [3] Graymore M., Stagnitti F., Allinson G. (2001) Environment International 26(7-8), p. 483
- [4] Saez J. M., Alvarez A., Fuentes M. S., et al. (2017) An Overview on Microbial Degradation of Lindane. In: Singh S. N. (ed) Microbe-Induced Degradation of Pesticides. Springer International Publishing, Charm, Switzerland, First edition, p. 191
- [5] Nariadenie vlády SR č. 167/2015 Z. z. o environmentálnych normách kvality v oblasti vodnej politiky.
- [6] Hybská H., Hroncová E., Ladomerský J., et al. (2017) Materials 10(5), p. 505
- [7] Fiskesjö G. (1985) Hereditas 102(1), p. 99

Syntéza nového makrocyclického binaftylového prepínača s acetamidovým mostíkom

Lukáš Huska, Iveta Kmentová, Martin Putala

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; huska8@uniba.sk

Abstract

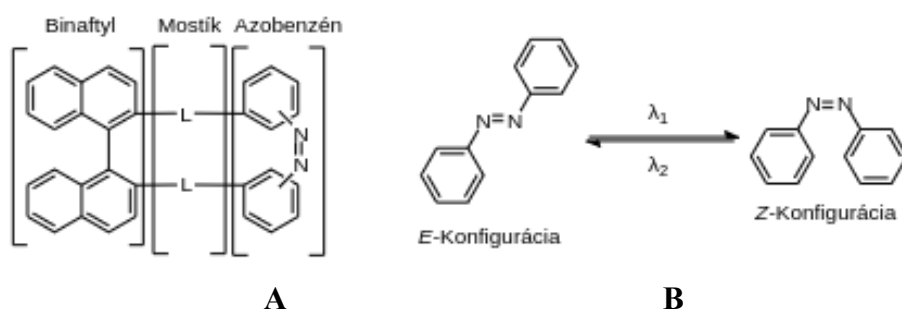
Synthesis of a novel macrocyclic binaphthyl switch with acetamide bridge

Photoswitchable chiroptical molecules are desirable for advanced optical information storage materials for the possibility of nondestructive readout. A novel 18 atomic macrocyclic switch based on the axially chiral binaphthyl moiety was designed and prepared. The binaphthyl moiety was connected to switchable diphenyldiazene group by two 3 atomic bridges $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-$. Starting from commercially available 2-naphthol, the synthesis of novel macrocyclic azobenzene switch was achieved over 5 steps in overall yield 1,7%. Preliminary studies shows that isomerisation of $-\text{N}=\text{N}-$ affects the dihedral angle of binaphthyl moiety. Further study of dihedral angle change by CD spectroscopy would be conducted.

Keywords: molecular switch; binaphthyl; chiroptic; diaryldiazene; macrocyclic

Úvod a formulácia cieľa

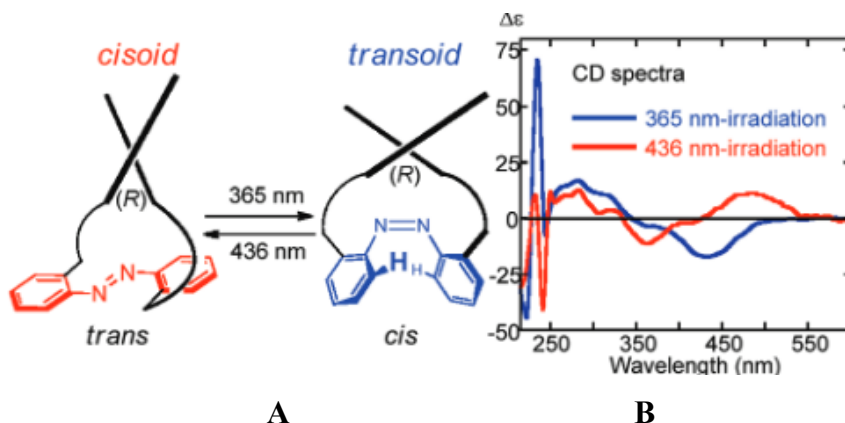
Axiálne chirálne binaftyly sú používané v organickej syntéze ako katalyzátory a v poslednej dobe aj ako štruktúrna jednotka pre nové nanomateriály [1]. V 1,1'-binaftylových derivátoch bolo pozorované, že CD spektrá sú veľmi citlivé na zmenu dihedrálneho uhlu zvieraného medzi dvoma naftylovými jednotkami a spôsobujú výraznú zmenu v CD spektrách. Zabudovaním binaftylovej jednotky do makrocyclu s napr. azobenzénovou jednotkou zmena dihedrálneho uhla môže nastať ako dôsledok izomerizácie $-\text{N}=\text{N}-$ väzby pôsobením elektromagnetického žiarenia. (Obr. 1).



Obr. 1. A - Binaftylový prepínač B - Prepínanie medzi (E)- a (Z)- konfiguráciou vplyvom elektromagnetického žiarenia

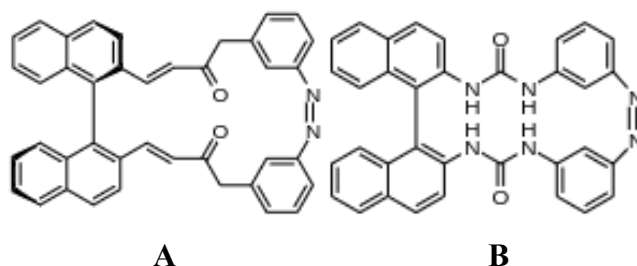
V literatúre sú opísané rôzne makrocyclické binaftylové prepínače, hlavne výskumnou

skupinou Kawamoto. Tieto prepínače majú v sebe zabudovaný éterový mostík ($L = -O-CH_2-CH_2-O-$) na pripojenie binaftylovej jednotky k diaryl diazénovej časti a pri syntéze vychádzajú z BINOLu, resp. jeho derivátov [2].



Obr. 2. Zmena dihedrálneho uhla pôsobením izomerizácie $-N=N-$ väzby a následná zmena pozorovaná v CD spektre zlúčeniny s $L = -O-CH_2-CH_2-O-$, podľa [2]

Naša výskumná skupina pripravila molekulové prepínače na podobnom princípe, avšak namiesto éterového mostíku sa v ňom nachádzal mostík obsahujúci karbonylovú skupinu, resp. močovinu [3,4,5].



Obr. 3. A - Molekulový prepínač s karbonylovou skupinou
B - Molekulový prepínač s močovinovým mostíkom

Molekulové prepínače, ktoré majú chiroptické vlastnosti, majú význam v materiálovej chémii kvôli svojej schopnosti meniť svoj stav a tým ukladať dáta vo forme binárneho kódu, čo môže byť využité v pamäťových médiách. Dôležitou vlastnosťou pri prepínaní chiroptického prepínača je selektívna citlivosť typ elektromagnetického žiarenia (jeho vlnová dĺžka a polarizácia).

Naším cieľom bola syntéza binaftylového prepínača s diazénovou jednotkou s primerane tesným prepojením a štúdium jeho vlastností. V experimentálnej časti uvádzame prípravu prepínača, ktorý má trojatómový mostík $-NH-CO-CH_2-$ medzi binaftylom a

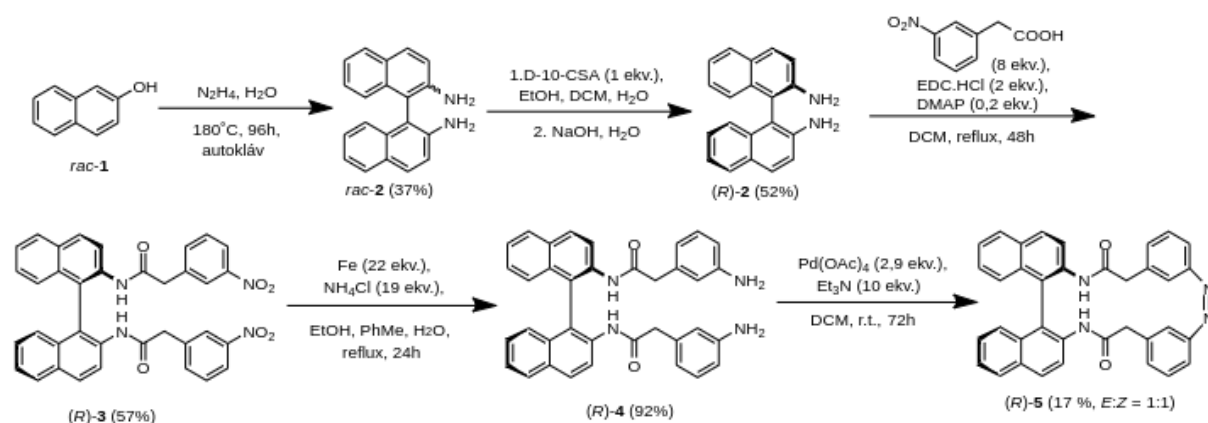
prepínacou jednotkou obsahujúcou diazосkupinu.

Materiál a metódy

Východiskové látky boli kúpené od spoločností Fluorochem, Sigma-Aldrich a Merck. Rozpúšťadlá boli vopred predestilované. Analýzy boli robené na prístrojoch Prif UK (T_b , NMR, IČ UV-Vis) a na SAV (HRMS). Postup pre kroky 1 a 2 bol uskutočnený podľa literatúry [6,7] a ostatné kroky boli vykonávané analogicky postupom v literatúre [3, 8,9,10,11].

Výsledky a diskusia

Pri príprave sme vychádzali z 2-naftolu. Celá príprava zahŕňa 5 krokov ako je naznačené na obrázku 4.



Obr 4. Syntéza chirálneho molekulového prepínača 5

Syntéza enantiomérne čistého diamínu 2 bola uskutočnená podľa literárnych postupov [6,7]. Vychádzali sme z 2-naftolu 1, hydrazínu a vody, pričom reakcia prebiehala v autokláve. (R)-diamín 2 bol získaný optickým štiepením racemickej zmesi 2 pomocou kryštalizácie vo forme soli s kyselinou gáforsulfónovou. Voľný (R)-diamín 2 sa získal v celkovom výťažku 19% po troch krokoch. Reakcia medzi diamínom 2 s kyselinou 3-nitrofenyloctovou za prítomnosti EDC.HCl ako aktivátora a DMAP ako katalyzátora vyžadovala optimalizáciu podmienok, keďže doposiaľ nebola opísaná v literatúre. Nitroderivát 3 sme získali vo výťažku 57%. Redukcia nitroderivátu 3 na aminoderivát 4 tiež vyžadovala optimalizáciu reakčných podmienok, preto výsledky uvádzame v tabuľke 1.

Tab. 1. Podmienky redukcie nitroderivátu 3

*Výtazky neboli reprodukovateľné kvôli vzniku vedľajšieho produktu z konkurenčnej reakcie

	Rozpúšťadlo	Reakčné činidlá	Čas	Výtazok 4
1	Pyridín	H ₂ + Pd/C	24 h	0%
2	PhMe + EtOH (1:1)	H ₂ + Pd/C	72 h	90*%
3	PhMe + MeOH (1:1)	H ₂ + Pd/C	48 h	80%
4	PhMe + EtOH + H ₂ O (1:1:2)	Fe (22 ekv.) NH ₄ Cl (19 ekv.)	24 h	92%

Posledným krokom pri syntéze je makrocyclizačná reakcia pomocou octanu olovičitého. Táto reakcia musí prebiehať v tmavom skle, aby sa zabránilo izomerizácii vplyvom UV žiarenia. Výtazok produktu 5 v poslednej reakcii bol 17% (pre oba izoméry).

Záver

Molekula 5 predstavuje chiroptický molekulový prepínač od ktorého očakávame že po spôsobení daného žiarenia zmení geometriu –N=N– čo bude mať vplyv aj na zmenu dihedrálneho uhla binaftylovej jednotky. Takáto zmena môže byť detekovateľná pomocou chiroptických metód. Preto chceme pripravené izoméry študovať pomocou CD spektroskopie.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Caricato M., Sharma A. K., Coluccini C, et al. (2014), *Nanoscale* 6(13), p. 7165
- [2] Takaishi K., Kawamoto M. Muranaka A., et al. (2012) *Org. Lett.* 14(13), p. 3252
- [3] Kicková A., Horváth, B., Kerner L., et al. (2013) *Chem. Pap.* 67(1), p. 101
- [4] Kerner L., Kicková A., Filo J., et al. (2015) *J. Phys. Chem.* 119(23), p. 8588
- [5] Mišicák R. (2011) Diazénové molekulové prepínače na báze binaftyly. (Diplomová práca) Univerzita Komenského v Bratislave
- [6] Brown K. J., Berry M. S., Murdoch J. R. (1985) *J. Org. Chem.* 50(22), p. 4345
- [7] Bulko F. (2022) Atroposelective Suzuki reaction and its tandem with C–H activation on binaphthyl substrates. (Dizertačná práca) Univerzita Komenského v Bratislave
- [8] Ghosh A. K., Shahabi D. (2021) *Tetrahedron Lett.* 63, 152719
- [9] Xiao Z.P., Wang Y. Ch., Du G.Y., et al. (2010) *Synth. Commun.* 40(5), p. 661
- [10] Milcová A. (2020) Makrocyclické diazénové chiroptické prepínače s karbamátovým a acetamidovým mostíkom. (Diplomová práca) Univerzita Komenského v Bratislave
- [11] Reuter R., Hostettler N., Neuburger M., et al. (2009) *Eur. J. Org. Chem.* 2009(32), p. 5647

Dvojkroková derivatizácia karboxylových kyselín kynurenínovej dráhy

Timotej Jankech^{1,2}, Ivana Gerhardtová^{1,2}, Petra Majerová¹, Andrej Kováč¹, Josef Jampílek^{1,2}

¹Neuroimunologický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava, Slovenská republika; timotej.jankech@gmail.com

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Two-step derivatization of carboxylic acids of the kynurenine pathway

Derivatization still has an important role in modern analytical chemistry. It is often used to increase sensitivity of the analytical methods and to improve chromatographic retention of analytes. In this work, a two-step derivatization was introduced and used to derivatize six carboxylic acids occurring in the kynurenine pathway. The two-step derivatization with dansyl chloride and *N*-benzylmethylamine was successfully used and optimized for the derivatization of these very important tryptophan metabolites. Thus, our new derivatization method creates an important basis for further research in this field.

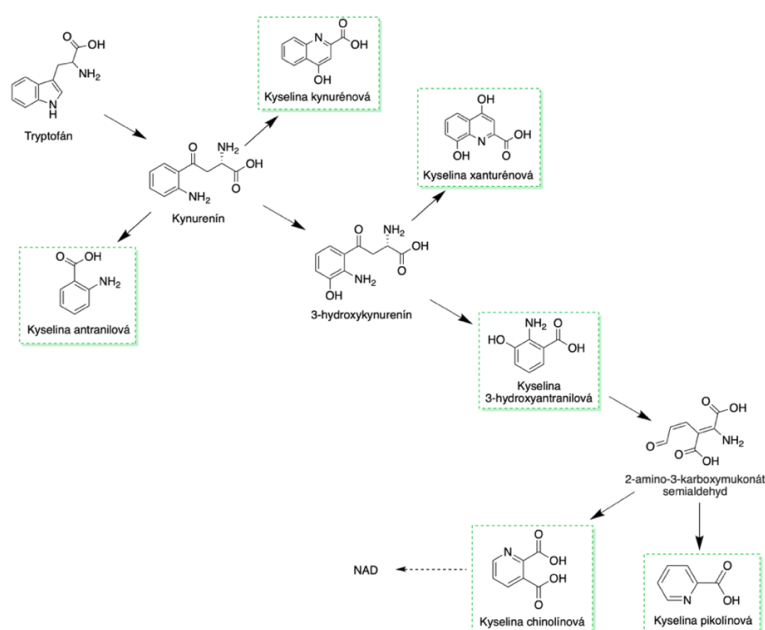
Keywords: carboxylic acids; derivatization; liquid chromatography-mass spectrometry

Úvod a formulácia cieľa

Esenciálna aminokyselina L-tryptofán (TRP) je potrebná nielen na biosyntézu bielkovín, ale funguje aj ako prekursor mnohých biologicky aktívnych látok. U cicavcov prebieha katabolizmus TRP najmä tromi dráhami: kynurenínovou, serotoninovou dráhou a bakteriálnou degradáciou [1, 2]. Kynurenínová dráha (Obr. 1) je hlavnou dráhou metabolizmu TRP, keďže približne 95 % prijatého TRP vstupuje práve do kynurenínovej dráhy a metabolizuje sa na kynurenín (KYN), kyselinu kynurénovú (KA), kyselinu antranilovú (AA), 3-hydroxykynurenín (3-OH KYN), kyselinu 3-hydroxyantranilovú (3-OH AA), kyselinu xanturénovú (XA), kyselinu chinolínovú (QA) a kyselinu pikolínovú (PA). Táto dráha je spojená aj s tvorbou nikotínamidu (NAm) a kyseliny nikotínovej (NA) [1, 3]. Spomedzi vznikajúcich metabolitov v tejto dráhe sú niektoré neuroaktívne [4, 5]. Zmeny hladín kynurenínu, resp. metabolitov v tejto dráhe boli identifikované pri viacerých neurologických a neurodegeneratívnych ochoreniach vrátane Alzheimerovej choroby [3, 6]. KYN je vhodným biomarkerom, pretože jeho produkcia sa zvyšuje napríklad pri Alzheimerovej chorobe a iných ochoreniach. QA vykazuje neurotoxicitu, naopak PA a KA sú neuroprotektívne látky [7, 8].

V súčasnosti sa kladie pomerne veľký dôraz na spoľahlivú, ale najmä citlivú kvantitatívnu analýzu metabolitov (endogénnych zlúčenín), keďže ich hladiny úzko súvisia s diagnostikou, liečbou a reguláciou funkčných porúch buniek alebo ľudských ochorení. Spomedzi metód kvantitatívnej analýzy ide napríklad o kapilárnu elektroforézu (CE), plynovú

chromatografiu (GC) alebo kvapalinovú chromatografiu (LC) v spojení s rôznymi typmi detekcie - napríklad hmotnostne spektrometrickou (MS). Práve LC-MS je vďaka svojim vlastnostiam (rýchlosť analýz, selektivita, účinnosť) najčastejšou voľbou v analýze metabolitov, aj napriek tomu, že vývoj metódy môže byť pomerne náročný vzhľadom na slabú ionizáciu analytov v iónovom zdroji MS, nízku chromatografickú retenciu či ich veľmi nízke koncentračné hladiny. Riešenie pre tieto problémy predstavuje derivatizácia, ktorá spočíva v modifikácii pôvodných chemických štruktúr analytov pomocou derivatizačných činidiel. Takýmto spôsobom možno výrazne zvýšiť účinnosť ionizácie, a taktiež požadovanú chromatografickú retenciu [1, 7, 9 – 12].



Obr. 1. Kynurenínová dráha.

Vyznačené analyty boli predmetom štúdie v rámci experimentálnej časti (upravené podľa [4, 13]).

Cieľom predkladanej štúdie je výber vhodného postupu derivatizácie vybraných metabolitov kynurenínovej dráhy – karboxylových kyselín, ktorý by v budúcnosti mohol byť inkorporovaný do analytického postupu pre stanovenie týchto analytov v rôznych matriciach.

Materiál a metódy

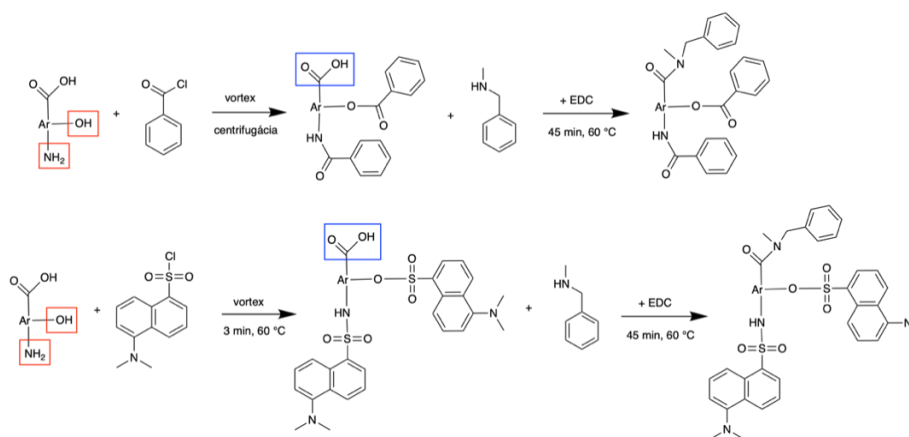
Chemikálie a štandardy

Zo štandardov kyselín QA, AA, 3-OH AA, KA, PA a XA (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemecko) boli pripravené zásobné roztoky individuálne pre každý štandard o koncentrácii 20 µg/ml do ultračistej vody (MPW). Derivatizačné činidlá danzyl chlorid (DnsCl), benzoyl

chlorid (BzCl), *N*-benzylmetylamín (BMA), aktivátor karboxylovej skupiny 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl) karbodiimid (EDC), uhličitan sodný (Na_2CO_3), acetonitril (ACN) a kyselina mravčia (FA) boli zakúpené od Sigma Aldrich. DnsCl, BzCl, BMA boli pripravené v ACN a EDC v ACN:MPW (90:10 v/v) vždy čerstvé pred derivatizáciou.

Dvojkroková derivatizácia karboxylových kyselín

Všeobecné schémy dvojkrokovej derivatizácie karboxylových kyselín sú znázornené na Obr. 2. V prípade použitia BzCl, v prvom kroku bol použitý upravený pôvodný postup [14]: k 50 μl zásobného roztoku kyseliny bolo pridaných 50 μl ACN, 25 μl Na_2CO_3 (100 mM; pH 10) a 25 μl BzCl (2 %). Zmes sa vortexovala po dobu 30 s, centrifugovala 10 min pri 30000 rpm, supernatant sa preniesol do novej eppendorfky a bol odparený dosucha. V druhom kroku derivatizácie bolo k suchému odparku pridaných 12,5 μl MPW, 12,5 μl ACN, 25 μl EDC (1 M) a 50 μl BMA (10 mM). Zmes bola inkubovaná 45 min pri 60 °C, prenesená do vialiek a analyzovaná LC-MS. V prípade použitia DnsCl bol prvý derivatizačný krok optimalizovaný: k 30 μl zásobného roztoku kyseliny sa pridalo 50 μl Na_2CO_3 a 20 μl DnsCl. Zmes sa vortexovala po dobu 30 s, inkubovala 3 min pri 60 °C a následne odparila dosucha. V druhom kroku derivatizácie sa postupovalo rovnako ako v predošlom prípade.



Obr. 2. Všeobecné schémy dvojkrokovej derivatizácie.

Funkčné skupiny zvýraznené **červenou farbou** reagujú v prvom kroku, pričom sa derivatizačné činidlo (v tomto prípade BzCl alebo DnsCl) môže viazať buď na -NH₂, -OH alebo na obe funkčné skupiny. Funkčná skupina zvýraznená **modrou farbou** reaguje s derivatizačným činidlom (BMA) v druhom kroku.

UHPLC-MS a UHPLC-MS/MS analýza

Na všetky chromatografické analýzy bol použitý ultravysokoúčinný kvapalinový chromatograf Waters Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA). Separácie prebiehali na kolóne Acquity UPLC BEH C18 (2,1 × 50 mm; 1,7 μm) s VanGuard predkolónou. Mobilnú

fázu (MF) tvorila 0,1% FA v MPW (A) a ACN (B), ktorej prietok bol 0,5 ml/min, teplota kolóny bola 40 °C a dávkovaný objem vzorky bol 5 µl. Všetky analýzy sa uskutočnili s použitím gradientovej elúcie. MS detekcia analytov sa uskutočnila pomocou trojitého kvadropólu Xevo TQD (Waters, Milford, MA, USA) s ionizáciou elektrosprejom (ESI). Analýzy boli vykonané v základnom MS skene (v rozsahu 70–650 m/z) a MRM móde (multiple reaction monitoring- selektívny záznam jednej alebo viacerých iónových reakcií).

Výsledky a diskusia

V prvej fáze experimentov bola testovaná aj jednokroková derivatizácia karboxylových skupín s BMA. Pri tomto postupe však niektoré kyseliny (AA, 3-OH AA) reagovali veľmi slabo a reakcia XA s BMA neprebehla vôbec, respektíve nevznikal požadovaný derivát. A keďže derivatizačná reakcia by mala byť selektívna, reprodukovateľná, rýchla a najmä kvantitatívna, pristúpilo sa k dvojkrokovej derivatizácii, kde pôvodným zámerom bolo v prvom stupni pomocou BzCl, resp. DnsCl derivatizovať -OH a -NH₂ skupiny, ktoré sú pravdepodobne zodpovedné za zníženú reaktivitu karboxylovej skupiny sledovaných analytov a nebolo ich možné derivatizovať len s použitím BMA.

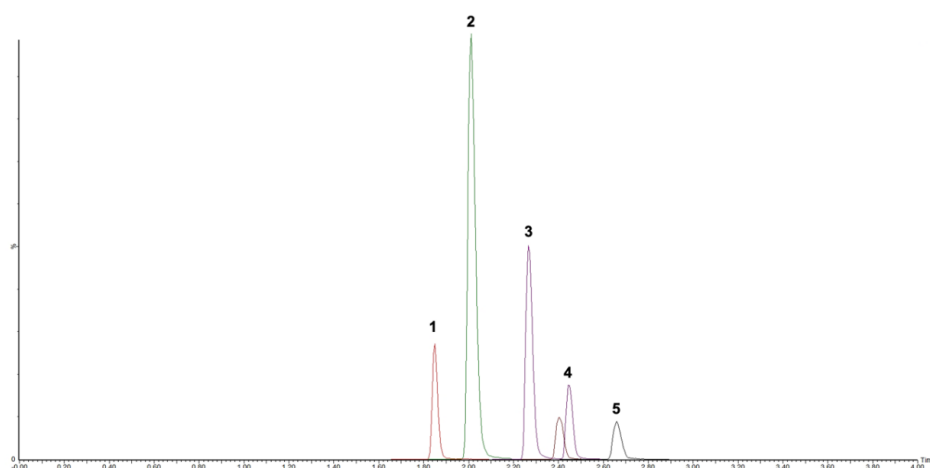
Použitím dvojkrokovej derivatizácie BzCl-BMA už boli pripravené deriváty karboxylových kyselín, avšak s vedomím, že niektoré kyseliny boli derivatizované iba do prvého stupňa – inými slovami – je možné, že benzozylovaná (prípadne danzylovaná) karboxylová kyselina (stále s voľnou karboxylovou skupinou) sa už nebude derivatizovať v druhom kroku s BMA (ako to ilustruje Obr. 2). Okrem toho je pri dvojkrokovej derivatizácii dôležité poznamenať, že kyseliny, ktoré vo svojej molekule obsahujú dve -OH skupiny, prípadne jednu -OH a jednu -NH₂ sa môžu derivatizovať buď do jednej polohy, alebo do oboch, a teda môže vznikať viacero derivátov. Veľmi dôležitým faktorom je kvantitatívnosť reakcie. Pre tento účel bola pripravená séria roztokov o rôznej koncentrácii jednotlivých karboxylových kyselín podrobená BzCl-BMA derivatizácii. Všetky takto pripravené roztoky boli analyzované metódou UPLC-ESI-MS s využitím MRM módu. Vzniknuté deriváty všetkých analytov však vo väčšine prípadov nevykazovali lineárny trend rastu plochy pík v závislosti od zvyšujúcej sa koncentrácie karboxylovej kyseliny, najmä v prípade XA ($R^2 = 0,1794$). To, že reakcia neprebiehala kvantitatívne, mohlo byť spôsobené tým, že vznikalo viacero rôznych derivátov kyselín, ktoré vo svojej molekule obsahujú viac funkčných skupín. Pre túto skutočnosť bol BzCl zamenený za DnsCl v rámci prvého derivatizačného kroku, čo prinieslo zlepšenie v odozvách jednotlivých derivátov (čo znamená lepšiu ionizáciu). Prvý krok derivatizácie s DnsCl bol optimalizovaný (optimálne podmienky priebehu reakcie sú uvedené v časti

Materiál a metódy). Rovnako ako v predošlom prípade, aj pri DnsCl-BMA derivatizácii bola pripravená séria roztokov o rôznej koncentrácii jednotlivých karboxylových kyselín. Všetky takto pripravené roztoky boli analyzované metódou UPLC-ESI-MS s využitím MRM módu, ktorej podrobnosti sú uvedené v Tab. 1.

Tab. 1. Vybrané parametre UPLC-ESI-MS metódy s využitím MRM módu

Analyt	Ión prekurzora [m/z]	Produktový ión [m/z]	Napätie na vstupnom kónuse [V]	Kolízna energia [eV]
QA	374	253 (kvalitatívny) 91 (kvantitatívny)	30	20
AA	371	170 (kvalitatívny) 234 (kvantitatívny)	30	20
3-OH AA	490	369 (kvalitatívny) 198 (kvantitatívny)	30	20
KA	526	170 (kvalitatívny) 260 (kvantitatívny)	30	25
PA	227	91 (kvalitatívny) 119 (kvantitatívny)	30	20
XA	542	170 (kvalitatívny) 261 (kvantitatívny)	30	20

Pri tomto type derivatizačnej reakcie vykazovali všetky deriváty lineárny trend rastu plochy pík v závislosti od zvyšujúcej sa koncentrácie karboxylovej kyseliny, čo nám potvrdilo kvantitatívny priebeh reakcie. Separácia získaných derivátov prebiehala optimalizovanou gradientovou elúciou, pričom celkový čas analýzy bol 6 min. Extrahované iónové chromatogramy vybraných DnsCl-BMA derivátov sú zobrazené na Obr. 3.



Obr. 3. Extrahované iónové chromatogramy vybraných DnsCl-BMA derivátov.

1: QA-BMA; 2: AA-DnsCl; 3: 3-OH AA-DnsCl-BMA; 4: KA-DnsCl-BMA; 5: XA-DnsCl-BMA. Koncentrácia jednotlivých analytov: 300 ng/ml. Popis osí: y = intenzita signálu [%]; x = čas [min].

Takisto ako v práci Tömösi et al. (2020) [15], kde autori využili na derivatizáciu

rovnakých analytov esterifikáciu, sme s využitím uvedeného postupu derivatizácie dosiahli lepšiu retenciu analytov v reverznofázovom (RP) chromatografickom systéme. Výsledky našej štúdie však nemožno priamo porovnať s výsledkami iných autorov, nakoľko rovnaký či podobný postup dvojkrokovej derivatizácie sledovaných analytov doposiaľ publikovaný nebol.

Záver

Štúdia bola venovaná derivatizácii karboxylových kyselín kynurenínovej dráhy. Z diskutovaných skutočností vyplýva, že nemožno použiť jednokrovú derivatizáciu (amidáciu) karboxylovej skupiny, a preto je v prípade potreby esenciálne využiť dvojkrovú derivatizačnú reakciu s použitím DnsCl v prvom kroku. Výsledky získané v prezentovanej štúdii nám vytvárajú sľubný predpoklad pre následné použitie tejto reakcie pre stanovenie sledovaných analytov v rôznych biologických matriciach.

PodĎakovanie

Táto štúdia vznikla na základe finančnej podpory projektu VEGA 2/0129/21.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Zhu W., Stevens A. P., Dettmer K., et al. (2011) *Anal. Bioanal. Chem.* 401(10), p. 3249
- [2] Keszthelyi D., Troost F. J., Masclee A. A. M. (2009) *Neurogastroent Motil.* 21(12), p. 1239
- [3] Piestansky J., Forgacsova A., Olesova D., et al. (2022) *Separations* 9(1), p. 16
- [4] Schwieler L., Trepici A., Krzyzanowski S., et al. (2020) *Bioanalysis* 12(6), p. 379
- [5] Platten M., Nollen E. A. A., Röhrig U. F., et al. (2019) *Nat. Rev. Drug. Discov.* 18(5), p. 379
- [6] Kincses Z. T., Toldi J., Vécsei L. (2010) *J. Cell. Mol. Med.* 14(8), p. 2045
- [7] Karakawa S., Nishimoto R., Harada M., et al. (2019) *Chromatography* 40(3), p. 127
- [8] Dezsí L., Tuka B., Martos D., et al. (2015) *Curr. Alzheimer Res.* 12(5), p. 462
- [9] Zhu Y., Deng P., Zhong D. (2015) *Bioanalysis* 7(19), p. 2557
- [10] Isokawa M., Kanamori T., Funatsu T., et al. (2014) *Bioanalysis* 6(18), p. 2421
- [11] Xu F., Zou L., Liu Y., et al. (2011) *Mass Spectrom. Rev.* 30(6), p. 1143
- [12] Moles E., Marcos J., Imperial S., et al. (2017) *Talanta* 168, p. 130
- [13] Fuertig R., Ceci A., Camus S. M., et al. (2016) *Bioanalysis* 8(18), p. 1903
- [14] Kovac A., Somikova Z., Zilka, N., et al. (2014) *Talanta* 119, p. 284
- [15] Tömösi F., Kecskeméti G., Cseh E. K., et al. (2020) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 185, 113246

Glykány apolipoproteínu C-III ako alternatívny diagnostický biomarker pri diagnostike kolorektálneho karcinómu

Kristína Kianičková¹, Zuzana Pakanová², Filip Květoň², Alena Holazová¹, Peter Baráth², Goran Miljuš³, Olgica Nedić³, Jaroslav Katrlík¹

¹*Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Oddelenie glykobiotechnológie, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika; chemkian@savba.sk*

²*Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Oddelenie glykobiológie, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika*

³*Belehradská univerzita, Inštitút pre aplikáciu jadrovej energie (INEP), Banatska 31b, 11080 Belhrad-Zemun, Srbsko*

Abstract

Glycans of apolipoprotein C-III as alternative diagnostic biomarker in diagnostic of colorectal cancer

The association of many apolipoproteins with CRC was reported, however there are missing studies about the role of serum apolipoprotein C-III in colorectal cancer (CRC) up to this date. The aim of the study was to determine the O-glycoprofile of serum apolipoprotein C-III of CRC patients, that consists of three glycosylated and one aglycosylated structure, and comparing data with healthy individuals. The main goal of this study was focused on correlations between the ratio of its glycoforms and CRC. The results from MALDI-TOF MS analysis showed elevated apolipoprotein C-III sialylation, represented by statistically significant increase in levels of disialylated core 1 type O-glycan in CRC samples. This change in glycan composition could be considered as a potential CRC biomarker, despite it is non-specific, as it can be also an accompanying sign of the other ongoing inflammation. The analysis of apolipoprotein C-III glycoforms by mass spectrometry might be included in the panel of non-invasive diagnostic biomarkers when considering CRC in suspected patients.

Keywords: glycosylation; apolipoprotein C-III; colorectal cancer; mass spectrometry

Úvod a formulácia cieľa

Apolipoproteíny tvoria viazaním sa s lipidmi lipoproteíny, sú teda štruktúrnymi prvkami lipoproteínov a tiež kofaktormi enzýmov. Sú považované za promotérov proliferácie a invazívnosti pri karcinogenéze a participujú tiež na antitumorovej imunite, oxidatívnom strese alebo doručovaní liečiv [1]. Skupina apolipoproteínov pozostáva z 22 členov a väčšina z nich zohráva úlohu pri rakovine [2].

Z publikovaných štúdií vyplýva, že zmenené hladiny apoA-I, apoC-I, apoD, apoE, apoL-VI, apoM a apoJ súvisia s kolorektálnym karcinómom (CRC) [2, 3]. Ako jeden z konkrétnych príkladov možno uviesť potenciál prognostického významu pomeru apoB-I/apoAI pri diagnostike CRC, kde vyššia hodnota tohto pomeru súvisela s kratšou dobou prežitia [1]. Expresia apoC-III je takmer dvakrát nižšia pri pacientoch s rakovinou žalúdka v porovnaní so zdravými kontrolami [4]. Doteraz nebola skúmaná expresia apolipoproteínu C-III (apoC-III) v súvislosti s pacientami s CRC.

ApoC-III pozostáva zo 79 aminokyselín a obsahuje jeden core 1 O-glykán na Thr-74

[5]. Z hľadiska sialylácie možno rozlíšiť tri hlavné glykoformy: nesialovanú apoC-III₀, monosialovanú apoC-III₁ a disialovanú apoC-III₂ formu; existujú však aj nesialované glykovarianty ako napríklad aglykozylovaný apoC-III₀₀ [6]. Túto izoformu možno stanoviť metódami hmotnostnej spektrometrie, pomocou tradičnej metódy izoelektrického fokusovania ju však nemožno stanoviť.

Aplikácia laserovej desorpcie a ionizácie podporenej maticou (MALDI) a elektrosprejovej ionizácie (ESI) v hmotnostnej spektrometrii (MS) pre stanovenie apoC-III bola popísaná a aplikovaná Bondarenkom a kol. [7]. Analýza intaktného apoC-III nesúceho O-glykány ho predurčuje ako vhodného kandidáta pre priamu analýzu pomocou MS na základe jeho pomerne nízkej molekulovej hmotnosti bez potreby tradičných chemických a enzymatických úprav využívaných v proteomike. Cieľom práce bolo stanoviť glykoprofíl apoC-III v patientskych vzorkách s diagnózou CRC a porovnať získané dáta so skupinou zdravých jedincov za účelom štatistického porovnania dát a sledovania prípadných korelácií v pomeroch zistených glykoforiem apoC-III medzi týmito skupinami.

Materiál a metódy

Vzorky séra v prípade CRC boli zbierané od pacientov, ktorí boli sledovaní v Klinickom centre „Bežanijska kosa“ (n = 42, vek 34-73 rokov). Pacientom bol diagnostikovaný CRC použitím kolonoskopie, transrektálneho ultrazvuku a abdominálneho CT; určený bol taktiež stupeň diferenciácie karcinómu. Kontrolná skupina vzoriek pozostávala zo sér zdravých jedincov (n = 40, vek 35-74 rokov). Vzorky boli vo všetkých prípadoch odoberané ráno po 12 hodinách pôstu pred odberom.

Analýza pomocou hmotnostnej spektrometrie bola vykonaná metódou MALDI TOF MS, použitým typom detektora bol hmotnostný analyzátor doby letu (TOF). Pre MS analýzu bolo vstupným množstvom 10 µL séra, ktoré bolo inkubované s 250 µL 200 mM peroxidu vodíka pri 30 °C počas 30 minút s prídavkom 0,1 % kyseliny trifluóroctovej (TFA), aby bola dosiahnutá úplná oxidácia metionínov v proteínovej sekvencii a zjednotené signály v MS spektrách. K obohateniu apoC-III bola použitá extrakcia tuhou fázou: Strata C8, 96-jamková platňa, 25 mg náplne/jamka. Platňa bola premytá acetonitrilom (ACN) a ekvilibrovaná 0,1 % TFA. Po nadávkovaní vzorky boli jamky postupne premyté 0,1 % TFA a 30 % ACN + 0,1 % TFA (TA30). Obohatená frakcia apoC-III bola eluovaná 70 % ACN + 0,1 % TFA (TA70). 1 µL eluátu bol naspotovaný na *AnchorChip* MALDI platňu s prídavkom 1 µL 2 % TFA pre zlepšenie ionizácie a 1 µL matrice pozostávajúcej zo zmesi 20 mg/mL 2,5-dihydroxyacetofenónu v ACN a 18 mg/mL hydrogécitránu diamónneho v etanole

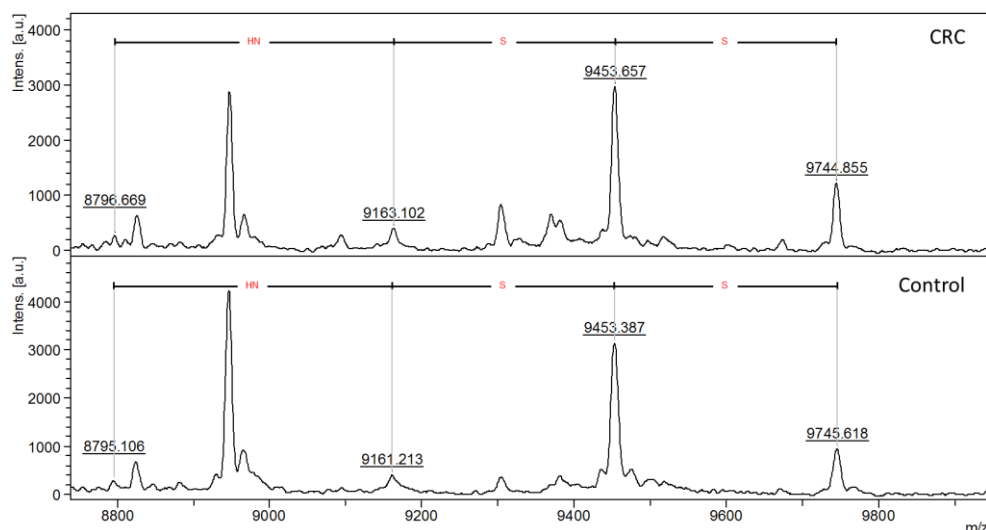
(DHAP:DAC, pomer 3:1). Každá vzorka bola spotovaná v duplikáte. Spektra boli získané v lineárnom TOF móde pozitívnych iónov pomocou prístroja *UltrafleXtreme II MALDI mass spectrometer* (*Bruker Daltonics, Nemecko*). Získané MS dáta boli spracované manuálne, pomocou softwaru *flexAnalysis 3.4* (*Bruker Daltonics, Nemecko*) a porovnané s dostupnou literatúrou [8, 9].

Intenzity aglykozylovanej (m/z 8797), nesialovanej (m/z 9162), monosialovanej (m/z 9453) a disialovanej glykoformy apoC-III (m/z 9744) boli extrahované zo získaných dát pomocou softvérového programu *flexAnalysis*. Jednotlivé glykoformy boli kvantifikované pomocou pomerov relatívnej intenzity pík. Pomocou softvérového programu *Microsoft Excel* boli vypočítané priemerné hodnoty, t-testy a štandardné odchýlky. Štatistická významnosť spracovaných dát bola stanovená pomocou troch hladín významnosti t-testu: $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$ a $p \leq 0,005$.

Štúdia bola schválená Etickou komisiou Klinického centra „Bežanijska kosa“ (Schválenie č. 3562) podľa Helsinskej deklarácie. Všetci participanti udelili pre štúdiu informovaný súhlas.

Výsledky a diskusia

Výsledky MS analýzy poukazujú na znížené množstvo aglykozylovanej, nesialovanej a monosialovanej apoC-III glykoformy a významné zvýšenie disialovanej apoC-III glykoformy v prípade CRC vzoriek v porovnaní s kontrolami.



Obr. 1. Reprezentatívne MS spektrá vybranej CRC a kontrolnej vzorky zobrazujúce všeobecnú distribúciu apoC-III glykoform: aglykozylovaná (m/z 8796), nesialylovaná (m/z 9163), monosialylovaná (m/z 9453) a disialylovaná (m/z 9745). H – hexóza, N – N-acetylglukóзамín, S – kyselina sialová. Dáta získané v lineárnom móde s rozlíšením <2500 .

Reprezentatívne MS spektrá séra CRC pacienta a kontrolnej vzorky možno vidieť na Obr. 1. Štatistická významnosť medzi CRC a kontrolnými vzorkami bola vypočítaná pre 3 zo 4 glykoforiem apoC-III, menovite šlo o aglykozylovanú ($p = 0,006$), monosialovanú ($p = 0,020$) a disialovanú ($p = 0,002$) apoC-III formu, Tab. 1. Zmenená sialylácia v prípade CRC vzoriek je štatisticky najvýznamnejšia v prípade plne sialovanej (disialylovanej) O-glykánovej štruktúry, pričom daná štruktúra mala vyššie zastúpenie v CRC vzorkách. Doplnkom tejto informácie je zníženie všetkých apoC-III prekursorov danej štruktúry: aglykozylovanej, nesialovanej a monosialovanej glykoformy apoC-III.

Tab. 1. Relatívna odozva pre štyri glykoformy apoC-III v skupine kontrolných a CRC vzoriek spolu s hodnotou smerodajnej odchýlky, pomer relatívnej odozvy CRC a kontrolných vzoriek a štatistická evaluácia rozdielu vyjadrená pomocou p hodnoty.

Glykoforma apoC-III	Relatívna odozva, kontroly (n = 40) (v %, $\pm$ SD)	Relatívna odozva, CRC vzorky (n = 42) (v %, $\pm$ SD)	Pomer relatívnej odozvy CRC / kontrol	p hodnota ***$p \leq 0,005$ **$p \leq 0,01$ *$p \leq 0,05$
Aglykozylovaná (apoC-III ₀₀)	7,87 $\pm$ 2,80	6,16 $\pm$ 2,73	0,78	0,006**
Nesialylovaná (apoC-III ₀)	9,48 $\pm$ 1,72	9,18 $\pm$ 1,71	0,97	0,436
Monosialylovaná (apoC-III ₁)	61,99 $\pm$ 6,58	58,55 $\pm$ 6,50	0,94	0,020*
Disialylovaná (apoC-III ₂)	20,66 $\pm$ 7,30	26,10 $\pm$ 8,08	1,26	0,002***

Záver

Hoci príčiny a mechanizmus vzniku pozorovanej hypersialylácie apoC-III pri CRC nie sú jasné a môžu byť sekundárnou príčinou, napríklad ako sprievodný znak prebiehajúceho zápalu v tele, analýza glykoforiem apoC-III môže byť užitočným nástrojom v paneli neinvazívnych diagnostických testov pri posudzovaní CRC pri suspektných pacientoch. Stanovenie sialylácie jednotlivých glykoforiem apoC-III tiež nesie značný potenciál pre ďalšie klinické aplikácie, napríklad monitorovanie ochorenia. Vďaka svojej robustnosti, rýchlosti merania a citlivosti je MALDI TOF MS metódou vhodnou pre tento účel. Využitie analýzy glykoforiem apoC-III v 96-jamkovom formáte predurčuje túto metódu ako vhodnú pre vysokovýkonnú diagnostiku, čo je v dnešnej dobe jedným z hlavných cieľov v diagnostike rakovinových ochorení.

PodĎakovanie

Táto publikácia vznikla vĎaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: CEMBAM - Centrum medicínskeho bioaditívneho výskumu a výroby, ITMS: 313011V358, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Yang D. D., Chen Z. H., Wang D. S., et al. (2020) J. Canc. 11(5), p. 1063
- [2] Ren L., Yi J., Li W. et al. (2019) Canc. Med. 8(16) p. 7032
- [3] Zhang Y., Zheng L. (2020) Transl. Cancer Res. 9(5), p. 3712
- [4] Wang M., Wang J., Jiang H. (2019) Oncol. Lett. 17(3), p.3227
- [5] Wada Y., Kadoya M., Okamoto N. (2012) Glycobiology, 22(8), p. 1140
- [6] Demus D., Naber A., Dotz V. et al. (2021) Front. Chem. 9, p. 678883
- [7] Bondarenko P. V., Cockrill S. L., Watkins L. K., et al. (1999) J. Lipid Res. 40(3), p. 543
- [8] Wada Y. (2016) Glycoconj. J. 33(3), p. 297
- [9] UniProt Consortium. (2021) Nucleic Acids Res. 49(D1), p. D480

Čo odkryla analýza medov a medových pien?

Matej Kmec

*Katolícka spojená škola sv. Mikuláša, Duklianska 16, 08001, Prešov, Slovenská republika;
matejkmec10@gmail.com*

Abstract

What did the analysis of honeys and honey foams reveal?

The goal of this work was to analyze honey and honey foam, as well as individual honeys. Honey with foam was analyzed by total protein content, representation of individual proteins, determination of glucose oxidase activity. All honeys were measured: the amount of minerals, vitamin C, water and sugars, conductivity, active pH. After the implementation of our project, we conclude that honey foam cannot compete with honey, because it has reduced beneficial effects for the body, therefore it is not right to buy such foam at a high price, but it is not right to get rid of this foam either. We can also state that we do not recommend using low-quality honey that does not come from regional beekeepers, because such honey does not have beneficial effects on the body. The most appropriate way is to buy honey directly from a certified regional beekeeper.

Keywords: *honey; foam; proteins; glucose oxidase activity; low-quality; beneficial effect*

Úvod a formulácia cieľa

Aj včelie produkty podliehajú módnym trendom. V posledných rokoch sa v Spojených štátoch ale aj v krajinách na východ od Slovenska stávalo trendom predaj medovej peny sa vysoké ceny, pričom sa tento trend dostal aj na Slovensko. Pri spracovaní medu sa na povrchu vytvorí pena, ktorá sa v predáva za vysokú cenu, avšak nie je potvrdené, že obsahuje výrazne vyššie kladné charakteristické znaky oproti samotnému medu. Tí, ktorí predávali medovú penu sa odvolávali na zvýšené množstvo proteínov v medoch, pričom to nebolo potvrdené výskumnom.

Záujem o skúmanie medov prehlbuje aj to, že v našej rodine už dlhodobo chováme väčšie množstvo včelích rodín. Definíciu medu podľa slovenskej legislatívy stanovuje Vyhláška č. 41/2012 Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky o mede, kde je med definovaný ako „prírodná sladká látka produkovaná včelou medonosnou (*Apis mellifera*) z nektáru rastlín, výlučkov živých častí rastlín alebo výlučkov hmyzu cicajúceho živé časti rastlín, ktorý včely zbierajú, pretvárajú a obohacujú vlastnými špecifickými látkami, ukládajú, zahusťujú, uskladňujú a ponechávajú v plástoch, aby vyzrel“ [1].

Uvádza sa, že na 1 kg medu je potrebné, aby včela zhromaždila nektár alebo medovicu z najmenej troch miliónov kvetov. Z rastlín je včelami zbieraný buď nektár alebo medovica. Nektár je prírodná sladká šťava vylučovaná žľaznatým pletivom rastliny. Med sa vo väčšine

krajín sveta konzumuje najčastejšie v prirodzenom stave, tak, ako je produkováný včelami. Keďže med je považovaný za kvalitný doplnok výživy a sú mu pripisované aj liečivé účinky, svoje uplatnenie nachádza aj ako prídavok do iných výrobkov, kde zvyšuje ich kvalitu a trhovú hodnotu [2].

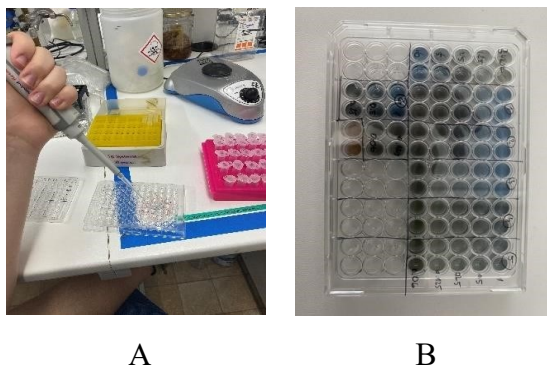
Cieľom práce bolo, zistiť pomocou analýzy vybraných charakteristických znakov korelácie medzi jednotlivými druhmi medov z východného Slovenska, ako aj porovnať domáce medy a medy z obchodných reťazcov. Charakterizovať rozdiely medzi medom a medovou penou, a to v celkovom obsahu proteínov, zastúpením jednotlivých proteínov ako aj stanovením enzýmovej aktivity včelieho enzýmu glukózo-oxidáza, zodpovedného za antibakteriálnu aktivitu medu, tým zistiť či má aj medová pena telu prospešné účinky.

Materiál a metódy

V praktickej časti projektu, čiže zisťovaním korelácií medzi jednotlivými druhmi medov a medovej peny, sme laboratóriách spolu vykonali 3 experimenty. Analýza proteínového obsahu (Bradfordová metóda a SDS-PAGE gély), stanovenie enzýmovej aktivity GOX bolo prevedené v laboratóriu Ústavu molekulárnej biológie SAV, v. v. i. v Bratislave. Týmto experimentmi sme chceli zistiť či je medová pena kvalitnejšia ako samotný med.

Pri 9 medoch sa na povrchu vyskytovala aj medová pena, kde sme skúmali aj ju. Osem medov bolo od včelárov z regionálnej produkcie, z okresov Prešov, Bardejov, Sabinov a Stropkov a 1 med bol kúpený z obchodného reťazca. Vzorky medov boli produkované počas minuloročnej včelárskej sezóny v mesiacoch jún až august 2022.

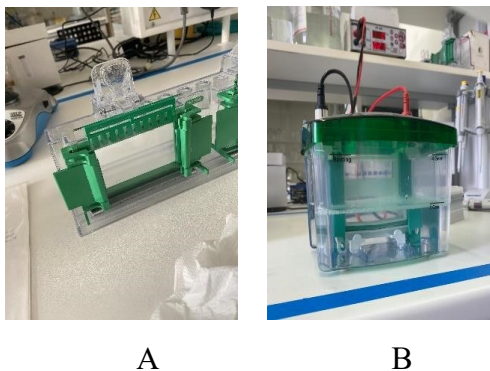
Množstvo proteínov v mede a pene sme stanovili pomocou Bradfordovej metódy [3]. Na začiatku sme navážili 0,5 g medu a boli pripravené 50% roztoky medu v borát-fosfátovom *purfe* (PBS). Tie boli následne zriedené na 1% roztoky, tak že do 784 μ l PBS bolo napipetovaných 16 μ l. Potom nasledovali 3 riedenia na 0,5%, 0,25%, 0,125%. Po nariadení bolo množstva 150 μ l napipetované do 96-jamkovej platničky. Následne bol pridaný Bradfordový roztok v objeme 150 μ l. Takto pripravené vzorky boli vložené do tmy na 5 min. V poslednom kroku boli vložené do prístroja, pričom boli merané roztoky medov a medových pien pri absorbancoch 595 nm.



Obr. 1. A - Príprava 50% roztoku, B - Platnička pripravená na meranie

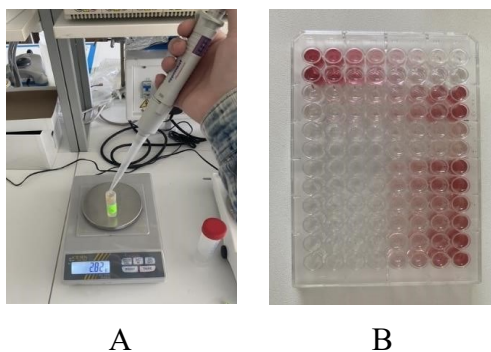
Túto metódu sme využili na stanovenie jednotlivých druhov proteínov v mede a medovej pene. Pripravili sme vzorky 50% roztoky medu a peny v MilliQ. Do 15 μ l roztoku sme pridali 5 μ l farbiva a 0,5 μ l mercaptoetanolu. Tieto roztoky boli následne zahriate na 100°C po dobu 5 min. Potom boli roztoky premiešane. Na gély sme pipetovali 15,5 μ l vzorky.

Následne boli elektroforezované, na začiatku pri napätí 40V po dobu 30 min, potom sme zvýšili napätie na 100V po dobu 3 hodiny. Po odpojení z elektroforézy boli vložené do farbiaceho roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250 na 1 hod. Posledným krokom bolo vloženie do odfarbovacieho roztoku do nasledujúceho dňa.



Obr. 2. A - Príprava aparatury, B - Proces elektroforézy

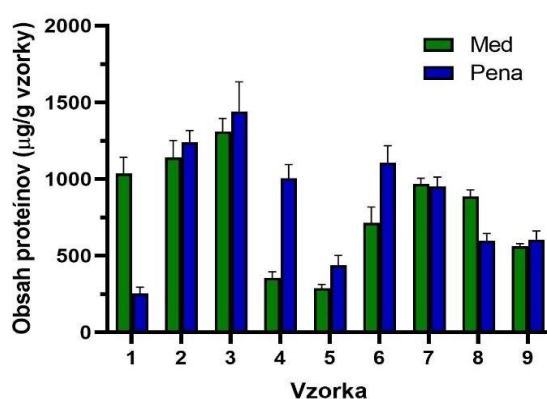
Aktivita enzýmu glukózo-oxidáza (GOX) v mede a pene bola stanovená pomocou (GOX assay kit). Založenej na katalýze oxidácie β -D-glukózy na D-glukono- δ -laktón pri tejto reakcii sa zároveň uvoľňuje H_2O_2 . Navážok 0,4 g medu sme rozpustili v PBS, tak aby sme pripravili 50% roztok medu. Z 50% roztoku medu sa v pomere 1:25 pripravil 2% roztok medu a z neho následne 1% roztok a nižšie, čiže 0,5%, 0,25%. Pripravené vzorky medov sme naniesli na platničku a pridali sme farbiaci roztok. Reakcia prebiehala po dobu od 10 do 30 min a absorbancia sa merala pri vlnovej dĺžke 595 nm.



Obr. 3. A - Príprava 50% roztoku, B - Platnička pripravená na meranie

Výsledky a diskusia

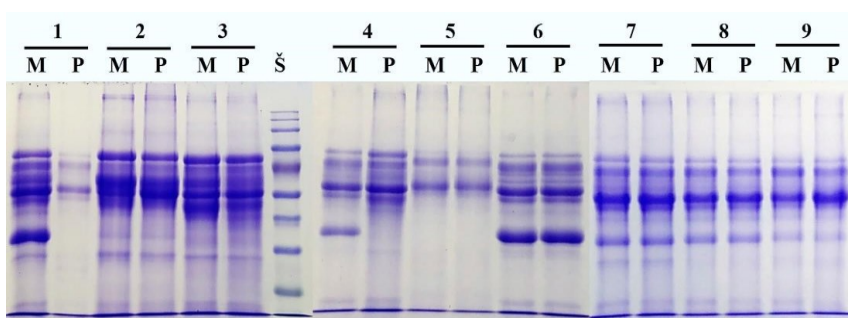
Množstvo proteínov v mede a pene sme skúmali pomocou Bradfordovej metódy. Zistili sme, že v mede a medovej pene je približne rovnaké množstvo proteínov, čím sa nám nepotvrdila hypotéza, že by mala byť vyššia ako v medoch. Iba pri niektorých vzorkách bolo množstvo proteínov mierne vyššie. Mierne vyššie množstvo bolo zaznamenané pri vzorkách č. 2, 3, 4, 5 a 6. Priemerná hodnota proteínov bola 750 $\mu\text{g/g}$. Najhoršie výsledky mal med kupovaný z obchodu, mal iba 250 $\mu\text{g/g}$ proteínov, čo je o 3-krát menej ako priemerná hodnota proteínov. Najvyššie množstvo má vzorka č. 3, v ktorej je množstvo proteínov v pene 1400 $\mu\text{g/g}$. Tieto hodnoty sú v priemere, ktoré uvádza literatúra. Zistili sme, že je nie korelácia medzi medovicovými a kvetovými medmi. Pri pene vzorka 1 je zaznamenaný výrazný pokles, spôsobený denaturáciou peny, preto túto vzorku nepovažujeme za smerodajnú.



Obr. 4. Obsahu proteínov v medoch a penách

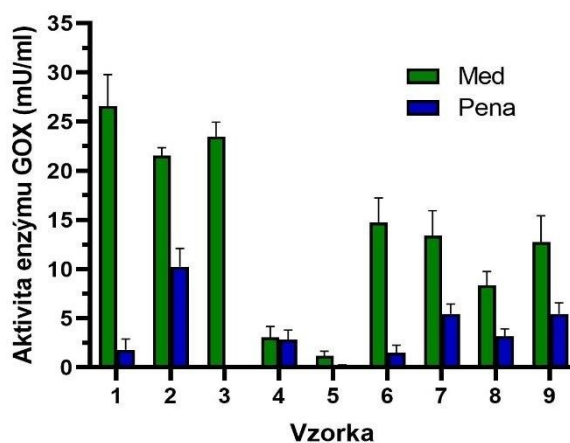
Meraním elektroforézy sme zistili druhy proteínov v medoch a penách. Zistili sme, že výsledky sú porovnateľné s predchádzajúcim experimentom. Najviac druhov proteínov sa

nachádzalo v vzorkách č. 2. a 3. Najmenej v kupovanej vzorke č. 5. Pri každej vzorke je vidieť zastúpenie dominantného včelieho proteínu. Výraznejšie sa odlišuje vzorka č. 1. u tejto vzorky došlo k denaturácii proteínov vo vyššej miere. Vzorka č. 6. má výrazne zastúpený proteín rastlinného pôvodu, podľa tohto proteínu vieme med zaradiť medzi repkové medy. Pri medoch z neskoršej znášky sa už nenachádza rastlinný proteín z repky.



Obr. 5. Celkové porovnanie proteínových profilov medov a pien metódou SDS-PAGE

Aktivitu enzýmu sme určili pomocou GOX assay kit. Katalytickým pôsobením enzýmu GOX vzniká H_2O_2 z glukózy a O_2 . Vďaka vzniku H_2O_2 tento enzým spôsobuje antibakteriálnosť medu. Zistili sme, že medy mali približne 3-krát vyššiu aktivitu enzýmu oproti pene. Viac ako 3-krát vyššiu aktivitu enzýmu sme zaznamenali pri vzorkách č. 1, 5 a 6. Pričom pri kupovanej vzorke č. 5 bolo nameraných pri mede iba 1,1 mU/ml, čo je oproti priemeru ostatných medov, čiže 15,28 mU/ml až 15-krát menej. U vzorky č. 1, kde enzýmová aktivita medu patrila medzi najvyššie namerané a na druhej strane, hodnoty aktivity enzýmu u medovej peny u uvedenej vzorky najnižšie namerané hodnoty. Pričom ešte horšie dopadla pena tohto medu, pri ktorej sme namerali takmer nulovú aktivitu enzýmu. Priemerná aktivita pien bola 3,7 mU/ml, čo je približne 4-krát menej. Pri vzorke č. 3 nebola aktivita u peny meraná.



Obr. 6. Aktivita enzýmu glukózo-oxidáza v mede a pene

Záver

V tejto práci sme zistili, že priemerný obsah proteínov testovaných medov a ich medových pien bol rovnaký. Priemerne 4-násobný pokles aktivity enzýmu GOX bol zaznamenaný u medovej peny. Čím vzorka medu mala vyšší obsah proteínov, tým bola vyššia aktivita enzýmu GOX. Najnižší obsah proteínov a zároveň aj najnižšiu GOX sme zaznamenali v mede zakúpeného z obchodu. V priemere mal tento med 3-krát nižšie množstvo proteínov v takmer nulovú aktivitu enzýmu GOX. Proteínový profil vzoriek, analyzovaný na SDS-PAGE gély, bol porovnateľný medzi jednotlivými vzorkami medu a príslušnej medovej peny.

Predpoklad, že medová pena obsahuje vyšší obsah proteínov, sme vyvrátili. Vzorky medovej peny vykazujú výrazne nižšiu aktivitu enzýmu GOX, čo naznačuje nižšiu biologickú účinnosť medovej peny oproti medu. Vďaka tomu, že analýza medu a medovej zaujala aj členov Slovenského zväzu včelárov, bola analýza publikovaná vo včelárskom mesačníku Včelár (v mesiaci december č. 12/2022), formou článku, aby sa naše zistenia dostali do širokej komunity včelárov, ale aj ostatných čitateľov a konzumentov medov.

V ďalšej fáze projektu by sme chceli naďalej pokračovať s analýzami medov. Zamerať by sme sa chceli na biologické vlastnosti medov.

PodĎakovanie

Týmto sa chcem poďakovať RNDr. Miriam Feretovej za pomoc pri koordinácii a realizácii projektu, ďalej Ing. Jurajovi Majtánovi, DrSc. a Mgr. Marcele Bučekovej, PhD., z Laboratória apidológie a apiterapie Ústavu molekulárnej biológie SAV, v. v. i. v Bratislave za pomoc pri realizácii praktickej časti na vzorkách medoch a pien v priestoroch ich laboratória.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Vyhláška Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky č. 41/2012 Z. z. o mede
- [2] Kukurová, K., et al. (2004) Bulletin potravinárskeho výskumu (Bulletin of Food Research) 43 (3-4), p. 201
- [3] Nukleové kyseliny a proteíny [Citované: 22. marca 2023] <https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/biochemie/Dokumenty/Materialy_k_vyuze/1_Stanoveni_proteinu.pdf>

Identifikácia skupiny cyklitolov v kvetoch *Magnolia soulangeana* hmotnostnou spektrometriou

Mária Kopáčová^{1,2}, Vladimír Pätoprstý¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; kopacova8@uniba.sk

²Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Analytické oddelenie, Dúbravská cesta 9, 845 38, Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Identification of a group of cyclitols in flowers of *Magnolia soulangeana* by mass spectrometry

Inositols, the most widespread cyclitols in eucaryotic cells with their methyl ether derivatives as plant secondary metabolites have numerous pharmaceutical properties and are widely distributed in the plants. This work deals with the identification of inositols in the flowers of *Magnolia soulangeana* by mass spectrometry. Gas chromatography was used to separate inositols on polar column SP-2330 after derivatization. In the flowers of *Magnolia soulangeana* 2 methyl ether inositols and 2 inositols have been identified with their relative percentages of the peak area: D-pinitol (84,33 %), chiro-inozitol (0,71 %), ononitol (2,73 %), myo-inozitol (12,22 %). The diverse content of inositols makes the most commonly cultivated species *Magnolia soulangeana* an exceptional species with potential healing effects, as well as the most well-known *Magnolia officinalis*, known for its bioactive neolignans.

Keywords: inositols; *Magnolia soulangeana*; GC; mass spectrometry; identification

Úvod a formulácia cieľa

Najrozšírenejšie cyklitoly v eukaryotických bunkách sú inozitoly, ktoré majú 6-uhlíkatú cyklickú štruktúru so 6 hydroxylovými skupinami. Inozitoly existujú v 9 možných stereoizoméroch. V prírode sa vyskytuje päť z nich, myo-, scyllo-, mucu, neo- a D-chiro-inozitol, kým ostatné štyri možné izoméry sú odvodené z myo-inozitolu (L-chiro-, allo-, epi- a cis-inozitol). Hmotnostná spektrometria je najčastejšie používanou metódou pri detekcii cyklitolov, pretože ponúka vysokú citlivosť, selektivitu a univerzálnosť. Cyklitoly sa pred GC separáciou upravujú na prchavejšie deriváty, zvyčajne trimetylsilyláciou. GC-MS metóda bola použitá napr. pri identifikácii cyklitolov v mrkve, čerstvých ovocných šťavách, mede [1].

V prírode sa najviac vyskytuje myo-inozitol. Ako súčasť eukaryotických buniek tvorí štruktúrny základ pre množstvo sekundárnych látok a je dôležitou zložkou stavebných lipidov (fosfatidylinozitol) PI a ich rôznych fosfátov, fosfatidylinozitol fosfátových lipidov PIP. Inozitoly sa vyskytujú v prírode ako čisté zlúčeniny alebo ako ich deriváty [2].

Metyléter deriváty inozitolu ako rastlinné sekundárne metabolity sa priamo nezúčastňujú normálneho rastu, ale majú významnú úlohu v obrane proti nepriaznivým podmienkam prostredia. Medzi nimi rozlišujeme 5-O-metyl-myo-inozitol (*sekvojitol*), 1-O-metyl-myo-inozitol (*bornezitol*), 4-O-metyl-myo-inozitol (*ononitol*), 5-O-metyl-allo-inozitol

(*brahol*), di-O-metyl-(+)-chiro-inozitol (*pinpollitol*) a 1L-2-O-metyl-chiro-inozitol (*L-quebrachitol*). 3-O-metyl-D-chiro-inozitol (*D-pinitol*) je najrozšírenejší inozitol éter v rastlinách [3].

Inozitoly sa podieľajú na prenose niekoľkých endokrinných signálov, vrátane inzulínu, hormónov štítnej žľazy, gonadotropínov, lipidov s aktivitou podobnou hormónom (ako prostaglandíny) a mnohých ďalších endokrinných systémov [4]. Protizápalové vlastnosti cyklitolov pomáhajú redukovať rozvoj metabolických porúch, ako je cukrovka, hypertenzia a tiež aterosklerózy. D-pinitol, D-chiro-inozitol a sekvojitol má aj inzulín-napodobujúce účinky. Myo-inozitol spolu s D-chiro-inozitolom dokáže zlepšiť vývoj kostí a minerálnu hustotu kostí, čím potláčajú osteoklastogenézu alebo môžu zlepšiť plodnosť u žien so syndrómom polycystických vaječníkov (PCOS). Myo-inozitol a ostatné cyklitoly majú aj antioxidačné, protizápalové a protirakovinové vlastnosti [5, 6].

Magnólia Soulangeova (*Magnolia soulangeana*) je asi najviac pestovaným druhom spomedzi mnohých druhov magnólií. Napriek tomu, že najznámejšia *Magnolia officinalis* je využívaná v tradičnej čínskej medicíne pre svoje bioaktívne neolignany, našim cieľom bolo identifikovať iné prospešné fytochemikálie, inozitoly, vo viac dostupnom druhu, *Magnolia soulangeana*, čím by sa mohla stať ešte zaujímavejším, podobne využiteľným druhom magnólie.

Materiál a metódy

Kvety magnólie Soulangeovej (*Magnolia soulangeana*) boli lyofilizované pre zachovanie obsahu látok a po podrvení boli kvety extrahované v metanole. Extrakt bol homogenizovaný 30 min pri laboratórnej teplote ultrazvukovým homogenizátorom s pulzom 10 s x 1 s (Bandelin Sonopuls HD 3100), aby bol lepší výtťažok. Po 5 min vortexovaní (IKA Vortex Genius 3) a 5 min centrifugácii (Heraeus PICO 17 Centrifuge) sa odobratý 1 ml nechal odpariť. Vzorka sa pred analýzou GC-MS derivatizovala zásaditou acetyláciou pridaním 50 µl pyridínu a 50 µl acetanhydridu v termobloku (Block heater SBH130D STUART) 1 hod pri 80 °C. Po acetylácii sa nechala vzorka odpariť do sucha a rozpustila v acetonitrile.

Vzorky boli analyzované plynovým chromatografom v spojení s hmotnostným detektorom GC-MS (Trace GC Ultra Thermo Scientific - TSQ Quantum XLS) s použitím kremennej kapilárnej kolóny SP-2330 (30 m x 0.25 mm x 0.2 µm) a teplotným gradientom: 180 °C (4 min) – 20 °C/min – 230 °C – 2 °C/min – 250 °C (10 min). Tieto podmienky boli optimalizované a teplotný program dosahuje najlepšiu separáciu. Prietok hélia bol 0,6 ml/min, teplota iónového zdroja a dávkovača bola 200 °C a 240 °C. Použitá bola elektrónová ionizácia

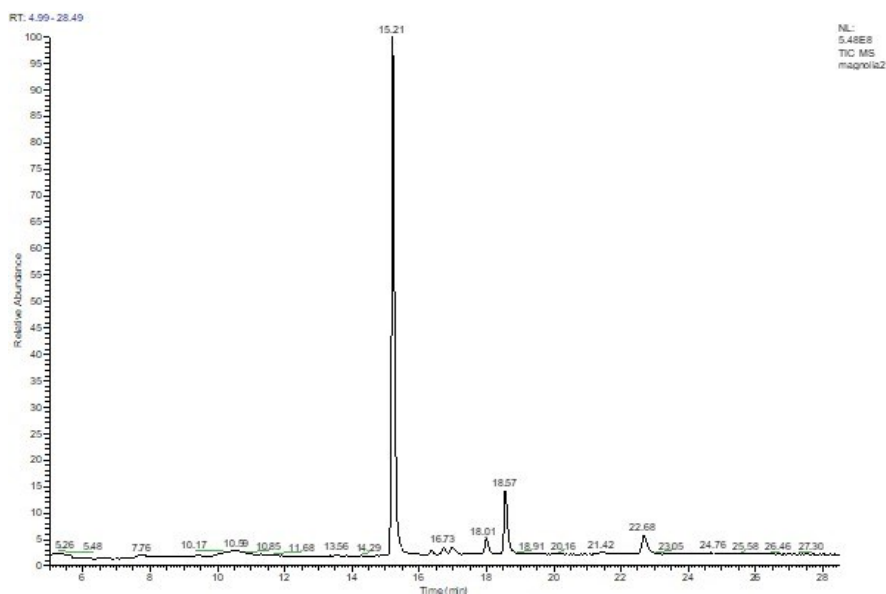
(70 eV) a kvadrupólový analyzátor pracoval v skenovacom režime v hmotnostnom rozsahu 40-450 m/z. Chemikálie LC-MS čistoty, použité na extrakciu, prípravu a analýzy vzoriek, ako aj štandardov, boli získané od firiem VWR Chemicals (Poľsko), Honeywell Chromasolv (Nemecko). Štandardy inozitolov (D-ononitol, sekvojitol, D-pinitol, D-chiro-, allo-, epi-, neo-, scyllo-, mucu-, myo-inozitol) boli zakúpené od firiem Carbosynth (Spojené kráľovstvo), Sigma-Aldrich (Švajčiarsko).

Výsledky a diskusia

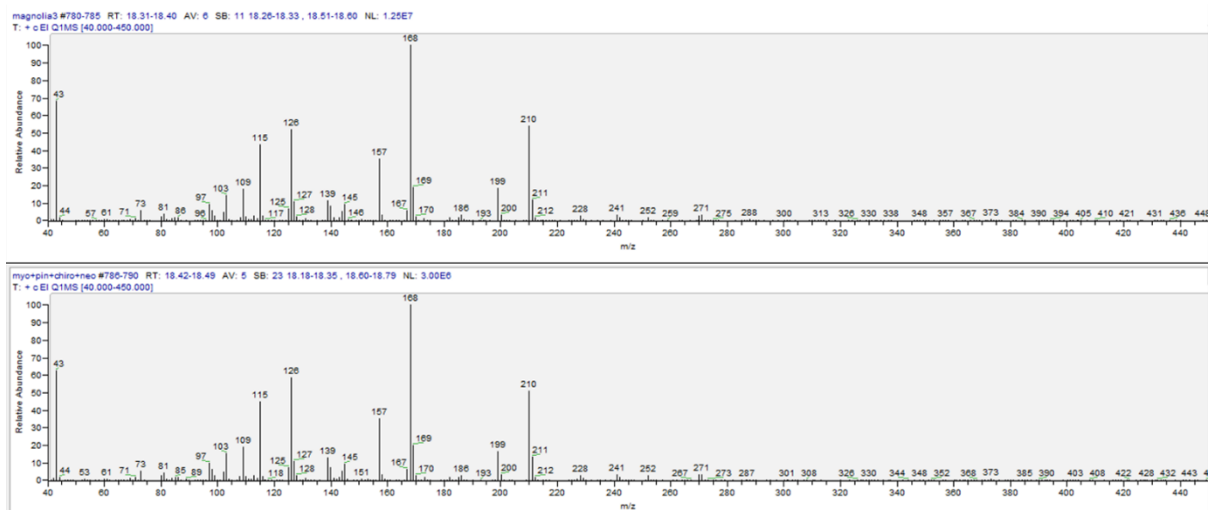
Analýzou extraktu kvetov rastliny *Magnolia soulangeana* plynovou chromatografiou na polárnej kolóne SP-2330 sa získal chromatogram eluovaných inozitolov. V študovanej rastline boli identifikované 2 inozitoly a 2 metyléter inozitoly, ktoré sa pravdepodobne nachádzajú v rastline vo voľnej forme (Obr. 1).

V analyzovanom extrakte kvetov boli identifikované aj acetylované hexózy (16,73 min a 16,97 min), ale ani pomalý teplotný gradient 2 °C/min z teploty 230 °C na 250 °C nebol schopný zabezpečiť ich dostatočnú separáciu. Voľné sacharidy však neboli cieľom našej štúdie (Obr. 1).

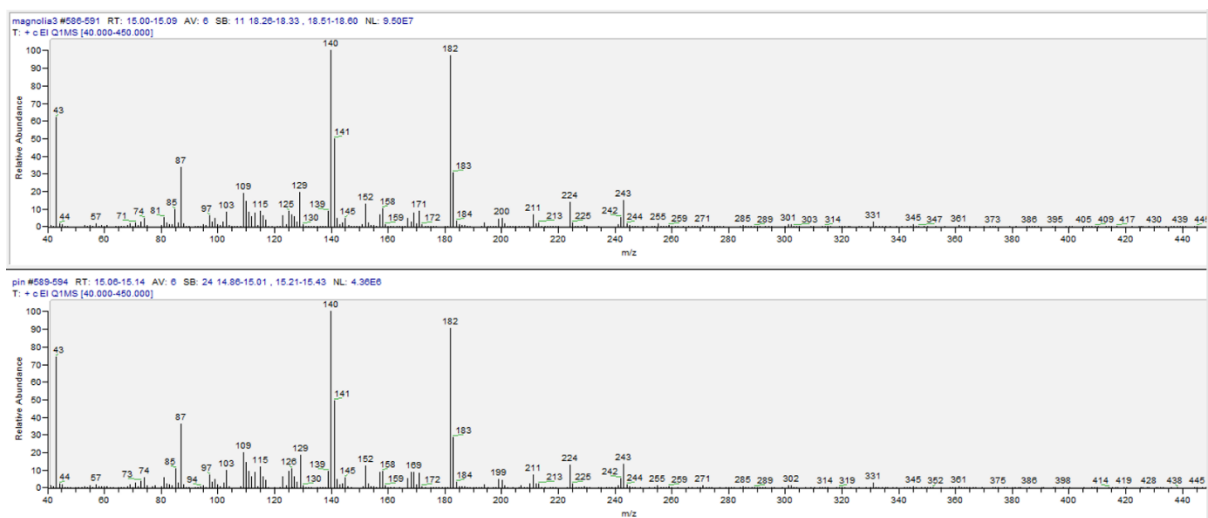
V extrakte kvetov magnólie Soulangeova boli analyzované inozitoly potvrdené hmotnostnými spektrami a retenčnými časmi rôzne eluujúcich rovnako pripravených acetylovaných štandardov inozitolov a metyléter inozitolov. Na obr. 2, 3 je porovnané MS spektrum inozitolu, metyléter inozitolu v extrakte a príslušného štandardu (Obr. 2, 3).



Obr.1. Chromatogram inozitolov, metyl-éter derivátov v extrakte kvetov *Magnolia soulangeana*
D-pinitol (15,21 min), chiro-inozitol (16,36 min), ononitol (18,01 min), myo-inozitol (18,57 min)



Obr. 2. MS spektrum acetylovaného inozitolu D-chiro-inozitolu v extrakte a štandardu



Obr. 3. MS spektrum acetylovaného metyléter inozitolu D-pinitolu v extrakte a štandardu

Tab. 1 znázorňuje relatívne (plošné) percentá zastúpenia inozitolov v extrakte kvetov *Magnolia soulangeana* v danom poradí s príslušnými retenčnými časmi a charakteristické ióny fragmentácie. V magnólii Soulangeova bol identifikovaný D-pinitol ako dominantný (84,33 %) voči ďalším trom inozitolom, ononitolu, chiro- a myo-inozitolu. Ako druhý je najviac zastúpený myo-inozitol (12,22 %), ktorý sa v prírode najviac vyskytuje. Potom ononitol s 2,73 % a chiro-inozitol s 0,71 %-ným zastúpením v extrakte. Najväčšie zastúpenie D-pinitolu môže súvisieť s jeho úlohou ochrániť rastlinu pred nepriaznivými podmienkami prostredia, alebo s tým, že myo-inozitol môže byť metyltransferázou metylovaný na ononitol a potom sa prostredníctvom epimerázovej reakcie premení na pinitol, čo by vysvetľovalo aj menšie zastúpenie ononitolu [1].

Tab. 1. Relatívne percentá [%] zastúpenia jednotlivých inozitolov v kvetoch *Magnolia soulangeana* a charakteristické ióny fragmentácie

	Plocha [%]	RT [min]	MS fragmenty
D-pinitol	84,33	15,21	43, 87, 109, 129, 140 , 141, 152, 182 , 183, 211, 224, 243
chiro-inozitol	0,71	16,36	43, 103, 109, 115, 126, 139, 145, 157, 168 , 199, 210
ononitol	2,73	18,01	43, 87, 109, 129, 140 , 141, 152, 182 , 183, 211, 224, 243
myo-inozitol	12,22	18,57	43, 103, 109, 115, 126, 139, 145, 157, 168 , 199, 210

Záver

V extrakte kvetov *Magnolia soulangeana* boli porovnaním s retenčnými časmi a hmotnostnými spektrami štandardov identifikované 2 metyléter inozitoly a 2 inozitoly v eluovanom poradí: *D-pinitol*, *chiro-inozitol*, *ononitol*, *myo-inozitol*. Hmotnostná spektrometria hrá významnú úlohu pri jednoznačnej identifikácii, z toho dôvodu je spojenie GC-MS výhodné aj pri identifikácii skupiny cyklitolov. Tak ako je využívaná *Magnolia officinalis* s obsahom neolignanov v tradičnej čínskej medicíne na zlepšenie gastrointestinálnej aktivity, regulácie respiračnej aktivity pri astme, kašli, ale aj pri liečení ochorenia COVID-19, možno predpokladať, že *Magnolia soulangeana* by mohla mať tiež potencionálne liečivé účinky vďaka inozitolom, ktoré majú antioxidačné, protizápalové a protirakovinové vlastnosti.

PodĎakovanie

Tento príspevok vznikol s podporou Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: ITMS: 313011ATT2, spolufinancovaný z Európskeho fondu regionálneho rozvoja a bol podporený Slovenskou grantovou agentúrou VEGA (Grant č. 1/0116/22).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Al-Suod H., Ligor M., Raŕiu I.-A., et al. (2017) *Phytoch. Lett.* 20, p. 507
- [2] Sanz M. L., Martínez-Castro I., Moreno-Arribas M. V. (2008) *Food Chem.* 111(3), p. 778
- [3] Endringer D. C., Pezzuto J. M., Braga F. C. (2009) *Phytomed.* 16, p. 1064
- [4] Monastra G, Vucenik I, Harrath A. H., et al. (2021) *Front. Endocrinol.* 12, p. 660381
- [5] Owczarczyk-Saczonek A., Lahuta L. B., Ligor M., et al. (2018) *Nutrien.* 10(12), p. 1891
- [6] Lagana A. S., Garzon S., Casarin J., et al. (2018) *Trends Endocrinol Metab* 29(11), p.768

Využitie hmotnostnej spektrometrie s trojitým kvadrupólom na identifikáciu skupiny cyklitolov vo hviezdici prostrednej

Mária Kopáčová^{1,2}, Vladimír Pätoprstý²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; kopacova8@uniba.sk

²Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Analytické oddelenie, Dúbravská cesta 9, 845 38, Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Use of mass spectrometry with triple quadrupole for identification of a group of cyclitols in chickweed. Mass spectrometry is the most commonly used method in the detection of cyclitols because it offers high sensitivity, selectivity and versatility. Inositols, the most widespread cyclitols in eucaryotic cells with their methyl ether derivatives as plant secondary metabolites have numerous pharmaceutical properties and are widely distributed in the plants. This work deals with the identification of inositols in the leaves of chickweed by mass spectrometry. Gas chromatography was used to separate inositols on polar column SP-2330 after derivatization. In the leaves of chickweed 2 methyl ether inositols and 1 inositol have been identified with their relative percentages of the peak area: D-pinitol (98,69 %), ononitol (0,99 %), myo-inositol (0,33 %). In addition to the already known phytochemicals contained in chickweed (saponins, tannins, terpenoids, etc.), inositols also contribute to its medicinal properties.

Keywords: inositols; chickweed; gas chromatography; mass spectrometry; identification

Úvod a formulácia cieľa

Hmotnostná spektrometria je najčastejšie používanou metódou pri detekcii cyklitolov, pretože ponúka vysokú citlivosť, selektivitu a univerzálnosť. Inozitoly sú najrozšírenejšie cyklitoly v eukaryotických bunkách, s empirickým vzorcom $C_6H_{12}O_6$ (1,2,3,4,5,6-cyklohexanol). Tieto chemické zlúčeniny existujú v deviatich možných stereoizoméroch. Päť z nich, myo-, scyllo-, muco-, neo- a D-chiro-inozitol sa vyskytujú v prírode, kým ostatné štyri možné izoméry (L-chiro-, allo-, epi- a cis-inozitol) sú odvodené z myo-inozitolu [1]. Medzi všetkými známymi inozitolmi sa v prírode najviac vyskytuje myo-inozitol. Je vo všetkých eukaryotických bunkách, kde tvorí štruktúrny základ pre množstvo sekundárnych látok. Je tiež dôležitou zložkou stavebných lipidov (fosfatidyloinozitol) PI a ich rôznych fosfátov, fosfatidyloinozitol fosfátových lipidov PIP. Všetky fosfatidyloinozitolfosfáty sa podieľajú na raste a vývoji rastlín. Niektoré inozitoly sú bežne v prírode ako čisté zlúčeniny alebo ako ich deriváty [2].

Niektoré z metyléter derivátov inozitolu sú rastlinné sekundárne metabolity, zlúčeniny, ktoré sa priamo nezúčastňujú normálneho rastu, ale hrajú dôležitú úlohu v obrane proti nepriaznivým podmienkam prostredia. Medzi nimi rozlišujeme 5-O-metyl-myo-inozitol

(*sekvojitol*), 1-O-metyl-myo-inozitol (*bornezitol*), 4-O-metyl-myo-inozitol (*ononitol*), 5-O-metyl-allo-inozitol (*brahol*), di-O-metyl-(+)-chiro-inozitol (*pinpollitol*) a 1L-2-O-metyl-chiro-inozitol (*L-quebrachitol*). 3-O-metyl-D-chiro-inozitol (*D-pinitol*) je najrozšírenejší inozitol éter v rastlinách [3].

Protizápalové vlastnosti cyklitolov pomáhajú redukovať rozvoj metabolických porúch (cukrovka, hypertenzia) a aterosklerózy. Známe sú aj inzulín-napodobujúce účinky D-pinitolu, D-chiro-inozitolu a sekvojitolu. Myo-inozitol spolu s D-chiro-inozitolom dokáže zlepšiť vývoj kostí a minerálnu hustotu kostí, čím potláčajú osteoklastogézu. Myo-inozitol a ostatné cyklitoly majú tiež antioxidačné, protizápalové a protirakovinové vlastnosti [4].

Hviezdica prostredná (*Stellaria media*) sa tradične používa pri kožných ochoreniach, popáleninách a pomliaždeninách, ako aj pri liečbe zápalov tráviaceho traktu, obličiek a dýchacích ciest alebo pri ochoreniach kĺbov. Pôsobí antibakteriálne, antioxidačne a má analgetické účinky. Pre niekoho známa ako chutná burina, využívaná na prípravu šalátov, smoothies, pomazánok, do polievok alebo ako čaj, je bohatá na mnohé prospešné fytochemikálie. V literatúre sa neuvádza identifikácia inozitolov vo hviezdici prostrednej hmotnostnou spektrometriou. Okrem toho sa cyklitoly zvyknú derivatizovať trimetylsilyláciou. My sme sa rozhodli pre iný spôsob derivatizácie, takže nie sú k dispozícii ani príslušné hmotnostné spektrá z literatúry. Cieľom tejto práce bolo identifikovať pomocou MS, aké inozitoly obsahuje hviezdica prostredná [1, 5].

Materiál a metódy

Listy hviezdice prostrednej (*Stellaria media*) boli lyofilizované, aby sa v nich zachoval obsah látok. Následne boli podrvené a extrahované v metanole. Extrakt bol homogenizovaný 30 min pri laboratórnej teplote ultrazvukovým homogenizátorom s pulzom 10 s x 1 s (Bandelin Sonopuls HD 3100) pre lepšiu výťažok. Po 5 min vortexovaní (IKA Vortex Genius 3) a 5 min centrifugácii (Heraeus PICO 17 Centrifuge) sa odobratý 1 ml nechal odpariť. Vzorka sa pred analýzou GC-MS derivatizovala zásaditou acetyláciou pridaním 50 µl pyridínu a 50 µl acetanhydridu v termobloku (Block heater SBH130D STUART) 1 hod pri 80°C. Po acetylácii sa nechala vzorka odpariť do sucha a rozpustila v acetonitrile.

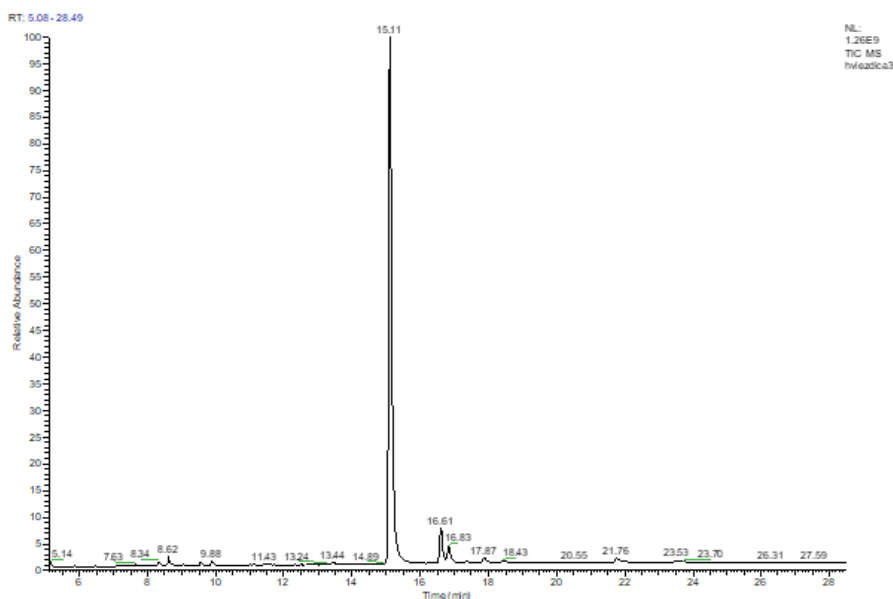
Vzorky boli analyzované plynovým chromatografom v spojení s hmotnostným detektorom GC-MS (Trace GC Ultra Thermo Scientific - TSQ Quantum XLS) s použitím kremennej kapilárnej kolóny SP-2330 (30m x 0.25mm x 0.2µm) a teplotným gradientom: 180 °C (4 min) – 20 °C/min – 230 °C – 2 °C/min – 250 °C (10 min). Tieto podmienky boli optimalizované a teplotný program dosahuje najlepšiu separáciu. Prietok hélia bol 0,6 ml/min,

teplota iónového zdroja a dávkovača bola 200 °C a 240 °C. Použitá bola elektrónová ionizácia (70 eV) a kvadrupólový analyzátor pracoval v režime úplného skenovania v hmotnostnom rozsahu 40-450 m/z. Chemikálie LC-MS čistoty, použité na extrakciu, prípravu a analýzy vzoriek ako aj štandardov, boli získané od firiem VWR Chemicals (Poľsko), Honeywell Chromasolv (Nemecko). Štandardy inozitolov (D-ononitol, sekvojitol, D-pinitol, D-chiro-, allo-, epi-, neo-, scyllo-, muco-, myo-inozitol) boli zakúpené od firiem Carbosynth (Spojené kráľovstvo), Sigma-Aldrich (Švajčiarsko).

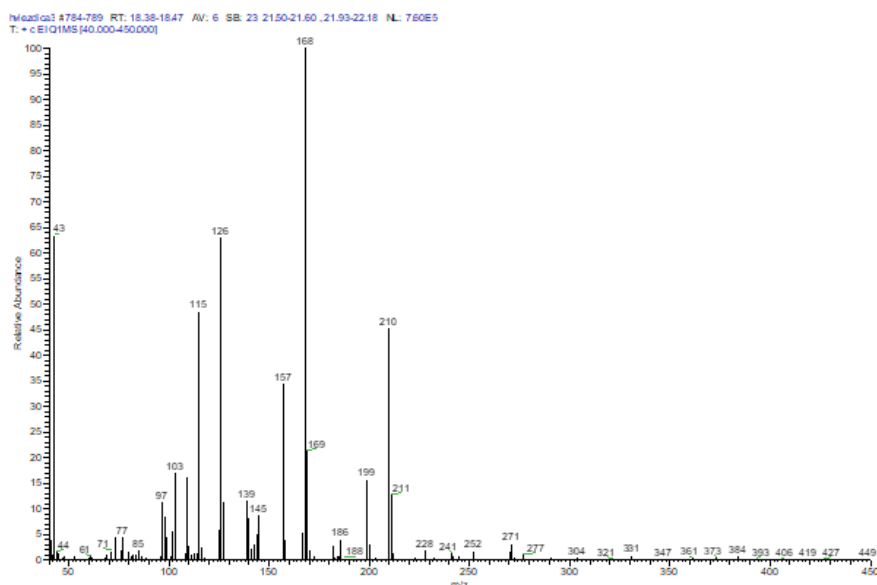
Výsledky a diskusia

Vzorka derivatizovaného extraktu listov hviezdice prostrednej bola analyzovaná plynovou chromatografiou s hmotnostnou spektrometriou. Inozitoly sa separovali na polárnej kolóne SP-2330. V študovanej rastline bol identifikovaný 1 inozitol a 2 metyléter inozitoly, ktoré sa pravdepodobne nachádzajú v rastline vo voľnej forme (Obr. 1). V analyzovanom extrakte listov boli identifikované aj acetylované hexózy (16,61 min a 16,83 min), ale ani pomalý teplotný gradient 2 °C/min z teploty 230 °C na 250 °C nebol schopný zabezpečiť ich dostatočnú separáciu. Voľné sacharidy však neboli cieľom našej štúdie (Obr. 1).

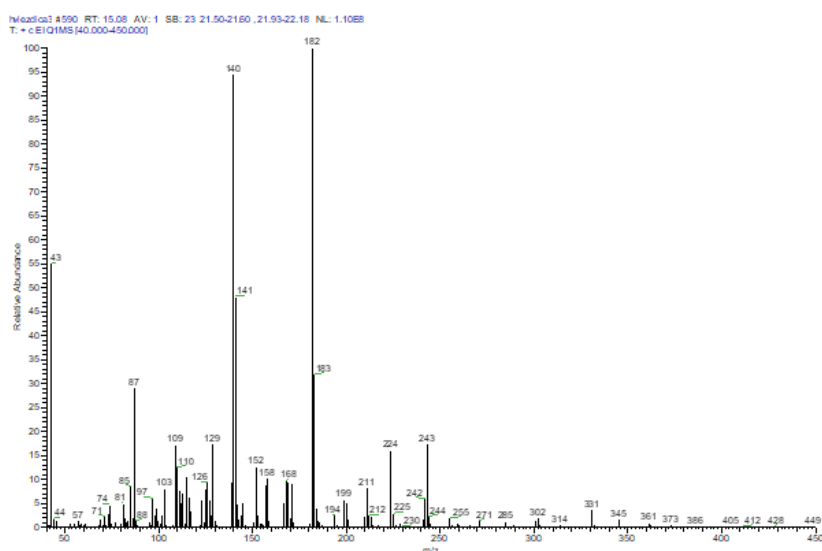
Analyzované inozitoly v extrakte hviezdice prostrednej boli potvrdené hmotnostnými spektrami a retenčnými časmi rôzne eluujúcich rovnako pripravených acetylovaných štandardov inozitolov a metyléter inozitolov, ktoré majú charakteristické fragmentačné vzorce (Obr. 2, 3).



Obr. 1. Chromatogram inozitolov, metyl-éter derivátov v extrakte listov hviezdice prostrednej
D-pinitol (15,11 min), ononitol (17,87 min), myo-inozitol (18,43 min)



Obr. 2. Hmotnostné spektrum acetylovaných inozitolov



Obr. 3. Hmotnostné spektrum acetylovaných metyléter inozitolov

Tab. 1 znázorňuje relatívne (plošné) percentá zastúpenia inozitolov v extrakte listov hviezdice prostrednej v danom poradí s príslušnými retenčnými časmi. Myo-inozitol ako najviac vyskytujúci sa inozitol v prírode sa tiež nachádza v extrakte, aj keď je jeho zastúpenie najmenšie. Vo hviezdici prostrednej bol identifikovaný D-pinitol ako dominantný voči ďalším dvom inozitolom, ononitolu a myo-inozitolu. Predpokladáme, že to súvisí s úlohou D-pinitolu ochrániť burinu pred nepriaznivými podmienkami prostredia, a teda aj s tým, že myo-inozitol môže byť metyltransferázou metylovaný na ononitol a potom sa prostredníctvom epimerázovej reakcie premení na pinitol [1]. Podľa literatúry boli vo hviezdici prostrednej identifikované inozitoly - pinitol, ononitol, najmenej chiro-inozitol metódou HPAE-PAD a NMR porovnaním

so spektrami z literatúry, čo sa líši od našich výsledkov získaných pomocou identifikácie MS [6]. GC-MS metódu doplnenú o potvrdenie štandardmi považujem za spoľahlivejšiu.

Tab. 1. Relatívne percentá [%] zastúpenia jednotlivých inozitolov v listoch hviezdice prostrednej, porovnanie ich retenčných časov so štandardmi a charakteristické ióny fragmentácie

	Plocha [%]	RT [min]	RT štandardov [min]	MS fragmenty
D-pinitol	98,69	15,11	15,09	43, 87, 109, 129, 140 , 141, 152, 182 , 183, 211, 224, 243
ononitol	0,99	17,87	17,84	43, 87, 109, 129, 140 , 141, 152, 182 , 183, 211, 224, 243
myo-inozitol	0,33	18,43	18,40	43, 103, 109, 115, 126, 139, 145, 157, 168 , 199, 210

Záver

Hmotnostná spektrometria hrá dôležitú úlohu pri jednoznačnej identifikácii, z toho dôvodu je spojenie GC-MS výhodné aj pri identifikácii skupiny cyklitolov. Na základe porovnania retenčných časov a hmotnostných spektier štandardov a analyzovanej vzorky boli v extrakte listov hviezdice prostrednej identifikované 2 metyléter inozitoly a 1 inozitol v eluovanom poradí: *D-pinitol*, *ononitol*, *myo-inozitol*. Možno skonštatovať, že okrem už známych fytochemikálií obsiahnutých vo hviezdici prostrednej (saponíny, taníny, terpenoidy a i.) prispievajú k liečivým vlastnostiam tejto rastliny, využívanéj v kuchyni, aj inozitoly, najmä D-pinitol so svojimi inzulín-napodobujúcimi účinkami.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla s podporou Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: ITMS: 313011ATT2, spolufinancovaný z Európskeho fondu regionálneho rozvoja a bol podporený Slovenskou grantovou agentúrou VEGA (Grant č. 1/0116/22).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Al-Suod H., Ligor M., Raĭu I. A., et al. (2017) Phytoch. Lett. 20, p. 507
- [2] Sanz M. L., Martínez-Castro I., Moreno-Arribas M. V. (2008) Food Chem. 111(3), p. 778
- [3] Endringer D. C., Pezzuto J. M., Braga F. C. (2009) Phytomed. 16, p. 1064
- [4] Owczarczyk-Saczonek A., Lahuta L. B., Ligor M., et al. (2018) Nutrien. 10(12), p. 1891
- [5] Rogowska M., Lenart M., Srećec S., et al. (2017) Industr. Crops and Prod. 97, p. 448
- [6] Negishi O., Mun'im A., Negishi Y. (2015) J. Agric. Food Chem. 63(10), p. 2683

Štúdium vlastností exozómov a ich potenciál v diagnostike rakoviny prostaty

Natália Košútová¹, Michal Híreš¹, Alena Gábelová², Katarína Kozics², Tomáš Bertók¹, Ján Tkáč¹

¹*Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Oddelenie glykobiotechnológie, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika; natalia.kosutova@savba.sk*
²*Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Ústav experimentálnej onkológie, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika*

Abstract

Study of the characteristics of exosomes and their potential in prostate cancer diagnostics

Prostate cancer is one of the most common type of cancer diseases in men. Early diagnosis remains one of the most important factors of a successful treatment. Since PCa diagnostics lacks sensitivity and specificity, liquid biopsy is taking on an increasingly important role in early diagnosis research, detecting cancer-specific biomarkers in body fluids. The problem is elevated serum levels of these biomarkers in other diseases. This work focuses on the study of exosomes as diagnostic biomarkers that could provide a diagnosis with high sensitivity and specificity. Exosomes are naturally produced biological nanoparticles, that are constantly released into various body fluids. They share many specific biomolecules of the parental cell and are enriched in different proteins, lipids and other metabolites. In the presented work, we analysed exosomes isolated from benign prostate epithelial cell line and cancerous prostate epithelial cell line. The kinetics of exosome production, their size differences and effect of Triton X-100 on exosome structure are investigated in the experiments.

Keywords: *exosome; prostate cancer; cancer diagnostics; liquid biopsy*

Úvod a formulácia cieľa

Rakovina prostaty je druhým najčastejšie sa vyskytujúcim typom nádorových ochorení u mužov a patrí medzi typy rakoviny s najvyššou mierou diagnostiky vo viac ako polovici krajín sveta. V roku 2020 bolo diagnostikovaných 1,43 milióna nových prípadov tohto ochorenia a ochoreniu podľahlo 375 tisíc pacientov, pričom sa predpokladá, že do roku 2030 sa incidencia tohto ochorenia zvýši o 35 % [1]. Slovensko patrí medzi krajiny, v ktorých sa výskyt tohto ochorenia každým rokom zvyšuje [2]. Pokiaľ je diagnostika vykonaná v skorom štádiu, kedy je nádor ohraničený na prostatu, prognóza je priaznivá. Avšak veľké množstvo prípadov rakoviny prostaty je diagnostikované, až keď sa choroba rozšíri mimo prostatickú žľazu [3]. Súčasnnej diagnostike rakoviny prostaty chýba dostatočná citlivosť a často vedie k vysokému počtu zbytočných biopsií. Preto sa čoraz viac dostávajú do popredia techniky tekutej biopsie, počas ktorej sú v telových tekutinách detegované biomarkery.

Exozómy (30-200 nm) patria medzi extracelulárne vezikuly, ktoré sú konštantne uvoľňované z buniek a tkanív do rôznych telových tekutín. Ich prítomnosť bola dokázaná v krvi, lymfe, moči alebo cerebrospinálnej tekutine [4]. Svojím zložením kopírujú zloženie

materskej bunky, čo umožňuje vzájomné odlišenie exozómov uvoľnených z normálnych a patologických buniek. Majú veľmi bohaté zloženie a vďaka svojim špecifickým vlastnostiam sú považované za potenciálne biomarkery pre diagnostiku rakoviny [5].

Cieľom predkladanej práce bola izolácia exozómov odvodených z dvoch rôznych bunkových línií prostaty – benígnej/normálnej RWPE1 línie epitelových buniek prostaty a rakovinovej 22Rv1 línie epitelových buniek prostaty. Izolované exozómy boli následne charakterizované, pričom študovanými parametrami bola kinetika produkcie, veľkosť, koncentrácia a iné.

Materiál a metódy

Všetky bežne používané chemikálie, ako napríklad zložky tlmivých roztokov a základné anorganické a organické zlúčeniny, boli zakúpené od spoločnosti Sigma-Merck (USA).

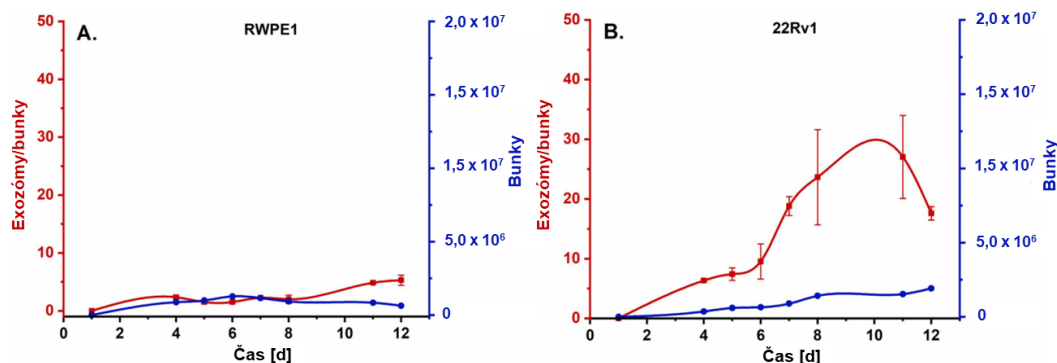
Pripravené bunkové médiá boli centrifugované pri 10 000 g a 4 °C po dobu 30 minút. Zozbieraný supernatant, ktorý bol ďalej použitý na zber a analýzu exozómov, bol skladovaný pri teplote –80 °C. Kinetika produkcie exozómov bola sledovaná po dobu 12 dní. Konečná koncentrácia exozómov v daných časových intervaloch bola vyjadrená ako počet exozómov na bunku. Na izoláciu exozómov bol použitý komerčne dostupný kit MagCapture™ EIK zakúpený od spoločnosti Fujifilm Wako Chemicals (USA). Izolácia exozómov zahŕňala niekoľko stupňovú centrifugáciu a následnú afinitnú purifikáciu pomocou magnetických častíc.

Takto pripravené exozómy boli charakterizované pomocou analýzy pohybu častíc (NTA). Vzorky boli pred analýzou riedené 10x vo fosfátovom tlmivom roztoku (10 mM, pH 7.4). Vplyv Tritonu X-100 na štruktúru exozómov bol sledovaný na exozómoch izolovaných z rakovinovej 22Rv1 bunkovej línie. Vplyv 0,1 % a 1 % Tritonu X-100 na veľkosť exozómov bol sledovaný pomocou NTA analýzy.

Výsledky a diskusia

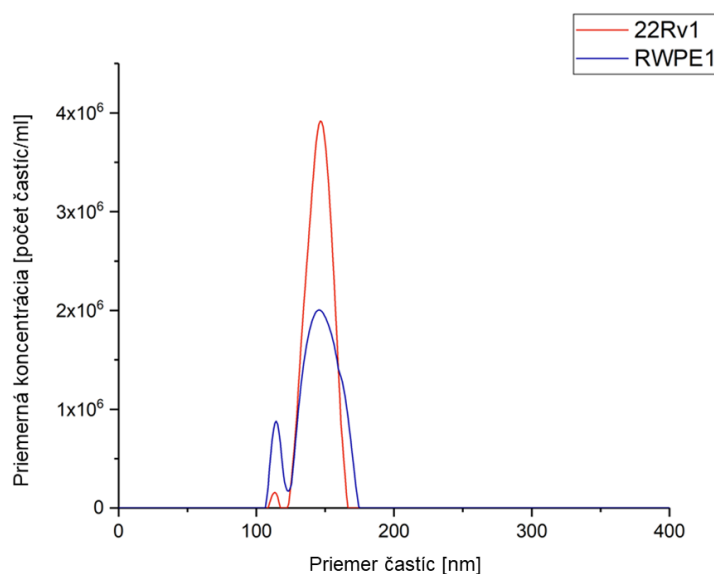
Pri sledovaní kinetiky produkcie exozómov boli porovnávané 2 rôzne bunkové línie (RWPE1 a 22Rv1 bunky prostaty). Za 12 dní vyprodukovala rakovinová 22Rv1 bunková línia výrazne vyššiu hladinu exozómov, ako kontrolná bunková línia RWPE1 (Obr. 1). Bunková línia 22Rv1 produkovala exozómy s rýchlosťou $(3,02 \pm 0,42) \text{ d}^{-1}$, zatiaľ čo kontrolná bunková línia RWPE1 produkovala exozómy s rýchlosťou $(0,40 \pm 0,09) \text{ d}^{-1}$ v priebehu 11 dní. Celková rýchlosť produkcie exozómov pre rakovinovú 22Rv1 bunkovú líniu bola 7,6 krát vyššia

ako pre kontrolnú RWPE1 bunkovú líniu. Jedným z dôvodov tohto výsledku môže byť fakt, že nádorové mikroprostredie, ako je napríklad hypoxia, nízke pH alebo posunutá metabolická aktivita, podporuje produkciu a uvoľňovanie exozómov [6].



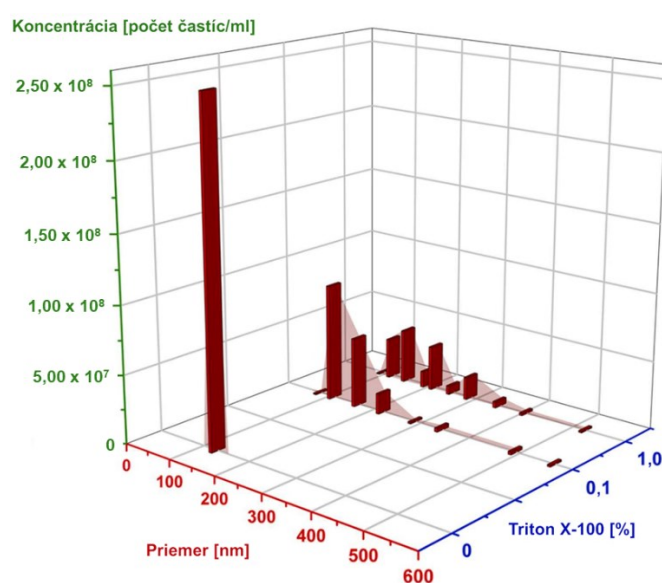
Obr. 1. Kinetika produkcie exozómov bunkami RWPE1 (A) a bunkami 22Rv1 (B).
Grafy zobrazujú koncentráciu buniek a počet exozómov na bunku pre kontrolnú a rakovinovú bunkovú líniu.

Po izolácii boli vzorky charakterizované pomocou NTA analýzy. Táto analýza nepotvrdila signifikantné rozdiely medzi exozómami izolovanými z kontrolnej a rakovinej línie. Avšak potvrdila naše predchádzajúce výsledky. Priemerná veľkosť oboch typov izolovaných exozómov bola 145 nm. Priemerná koncentrácia exozómov izolovaných z rakovinej 22Rv1 línie bola 4×10^7 častíc/ml, zatiaľ čo koncentrácia exozómov kontrolnej línie bola 2×10^7 častíc/ml (Obr. 2).



Obr. 2. NTA analýza izolovaných exozómov.
Graf zobrazuje veľkosť a priemernú koncentráciu izolovaných častíc exozómov pre kontrolnú a rakovinovú bunkovú líniu. Vzorky boli riedené 10x vo fosfátovom tlmivom roztoku.

Inkubácia exozómov v rôznych médiách obsahujúcich aditíva, ako sú napríklad detergenty, je dôležitá pre mnohé aplikácie. Avšak môže viesť k destabilizácii exozómov. Triton X-100 ovplyvňuje štruktúru exozómov v troch krokoch. V prvom kroku dochádza k difúzii do lipidovej dvojvrstvy. V druhom kroku nastáva expanzia vezikúl, kedy sa exozómy zväčšujú. Tento proces je vysoko závislý od koncentrácie detergentu [7]. Posledným krokom je micelizácia. V tomto experimente bol sledovaný vplyv 0,1 % a 1 % Tritonu X-100 na veľkosť exozómov. So zvýšenou koncentráciou exozómov sme sledovali pokles celkovej hladiny exozómov a zvýšenie hladiny častíc so zhlukmi s veľkosťou väčšou ako 200 nm (Obr. 3).



Obr. 3. Dezintegrácia exozómov pomocou Triton X-100.

Graf zobrazuje rozsah priemerov dezintegrovaných exozómov a ich koncentrácie v závislosti od rôznych koncentrácií Tritonu X-100: 0; 0,1 a 1 % roztokov.

Počiatočná hladina exozómov pred vystavením Tritonu X-100 predstavovala $2,5 \times 10^8$ častíc/ml. Inkubácia exozómov s 0,1 % Tritonom X-100 viedla k zníženiu celkovej hladiny exozómov na $1,63 \times 10^8$ častíc/ml a na ešte nižšiu hladinu $1,48 \times 10^8$ častíc/ml po inkubácii s 1 % Tritonom X-100 (Tab. 1).

Inkubácia exozómov s 0,1 % Tritonom X-100 viedla k prítomnosti častíc s veľkosťou menšou ako 100 nm (exozómové fragmenty) a tiež k prítomnosti častíc s veľkosťou od 200 nm do 300 nm (expandované exozómy alebo zhluky exozómov). Inkubácia exozómov s 1 % Tritonom X-100 viedla k prítomnosti malých častíc s veľkosťou menšou ako 100 nm a väčším podielom častíc s veľkosťou od 200 nm do 300 nm, v porovnaní s ošetrením 0,1 % Tritonom X-100 (Tab. 1).

Tab. 1. Hladina a distribúcia veľkosti exozómov. V zátvorkách: pomer hladiny exozómov s určitou veľkosťou vydelený celkovou úrovňou exozómov vyjadrených v percentách.

Veľkosť exozómov [nm]	Hladina exozómov na úrovni 1×10^8 častíc		
	0 % Triton X-100	0,1% Triton X-100	0 % Triton X-100
0-100	0 (0 %)	0-100	0 (0 %)
100-200	2,50 (100 %)	100-200	2,50 (100 %)
200-300	0 (0 %)	200-300	0 (0 %)
300-400	0 (0 %)	300-400	0 (0 %)
400-500	0 (0 %)	400-500	0 (0 %)
500+	0 (0 %)	500+	0 (0 %)
Celkovo	2,50 (100 %)	Celkovo	2,50 (100 %)

Kultivácia rakovinových buniek, vrátane LNCaP buniek (bunky metastatického karcinómu prostaty), pri pH 6,5 (typické pre rakovinové bunky), výrazne zvyšuje produkciu exozómov v porovnaní s bunkovou kultiváciou pri fyziologickom pH 7,4 [8]. Tento výsledok predstavuje prvý publikovaný dôkaz toho, že zvýšená produkcia exozómov a kyslé mikroprostredie nádoru sú vzájomne prepojené a predstavujú spoločný fenotyp rakoviny [8]. Naše práca tento výsledok potvrdzuje – rakovinové 22Rv1 bunky produkujú vyššiu hladinu exozómov ako zdravé RWPE1 bunky.

V súčasnosti je známych niekoľko publikácií, ktoré sa zaoberajú vplyvom rôznych detergentov na extracelulárne vesikuly. Naša práca sa zameriava na konkrétny typ exozómov a porovnanie dvoch rôznych koncentrácií Tritonu X-100 na ich veľkosť a koncentráciu.

Záver

V tejto práci boli študované exozómy izolované z dvoch rôznych bunkových línií - benígnej/normálnej RWPE1 línie epitelových buniek prostaty a rakovinovej 22Rv1 línie epitelových buniek prostaty. Zistili sme, že rakovinové bunky produkujú vyššie hladiny exozómov ako zdravé bunky. Úroveň produkcie exozómov rakovinovými 22Rv1 bunkami bola 7,6-krát vyššia ako úroveň produkcie kontrolnou RWPE1 líniou buniek. Izolácia exozómov pomocou magnetických častíc predstavuje atraktívnu metódu, ktorá umožňuje priame zakomponovanie magnetických častíc s naviazanými exozómami do tvorby sendvičových konfigurácií v ELISA formáte. Záverečná časť príspevku ukázala, že NTA metóda predstavuje efektívny nástroj na skúmanie účinnosti detergentov na lýzu exozómov.

PodĎakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: CEMBAM – Centrum medicínskeho bioaditívneho výskumu a

výroby, ITMS: 313011V358, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., et al. (2021) *CA Cancer J. Clin.* 71(3), p. 209
- [2] Culp M. B., Soerjomataram I., Efstathiou J. A., et al. (2020) *Eur. Urol.* 77(1), p. 38
- [3] Edelstein L., Smythies J., Yuesenberry P., et al. (2019) *Exosomes*. Academic Press, London, UK, p. 206
- [4] Bertokova A., Svecova N., Kozics K., et al. (2022) *Biomed. Pharmacother.* 151, p. 113093
- [5] Lorencova L., Bertok T., Bertokova A., et al. (2020) *Chem. Electro. Chem.* 7(9), p. 1956
- [6] Ludwig N., Hong C. S., Ludwig S., et al. (2019) *Curr. Protoc. Immunol.* 127(1), p. 93
- [7] Dalgarno P. A., Juan-Colás J., Hedley G. J., et al. (2019) *Sci. Rep.* 9(1), p. 12897
- [8] Logozzi M., Mizzoni D., Angelini D. F., et al. (2018) *Cancers* 10(10), p. 370

Porovnanie účinku vybraných dlhoreťazcových acyl-CoA syntetáz z granátovníka na akumuláciu kyseliny punikovej v kvasinkách

Daniela Krajčiová, Roman Holič

Ústav biochémie a genetiky živočíchov Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Oddelenie biochémie membrán, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovenská republika;
daniela.krajciova@savba.sk

Abstract

Comparison of the effect of selected pomegranate long-chain acyl-CoA synthetases on punicic acid accumulation in yeasts

Punicic acid is a non-abundant fatty acid from pomegranate with potential to be use in various therapeutic and industrial applications. In this respect its production has been introduced in numerous transgenic organisms. However, all of them showed inefficient accumulation of this unusual fatty acid. In the present project we aimed to study 3 yet uncharacterized long-chain acyl-CoA synthetases (LACS) isoforms naturally found in pomegranate. We observed that *LACS* expression in recombinant yeast strain producing punicic acid increased the amount of punicic acid as well as the amount of total lipids. In addition, our results indicate their possible different substrate specificity.

Keywords: yeasts; acyl-CoA synthetases; punicic acid; lipid production

Úvod a formulácia cieľa

Kyselina puniková (PuA; C18:3) patrí medzi vzácne izoméry konjugovanej kyseliny linolénovej, ktoré sa v prírode vyskytujú iba v obmedzenom množstve rastlín [1]. V niekoľkých štúdiách boli potvrdené jej potenciálne antiobezitné, antidiabetické a protirakovinové vlastnosti [2 – 3]. Medzi jej najväčší zdroj patria semená granátovníka (*Punica granatum*), kde je PuA po syntéze bifunkčnou konjugázou FADX uskladnená vo forme triacylglycerolov [1]. Vďaka známej biosyntetickej dráhe bola v posledných rokoch vynaložená veľká snaha pre vytvorenie jej alternatívneho zdroja z rastlinnej ríše (*Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Linum usitatissimum*) [4 – 5]. Neskôr boli pre tento účel vybraté jednoduchšie modelové organizmy – kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*) [6 – 7], avšak ani v jednom organizme sa nepodarilo dosiahnuť efektívne začleňovanie PuA do triacylglycerolov. Rekombinantný kmeň *S. pombe* zároveň akumuluje zvýšené množstvo PuA vo forme voľných mastných kyselín [8]. Príčinou by mohla byť neschopnosť natívnej kvasinkovej acyl-CoA syntetázy (ACS) aktivovať nezvyčajnú mastnú kyselinu, čo bráni jej začleňovaniu do lipidov.

Dlhoreťazcové acyl-CoA syntetázy (LACS) predstavujú skupinu ACS so schopnosťou aktivovať mastné kyseliny s dlhým reťazcom. V rastlinných bunkách existuje ich niekoľko izoformiem s rôznou funkciou a špecifitou substrátu. Medzi najviac preštudované patria LACS

izoformy z *A. thaliana*, kde sú do biosyntézy triacylglycerolov zapojené LACS1 a LACS9. Majoritnú úlohu tu zohráva pravdepodobne LACS9 lokalizovaná v mieste *de novo* syntézy mastných kyselín – v plastidoch [9]. V *B. napus*, bola táto funkcia potvrdená pre LACS2, ktorej heterológna produkcia v kvasinkách zároveň dokázala zvýšiť množstvo celkových lipidov v bunke [10]. V prípade *L. usitatissimum* pozorovali, že LACS8 vďaka svojej substrátovej preferencii výrazne obohacuje triacylglyceroly o kyselinu α -linolénovú (C18:3) [11].

P. granatum obsahuje podľa databázy NCBI 7 predikovaných LACS, ktoré ešte neboli bližšie opísané. Predpokladáme, že niektorá z LACS pochádzajúca z prirodzeného producenta by mohla vykazovať zvýšenú substrátovú špecificitu pre PuA a pomôcť pri zvýšení jej akumulácie v transgénnych organizmoch.

Materiál a metódy

Zarovnanie sekvencií

Proteínové sekvencie LACS sme získali z databázy NCBI a Phytozome. Na mnohonásobné zarovnanie sme použili program ClustalW (matica BLOSUM) a na vytvorenie fylogenetického stromu algoritmus *Neighbor-joining* v MEGA11 [12].

Kmene

Na funkčnú analýzu LACS sme použili kmeň *S. cerevisiae faa1Δfaa4Δ*, s deléciou v dvoch hlavných ACS, pripravený zo štandardného kmeňa BY4742 (*MATα*, *his3*, *leu2*, *lys2*, *ura3*). Do delečného kmeňa sme transformovali *PgLACS* gény v YEp195 vektore s *URA3* selekčným markerom. Kmene *S. pombe* produkujúce PuA sme pripravili zo štandardného kmeňa ED666 (*h⁺ ade6-M210 ura4-D18 leu1-32*). Heterológna ko/expresia *PgFADX* na pREP2 vektore s *ura4⁺* markerom a *PgLACS* na pREP1 s *LEU2* markerom bola pod kontrolou *nmt1* promótoru regulovateľného tiamínom. Sekvencie cDNA génov *PgLACS* boli kodón-optimalizované pre *S. pombe*.

Médiá a kultivácia

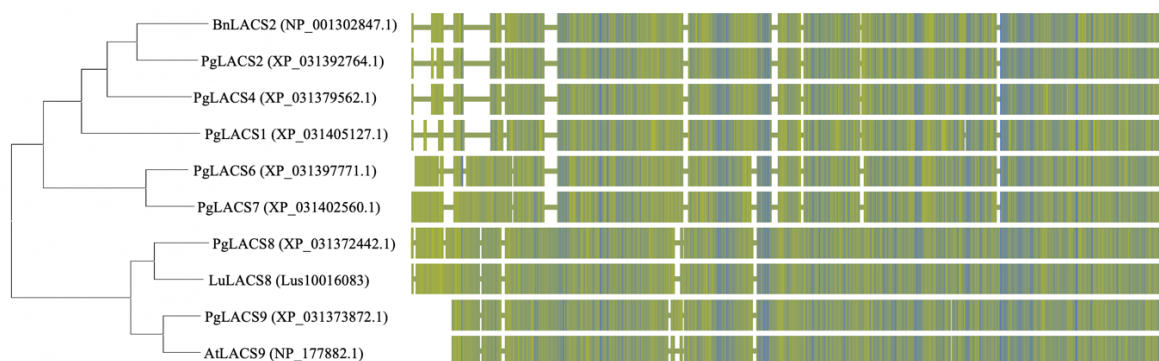
Mutantné kmene *S. cerevisiae* použité v komplementačnej analýze rástli na YNB-Ura médiu s prídavkom 45 μ M cerulenínu prípadne 100 μ M kyseliny myristovej (C14:0) alebo kyseliny olejovej (C18:1). Na solubilizáciu mastných kyselín sme použili tyloxapol vo výslednej koncentrácii 0,1 % (v/v). V prípade kmeňov *S. pombe* produkujúcich PuA sme bunky predkultivovali cez noc v EMM-Ura,-Leu médiu s prídavkom 15 μ M tiamínu. Následne sme ich kultivovali v EMM-Ura,-Leu bez tiamínu s počiatočným OD = 0,2. Všetky bunky sme inkubovali pri 30 °C na trepačke (130 rpm) respektíve v kultivačnom boxe.

Extrakcia lipidov a analýza mastných kyselín

Na izoláciu lipidov sme bunky zozbierali po 48 h kultivácii v množstve OD = 50. Celkové lipidy sme z buniek extrahovali a potom transmetylovali podľa Garaiova a kol. [7]. Metylestery mastných kyselín sme analyzovali pomocou plynovej chromatografie použitím kolóny BPX70 (SGE Analytical Science).

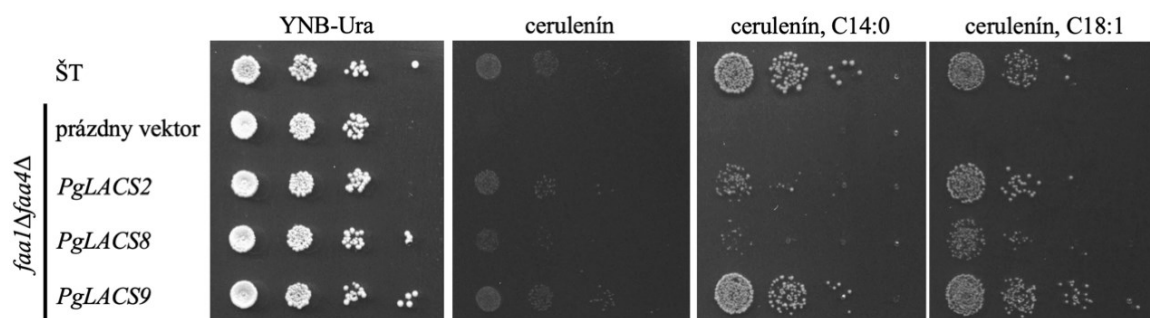
Výsledky a diskusia

Na výber LACS izoformiem s potenciálnou substrátovou špecificitou pre PuA a funkciou v biosyntéze triacylglycerov sme použili fylogenetickú analýzu, kde sme predikované LACS z *P. granatum* porovnali so známymi LACS s touto funkciou (Obr. 1.). Na základe homologickej príbuznosti sme vybrali do ďalších analýz PgLACS2, PgLACS8 a PgLACS9. PgLACS8 a PgLACS9 sú zároveň v spoločnej vetve s LuLACS8, kde bola potvrdená substrátová špecificita pre kyselinu α -linolénovú s rovnakou dĺžkou reťazca a počtom nenasýtených väzieb ako má PuA [11].



Obr. 1. Fylogenetická analýza LACS proteínov. Porovnanie proteínových sekvencií je znázornené vpravo. Aminokyselinové zvyšky s aspoň 80 % identitou v danej pozícii sú modrou farbou.

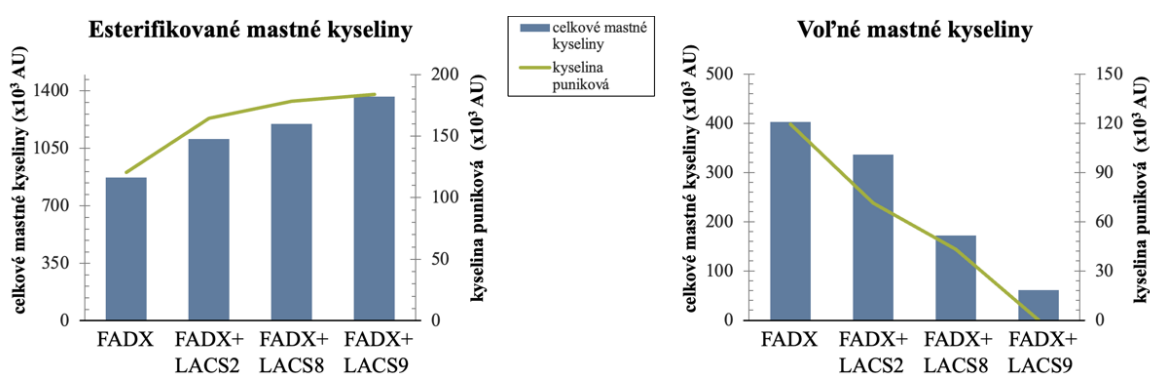
Na určenie schopnosti daných LACS aktivovať mastné kyseliny sme použili komplementačnú analýzu. Využili sme pritom cerulenín, inhibítor vnútrobunkovej syntézy mastných kyselín, v ktorého prítomnosti dokážu rásť bunky iba s prídavkom externých mastných kyselín a s funkčnou ACS, ktorá tieto mastné kyseliny aktivuje. Na základe vyhodnotenia rastu dokázali všetky tri izoformy PgLACS funkčne komplementovať ACS-deficitný kmeň, zatiaľ čo pôvodný kmeň nerástol (Obr. 2.).



Obr. 2. Komplementačná analýza kmeňa *S. cerevisiae ffa1Δffa4Δ* s rôznymi LACS izoformami z granátovníka. ŠT – štandardný kmeň s prázdnyimi vektormi.

V prípade prídavku C14:0 sme pozorovali pri kmeňoch exprimujúcich *PgLACS2* a *PgLACS8* slabší rast ako v prípade *PgLACS9*, čo môže súvisieť s ich substrátovou špecificitou pre masťné kyseliny s inou dĺžkou reťazca alebo s iným počtom a umiestnením nenasýtených väzieb. V prípade C18:1 je rozdiel medzi rastom jednotlivých kmeňov menej výrazný.

Rôzny účinok jednotlivých izoform na fenotyp sme pozorovali aj pri ich príspevku ku akumulácii PuA v kmeni produkujúcom túto masťnú kyselinu. Na analýzu sme použili plynovú chromatografiu a masťné kyseliny sme metylovali 2 rôznymi metylačnými činidlami na odlíšenie voľných masťných kyselín od masťných kyselín naviazaných esterovou väzbou v lipidoch. V porovnaní s pôvodným kmeňom spôsobili všetky LACS navýšenie množstva celkových lipidov aj PuA a zároveň zníženie množstva voľných masťných kyselín (Obr. 3.).



Obr. 3. Analýza masťných kyselín plynovou chromatografiou v kmeňoch *S. pombe* produkujúcich PuA po 48 h kultivácii. Množstvo celkových lipidov a PuA bolo vyhodnotené na základe intenzity odozvy detektora.

Najvýraznejšie zvýšenie PuA v esterifikovanej forme sme pozorovali v prípade *PgLACS9*, kde sa úmerne znížilo aj množstvo jej voľnej formy a naznačuje to jej možnú substrátovú špecifitu pre PuA.

Záver

Organizmy s heterológnou produkciou PuA sa vyznačujú spoločným problémom nedostatočného zabudovania PuA do triacylglycerolov ako zásobných lipidov. K tomu je potrebná jej efektívna aktivácia. Naše výsledky ukazujú, že predikované PgLACS dokážu aktivovať masné kyseliny a navýšiť množstvo viazanej PuA v bunke spolu s redukciou jej voľnej formy. Z testovaných izoformiem majú najpravdepodobnejšie substrátovú preferenciu pre PuA PgLACS9 a 8, ktoré sú zároveň najviac príbuzné LuLACS8 so známou substrátovou špecifitou pre podobnú masnú kyselinu. Nájdenie takejto izoformy môže významne pomôcť navýšiť biotechnologickú produkciu PuA a iných nezvyčajných masných kyselín.

PodĎakovanie

Táto práca bola podporená grantami APVV-20-0166, VEGA 2/0012/20 a APP0420.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Holic R., Xu Y., Caldo K. M. P., et al. (2018) Appl. Microbiol. Biotechnol. 102(8), p. 3537
- [2] Anusree S. S., Nisha V. M., Priyanka A., et al. (2015) Mol. Cell. Endocrinol. 413, p. 120
- [3] Beatty A., Singh T., Tyurina Y. Y., et al. (2021) Nat. Commun. 12, p. 2244
- [4] Mietkiewska E., Pan X., Shah S., et al. (2017) Int. News Fats Oils Relat. Mater. 28, p.14
- [5] Xu Y., Mietkiewska E., Shah S., et al. (2020) Metab. Eng. 62, p. 20
- [6] Wang J., Xu Y., Holic R., et al. (2021) J. Agric. Food. Chem. 69, p. 9616
- [7] Garaiova M., Mietkiewska E., Weselake R. J., et al. (2017) Appl. Microbiol. Biotechnol. 101(21), p. 7913
- [8] Krajčiová D., Káňovičová P., Petrisková L., et al. (2021) Študentská vedecká konferencia PriF UK 2021, Zborník recenzovaných príspevkov, Bratislava, SR, p. 657
- [9] Zhao L., Katavic V., Li F., et al. (2010) Plant J. 64, p. 1048
- [10] Ding L. N., Gu S. L., Zhu F. G., et al. (2020) BMC Plant Biol. 20, p. 21
- [11] Xu Y., Holic R., Li D., et al. (2018) Biochem. J. 475, p. 1473
- [12] Tamura K., Stecher K., Kumar S. (2021) Mol. Biol. Evol. 38(7), p. 3022

Monitorovanie účinnosti enzýmovej substitučnej terapie alfa-manozidózy využitím HPLC-FLD

Maroš Krchňák¹, Rebeka Kodríková¹, Marek Nemčovič¹, Anna Šalingová², Anna Hlavatá³, Katarína Juríčková³, Peter Baráth¹, Ján Mucha¹, Zuzana Pakanová¹

¹*Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Centrum glykomiky, Oddelenie glykobiológie, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika; chemkrma@savba.sk*

²*Národný ústav detských chorôb, Centrum dedičných metabolických porúch, Limbová 1, 833 40 Bratislava, Slovenská republika*

³*Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Národný ústav detských chorôb, Limbová 1, 833 40 Bratislava, Slovenská republika*

Abstract

Monitoring the efficacy of enzyme replacement therapy for alpha-mannosidosis using HPLC-FLD

Alpha-mannosidosis is a rare lysosomal storage disorder that causes the accumulation of mannose-rich oligosaccharides in all tissues. Urinary oligosaccharides of one patient undergoing a novel enzyme replacement therapy were extracted by solid phase extraction, labeled with 2-aminobenzamide, and analyzed using high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. To evaluate therapy efficacy, the levels of disease-specific oligosaccharides in samples before therapy, after one month, and after four months of therapy were compared. A two-fold decrease in the total level of urinary oligosaccharides was observed after one month of therapy, and an approximate tenfold significant decrease was detected after four months. This method of quantification is a suitable approach to further monitor enzyme replacement therapy efficacy in other alpha-mannosidosis patients.

Keywords: *high-performance liquid chromatography; mass spectrometry; alpha-mannosidosis*

Úvod a formulácia cieľa

Alfa-manozidóza (AM) je autozómovo recesívna lyzozómová porucha spôsobená zníženou aktivitou lyzozómového enzýmu α -D-manozidázy (EC 3.2.1.24) v dôsledku heterogénnych mutácií v géne *MAN2B1*. Tento enzým je súčasťou lyzozómovej degradačnej dráhy *N*-oligosacharidov, kde katalyzuje hydrolýzu manozidových väzieb. Výsledkom zníženej aktivity je akumulácia manózových oligosacharidov (ManOS) v tkanivách [1,2]. Prevalencia AM sa odhaduje na 1:500 000 až 1:1 000 000 živonarodených detí [3]. Symptomaticky sa AM prejavuje mentálnou zaostalosťou, poruchou motorických funkcií, stratou sluchu, imunodeficienciou a skeletálnymi abnormalitami. Pri závažnom priebehu nastáva bez terapie predčasná smrť [1, 4].

Terapeutické prístupy boli donedávna limitované na potlačanie symptómov a transplantáciu kostnej drene. V roku 2018 schválila Európska lieková agentúra použitie dlhodobej enzýmovej substitučnej terapie (ERT) ľudskou rekombinantnou α -manoizidázou. Včasné nasadenie ERT efektívne spomaľuje vývin miernej až stredne závažnej formy AM,

zlepšuje kvalitu života a znižuje hladiny ManOS v tkanivách [4].

Diagnóza sa určuje primárne stanovením enzýmovej aktivity pomocou kolorimetrie a fluorimetrie. Detekcia charakteristických ManOS v moči, napr. prostredníctvom tenkovrstvovej chromatografie, vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC), hmotnostnej spektrometrie (MS), či nukleárnej magnetickej rezonancie (NMR), je iba sugestívnou diagnostickou metódou, ktorá by mala byť doplnená celoexómovým sekvenovaním pre vylúčenie falošne pozitívnych výsledkov. Tieto metódy je však možné využiť na monitorovanie zmien hladín biomarkerov pri hodnotení vývinu ochorenia a účinnosti terapie [4, 5, 6].

Cieľom práce bolo zhodnotiť účinnosť ERT alfa-manozidózy na základe sledovania zmien hladín ManOS v moči v priebehu terapie prostredníctvom MS a HPLC s fluorescenčnou detekciou (FLD). Koncentrácia biomarkerov úzko súvisí so závažnosťou AM, celkovým stavom pacienta, ako aj odpoveďou na terapiu. Monitorovanie účinnosti terapie je dôležitou súčasťou dlhodobej starostlivosti o pacienta, pretože postupom času môže dochádzať k znižovaniu efektivity a zhoršeniu stavu [7, 8].

Materiál a metódy

V práci boli použité tri vzorky moču detskej pacientky odobraté pred nasadením ERT, po jednom mesiaci ERT a po štyroch mesiacoch ERT. Ako negatívna kontrola boli použité dve vzorky moču zdravých jedincov. Vzorky boli poskytnuté Národným ústavom detských chorôb v Bratislave. Ako kalibračné štandardy boli použité roztoky ($c_m = 5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) maltotetraózy (Hex4) a maltohexózy (Hex6). Zo vzoriek bolo v troch opakovaniach odobraté množstvo zodpovedajúce 10 μg kreatinínu a doplnené na 1 ml ultračistou vodou. Roztoky štandardov boli zriedené ultračistou vodou v pomere 1:99. Vzorky a štandardy boli prečistené pomocou extrakcie na pevnej fáze (SPE) kolónami Supelclean LC-18 SPE a Supelclean ENVI-Carb SPE so 100 mg náplňou.

Po vysušení vo vákuovom koncentrátore boli oligosacharidy fluorescenčne označené 2-aminobenzamidom (2-AB). 5 mg 2-AB bolo rozpustených v 100 μl roztoku ľadovej kyseliny octovej a dimetylsulfoxidu (DMSO) v pomere 3:7. Celý objem výsledného roztoku bol pridaný k 6 mg kyanobórohydridu sodného (NaBH_3CN) a do každej vzorky bolo napipetovaných 5 μl . Po trojhodinovej inkubácii pri 65°C bolo k vzorkám pridaných 700 μl acetonitrilu (ACN) a pre odstránenie nadbytku fluorescenčnej značky boli vzorky prečistené prostredníctvom SPE na základe hydrofilnej interakčnej chromatografie (HILIC) v 96-jamkovej platni Strata NH_2 (55 μm , 70 Å, 50 mg). Eluát bol odparený vo vákuovom koncentrátore a rozpustený v 100 μl

ultračistej vody.

Kvalitatívne boli vzorky analyzované prostredníctvom MS s laserovou desorpciou a ionizáciou za účasti matrice (MALDI-TOF). Na MALDI platňu bolo nanesených 0,7 μl roztoku kyseliny 2,5-dihydroxybenzoovej (DHB) rozpustenej v roztoku 30% ACN, 0,1% TFA, 1 mM NaOH ($c_m = 20 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 0,7 μl vzorky. Po vysušení spotu boli vzorky analyzované MALDI-TOF/TOF hmotnostným spektrometrom UltrafleXtreme II (Bruker Daltonics, Nemecko) v reflektónovom pozitívnom iónovom móde v rozsahu 500-3000 m/z . Hmotnostné spektrá boli spracované v programe FlexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics, Nemecko).

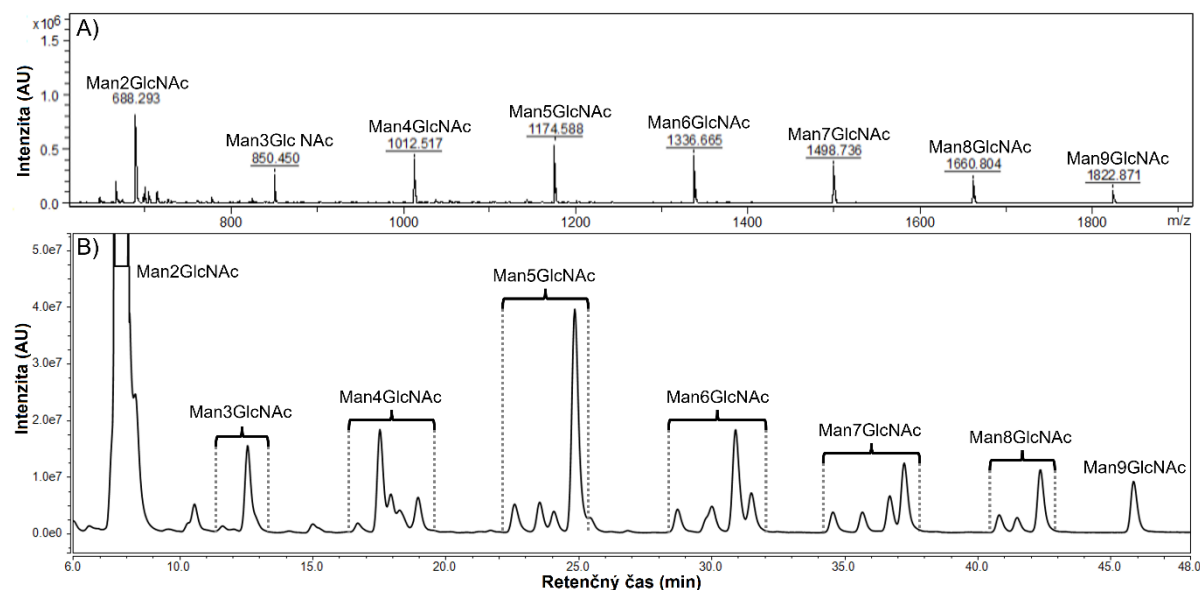
Kvantitatívne boli hladiny ManOS stanovené prostredníctvom HPLC-FLD systémom Accela (Thermo Fisher Scientific, USA) s fluorescenčným detektorom Dionex UltiMate 3100 (Thermo Fisher Scientific, USA) pri excitačnej vlnovej dĺžke 250 nm a emisnej vlnovej dĺžke 430 nm. Separácia prebiehala pri 60°C na kolóne ACQUITY UPLC BEH Amide Column, 130Å, (1.7 μm , 2.1 mm x 150 mm) s predkolónou ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide VanGuard (130 Å, 1.7 μm , 2.1 mm x 5 mm). Pri chromatografickej separácii boli využité dve mobilné fázy (MF): 100 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ mravčan amónny (A) a ACN (B) pri prietoku 0,4 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Analyty boli separované v gradientovej elúcii 90% - 65% MF B počas 36 minút.

Z roztokov značených štandardov bol zhotovený kalibračný rad s koncentráciou 5-250 $\text{nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, ktorý bol zmeraný v troch opakovaníach. Chromatogramy boli vyhodnotené programom Chromeleon 7.2.10 (Thermo Fisher Scientific, USA). Z kalibračných meraní bola zhotovená rovnica priamky a vypočítané limity detekcie (LOD) a kvantifikácie (LOQ). Vzorky boli pred finálnou analýzou nariadené roztokom 70% ACN : 30% MF A tak, aby intenzita signálu spadala do lineárneho dynamického rozsahu.

Výsledky a diskusia

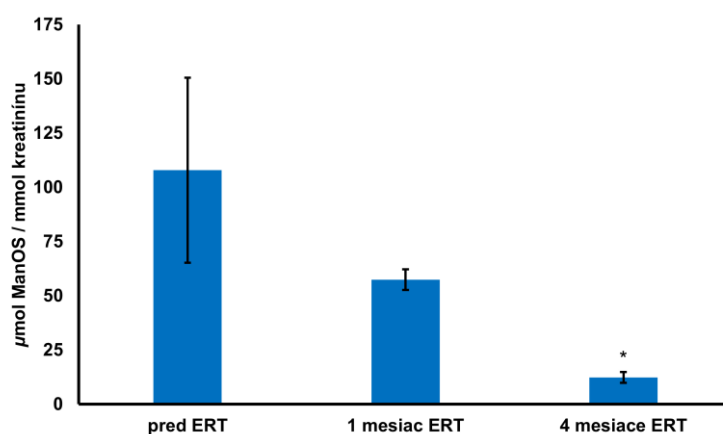
Vo vzorkách negatívnej kontroly neboli detegované ManOS ani jednou z použitých metód. Na základe kalibračných meraní boli vypočítané LOD a LOQ pre oba štandardy: LOD (Hex4) = 0,414 $\text{nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$; LOQ (Hex4) = 1,25 $\text{nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$; LOD (Hex6) = 0,357 $\text{nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$; LOQ (Hex6) = 1,08 $\text{nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Lineárny dynamický rozsah pre oba štandardy bol 5-250 $\text{nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Prostredníctvom MALDI-TOF boli detegované ManOS s dvoma až deviatimi manóзовými jednotkami a jedným N-acetylglukozamínom (Man2-GlcNAc – Man9GlcNAc), charakteristické pre AM, čo je v súlade s publikovanou literatúrou [9]. Ich identita bola potvrdená tandemovou MALDI-TOF/TOF MS. ManOS boli separované na chromatografickej kolóne podľa počtu manóзовých jednotiek. Čiastočne až úplne boli separované aj jednotlivé polohové izoméry. Reprezentatívne hmotnostné spektrum a

chromatogram sú znázornené na Obr. 1.



Obr. 1. Reprezentatívne hmotnostné spektrum (A) a chromatogram (B) vzorky pred terapiou. Ohraničené píky zodpovedajú polohovým izomérom jednotlivých oligosacharidov. Man – manóza; GlcNAc – N-acetylglukozamín

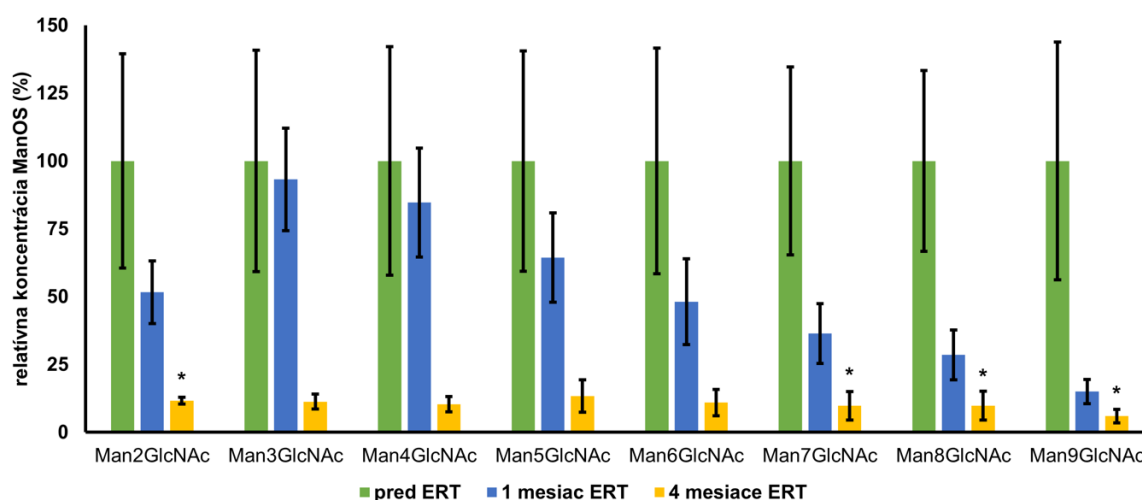
Na základe plôch pík v chromatogramoch a použitím rovnice priamky bola vypočítaná koncentrácia jednotlivých analytov. Koncentrácie ManOS boli vyhodnotené ako súčet relatívnych koncentrácií polohových izomérov daného oligosacharidu v jednotke $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatinínu. Celkový obsah ManOS vo vzorkách bol vypočítaný ako súčet koncentrácií všetkých detegovaných ManOS (Obr. 2). Pre zhodnotenie účinnosti ERT boli dáta porovnané jednostranným párovým t-testom ($\alpha = 0,05$).



Obr. 2. Zmeny v celkovom obsahu manózových oligosacharidov počas enzýmovej substituenej terapie.
n = 3; chybové úsečky znázorňujú ± 1 SD; * = $p \leq 0,05$

Celkový obsah ManOS pred ERT je v súlade s publikovanou literatúrou [7]. Pozorovaný pokles koncentrácie o 88,6% je vyšší, ako ako bol pozorovaný pri klinickom testovaní (54,1%) [10] a pri analýze vzoriek 7-mesačného pacienta podstupujúceho ERT (67%) [8]. Tento rozdiel môže byť spôsobený odlišnou odpoveďou na ERT, vekom, závažnosťou AM, reziduálnou enzýmovou aktivitou či potlačením ERT imunitným systémom.

Pri hodnotení zmien v koncentrácii individuálnych ManOS boli hodnoty vyjadrené relatívne ku koncentráciám vo vzorke pred nasadením terapie (Obr. 3). Vo všetkých vzorkách bol ako najviac zastúpený oligosacharid identifikovaný Man2GlcNAc. Rapídnejší pokles oligosacharidov s vyšším počtom manózových jednotiek je v súlade s publikovanou literatúrou [8] a môže byť spôsobený konverziou vyšších ManOS na nižšie vplyvom aktivity rekombinantného enzýmu.



Obr. 3. Relatívne zmeny v hladinách jednotlivých manózových oligosacharidov počas ERT. Man – manóza, GlcNAc – N-acetylglukozamín; n = 3; chybové úsečky znázorňujú ± 1 SD; * = $p \leq 0,05$

Záver

V práci bola využitá optimalizovaná metodika fluorescenčného značenia vzoriek a HPLC-FLD kvantitatívnej analýzy manózových oligosacharidov v moči na evaluáciu účinnosti enzýmovej substitučnej terapie alfa-manozidózy. Po štyroch mesiacoch terapie bol pozorovaný štatisticky významný pokles celkovej hladiny ManOS, ako aj pokles relatívnych koncentrácií jednotlivých manózových oligosacharidov, ktorých prítomnosť v moči je špecifická pre toto ochorenie. Táto metóda je vhodná pre dlhodobé monitorovanie hladín biomarkerov v moči pacientov, ktorí podstupujú ERT, ako súčasť komplexnej starostlivosti. Táto metóda bude v budúcnosti využitá na monitorovanie ERT ďalších pacientov.

PodĎakovanie

Táto práca bola podporená Ministerstvom zdravotníctva SR v rámci projektu s registračným číslom 2019/7-CHÚSAV-4, APVV-18-0336, a grantom VEGA 2/0060/21. Táto práca vznikla vĎaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná štruktúra pre projekt ITMS 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Na práci sa podieľali členovia European Reference Network for Rare Hereditary Metabolic Disorders (MetabERN) - Project ID No. 739543.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Paciotti S., Codini M., Tasegian A., et al. (2017) Front. Biosci. – Landmark 22(1), p. 157
- [2] Malm D., Nilssen Ø. (2008) Orphanet J. Rare Dis. 3(1):21
- [3] Poupětová H., Ledvinová J., Berná L., et al. (2010) J. Inherit. Metab. Dis. 33(4), p. 387
- [4] Ceccarini, M. R., Codini, M., Conte, C., et al. (2018) Int. J. Mol. Sci. 19(5), p. 1500
- [5] Semeraro, M., Sacchetti, E., Deodato, F., et al. (2021) Orphanet J. Rare Dis. 16(1), p. 24
- [6] Casado, M., Ferrer-López, I., Ruiz-Sala, P., et al. (2017) Rev. Anal. Chem. 36(3), p. 20160019
- [7] Beck M., Olsen K. J., Wraith J. E., et al. (2013) Orphanet J. Rare Dis. 8(88)
- [8] Santoro L., Zampini L., Padella L., et al. (2020) JIMD Rep. 55(1), p. 15
- [9] Bonesso L., Piraud M., Caruba C., et al. (2014) Orphanet J. Rare Dis. 9(19)
- [10] Borgwardt L., Dali C. I., Fogh J., et al. (2013) J. Inherit. Metab. Dis. 36(6), p. 1015

Microarray Optimizations for High-Throughput Glycoprofiling of Cancer Sera

Paras H. Kundalia¹, Kristína Kianičková¹, Lucia Pažitná¹, Branislav Bystrický², Jaroslav Katrlík¹

¹*Institute of Chemistry of Slovak Academy of Sciences, v. v. i., Department of Glycobiotechnology, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovak republic; chempars@savba.sk*

²*Faculty Hospital Trenčín, Oncology Department, Legionárska 28, 911 71 Trenčín, Slovak republic*

Abstract

Aberrant glycosylation is one of the characteristic hallmarks of cancer with increased sialylation, increased branched-glycan structures and overexpression of core fucosylation being some of the prominent manifestations. Serum-based biomarkers indicative of cancer are the most desirable form of biomarkers that can be used for personalized daily care in screening, early and rapid diagnosis, establishing prognosis, monitoring treatment, and detecting relapse in cancer patients. Microarrays have been the sole analytical platform, since their development in the past two decades, for analyzing carbohydrate-mediated recognition events in a high-throughput manner. Several factors influence the final readout of these binding events. Here we demonstrate the optimization of one of the key extrinsic parameters in glycoprofiling using glycoprotein-based glycan arrays namely buffer composition and incubation timing. The optimized conditions were then adopted to glycoprofile 28 breast and 16 lung cancer patients' sera.

Keywords: *Microarray, glycoprofiling, high-throughput, lectin, glycan, cancer, diagnostics*

Introduction and Objectives

Glycosylation happens to be a canonical and multifaceted co- and posttranslational modification in eukaryotes. It plays a ubiquitous role in regulating several physiological and pathological functions throughout the lifespan of an organism [1]. Erroneous and defective glycosylation machinery can lead to severe medical consequences and may also prove to be fatal [2]. Anomalies in glycosylation patterns, majority of the times are associated with malfunctioning of the glycosylation machinery which is often a manifestation of pathological condition. Therefore, faulty glycosylation also happens to be an anticipatory outcome of several pathological abnormalities encompassing the likes of diabetes mellitus, autoimmune diseases, anemia and happens to be a classical hallmark of various cancers [3 – 6]. Aberrant glycosylation in cancer demonstrates increased sialylation, increased branched-glycan structures and overexpression of core fucosylation being some of the prominent manifestations.

Serum based biomarkers indicative of cancer are the most desirable form of the biomarkers that can be used for personalized daily care in screening, early and rapid diagnosis, establishing prognosis, monitoring treatment, and detecting relapse in cancer patients.

Considering the colossal diversity demonstrated by glycans, high-throughput methods of glycoprofiling become a mandate for screening aberrancies in glycosylation. Glycans and corresponding carbohydrate-binding proteins or lectins prove to be instrumental in high-throughput glycoprofiling by protein-based glycan arrays. Microarray has been the sole analytical platform, since their development in the past two decades, for analyzing carbohydrate-mediated recognition events in a high-throughput manner [7, 8]. Several factors influence the microarray analyses these carbohydrate-glycan binding proteins (GBPs) [9]. Several factors influence the final readout of these binding events. Here we demonstrate the optimization of one of the key extrinsic parameters in glycoprofiling using glycoprotein-based glycan arrays namely buffer composition and incubation timing. The optimized conditions were then adopted to glycoprofile 28 breast and 16 lung cancer patients' sera.

Materials and methods

All analyzed serum samples were diluted in PBS to the same concentration (100 $\mu\text{g/mL}$), transferred into the 384-well microtiter plate and spotted to the epoxy microarray slides (NEXTERION Slide E, Schott, Germany) in triplicates or pentaplicates (based on the analysis). Each spot consisted of one (1 drop $\approx$ 0.5 nL) using a non-contact piezoelectric sciFLEXARRAYER S1 microarray spotter and piezo dispense capillary PDC 80, PDC 90 (type 3, 4) (Scienion AG, Berlin, Germany) at the temperature of source plate of 11 °C and humidity of 55 %. The printing was performed into 8 identical subarrays for buffer optimization experiments as well as cancer sera glycoprofiling. For buffer optimization experiments control serum samples (Thermo Fischer AG) and fetuin were spotted in 5 different concentration (6.25-100 $\mu\text{g/ml}$) and 6 different volume configurations (1-7 drops). The buffer optimization experiments were also performed with 8 different buffer composition (Tab. 1) for blocking the slides. Slides with immobilized samples were incubated in the spotter for 8 hours with humidity increased to 60 %. Prepared slides were stored in the fridge until the next incubation steps. On the day of incubation, slides were taken out of the fridge and left for 30 mins to attain room temperature before the mask was attached. Unreacted epoxy groups were blocked with a solution of 1x Vector Carbo-free Blocking solution for 60 minutes at room temperature with gentle shaking. After washing the slides with PBS containing 0.1 % Tween-20 (PBST), 18 biotinylated lectins (purchased from Vector, Burlingame, USA, with exceptions of rPhoSL and rHEL which were kind gift from Dr. S. Kim, KRIBB, Jeonbuk, Korea) at concentrations of 25 $\mu\text{g/mL}$ in PBST were loaded into 8 subarrays for 60 minutes at room temperature with constant shaking. The slides were washed again with PBST and streptavidin-conjugated with a

fluorescent dye CF647 (Biotium, Hayward, USA) 0,5 µg/mL in PBST was loaded into 8 subarrays for 60 minutes at room temperature. The slides were thoroughly washed with PBST and distilled water, and the residual water was removed by centrifugation. Fluorescent signals were detected using InnoScan®710 fluorescent microarray scanner (Innopsys, Carbonne, France) at the wavelength of 635 nm with laser. The signals were analyzed by Mapix® software (Innopsys). The fluorescence of each spot was measured and corrected for the background signal, and the intensity of the specific interaction was expressed in arbitrary fluorescence units.

Results and discussion

Several studies focusing on various intrinsic factors like slide chemistry, linker chemistry, glycan density and presentation and several other aspects, influencing microarray analyses of glycan-lectin interactions have been performed in the past [9-13]. Further, studies analyzing extrinsic factors including various humidity conditions during microarray printing and buffer compositions have also been reported [14]. However, the influence of blocking buffer composition on the results of glycan and lectin arrays have been assumed to minimal or negligible [9]. Here we performed the blocking of epoxide coated slides printed with fetuin and control serum with different buffer composition as indicated in Tab. 1.

Tab. 1. Buffer Compositions Adopted – 8 different buffer combinations with water, bovine serum albumin (BSA), Tween 20 (T), phosphate buffered saline (PBS) and ethanolamine (Et-OH) were used.

	Buffer Composition	Buffer pH
Buffer 1	H ₂ O + 3 % BSA	7.03
Buffer 2	H ₂ O + 0.05 % T + 3 % BSA	7.03
Buffer 3	PBS + 3 % BSA	7.4
Buffer 4	PBS + 0.05 %T + 3 % BSA	7.4
Buffer 5	1X Vector	8.2
Buffer 6	Et-OH	Adjusted to 8
Buffer 7	Et-OH + 3 % BSA	Adjusted to 8
Buffer 8	Et-OH + 0.05 % T + 3 % BSA	Adjusted to 8

Based on the scanning measurements buffer 7 and 8 i.e., Et-OH with BSA showed the highest background signal on the epoxide coated slide surface. Buffer 1, 2 composed of water with BSA in presence and absence of tween also showed considerable degree of background signal. Buffer 3, 4 and 5 showed the least background noise signals in the descending order of 3 > 5 > 4. The unusually high signal in case of buffer 1, 2, 7 and 8 might be due to residual

BSA on the slide despite performing washing step with detergent (Tween 20). Regardless the buffer 4 showing the lowest background signal (Fig. 1A), we decided to continue with the commercially available buffer to perform blocking especially considering lower buffer composition variability as against our inhouse recipe of buffer 4. Shortlisting buffer 5 we further performed blocking time optimization at four different intervals of 45, 60, 90 and 150 minutes (Fig. 1B). Based on this we couldn't see any further decrease in the background intensities beyond 60 minutes and fixed our blocking time as 60 minutes. This demonstrated that blocking for 60 minutes with buffer 5 efficiently neutralized and cap all the unoccupied epoxide groups on the slide beyond which elaborated blocking duration had no influence in further reducing the background signal.

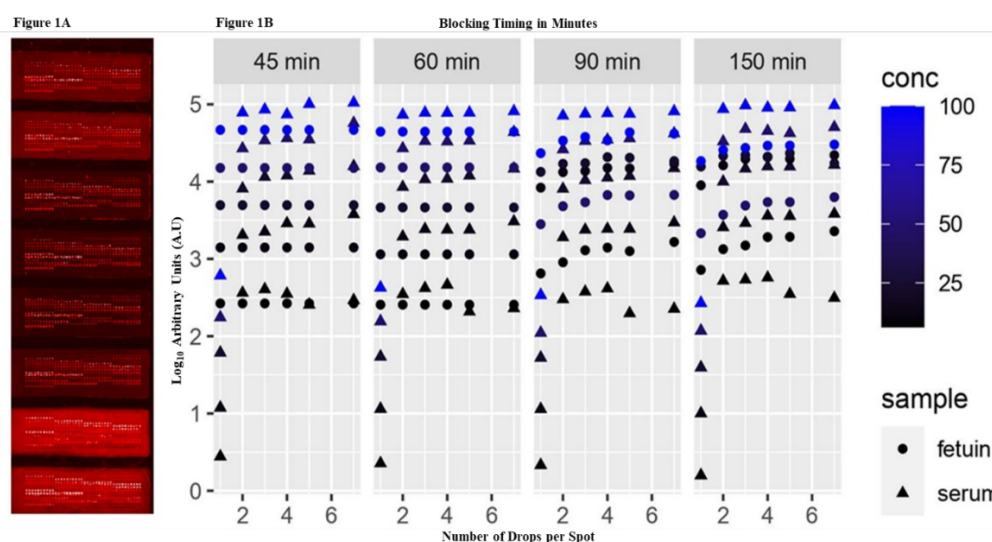


Fig. 1. Blocking Time Optimization – A) Scan image showing background intensities of respective buffers used for blocking; B) Plot showing background intensities of various drop and concentration combinations.

Adopting these blocking optimizations, we performed glycoprofiling of sera samples from patients with lung and breast cancer with a panel of 18 lectins with different sugar specificity. In the Fig. 2 are shown the results, and as it can be seen, a combination of α -galactose binding lectin GSL I-B4 (*Griffonia Simplicifolia* lectin I isolectin B4) and sialic acid specific lectin SNA (*Sambucus nigra* lectin) can help to detect and distinguish aberrant glycosylation patterns amongst these two types of cancer samples. Further microarray analyses with more lectins, mass spectrometric analyses to determine the definite glycan structures and statistical evaluations need to be performed to have definite set of lectins which can efficiently detect aberrant glycosylation patterns in these types of cancers and further aid in diagnosis and biomarker discovery.

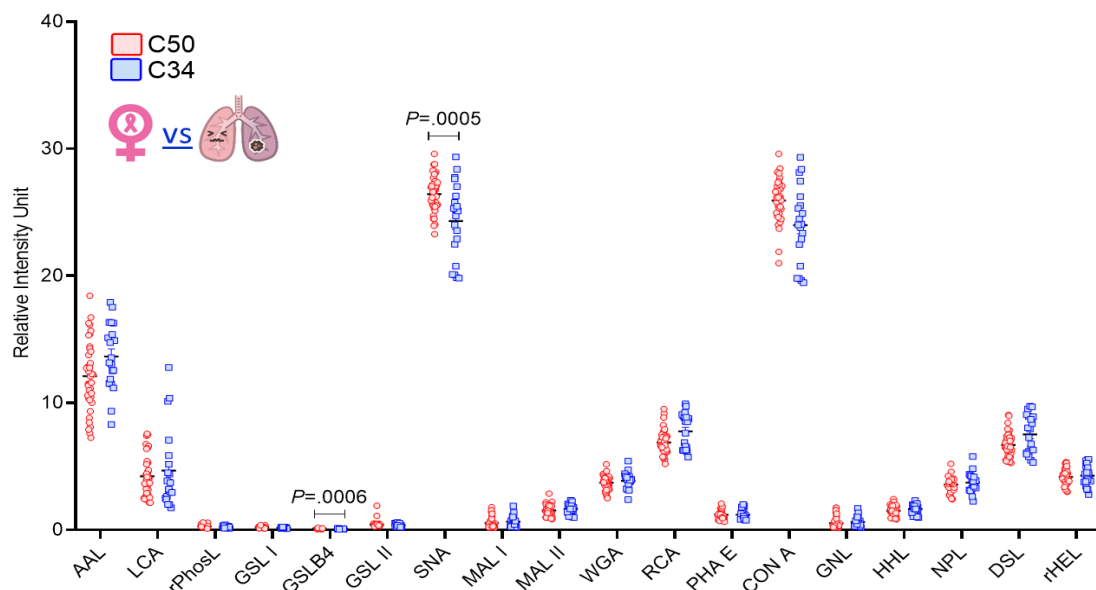


Fig. 2. Lectin-based glycoprotein microarray analyses of breast (red circles) vs. lung (blue squares) cancer sera – Signal intensities of interactions with lectins are in relative units. Statistically significant differences are shown for lectins with p-values < 0.001 (t-test).

Conclusion

This study demonstrates that optimization of blocking buffer composition and blocking duration depending on the slide surface chemistry can minimize background noise and enhance throughput while glycoprofiling using microarray. Further optimization studies analyzing both intrinsic, extrinsic factors as well as glycan/lectin array data analysis and data presentation will aid in devising a toolkit for microarray analyses and reducing lab-to-lab variations. Such optimizations can become a part standard operating procedure while designing microarray studies for glycoprofiling and can thereby enhance the efficiency of this platform and better apprehension of the glycoprofiling performed. The optimized conditions were applied to glycoprofile 28 breast and 16 lung cancer patients' sera, and glycoprofiling of next more than 200 cancer patients' sera with different types of cancer is in progress.

Acknowledgement

This publication is the result of the project implementation CEMBAM – Centre for Medical Bio-Additive Manufacturing and Research, ITMS2014+: 313011V358 supported by the Operational Programme Integrated Infrastructure funded by the European Regional Development Fund.

References

- [1] Varki A. (1996) *Glycobiology*. 3(2), p. 97
- [2] Freeze H. H. (2001) *Glycobiology*. 11(2), p. 129R
- [3] Štambuk T., Gornik I. (2021) *Adv. Exp. Med. Biol.* 1325, p. 285
- [4] Zhou X., Motta F., Selmi C. et al. (2021) *Autoimmun. Rev.* 20(5), p. 102804
- [5] Intra J., Limonta G., Cappellini F. et al. (2019) *Diabetes Metab. J.* 43(4), p. 539
- [6] Trbojević-Akmačić I., Vučković F., Pribić T. et al. (2023) *Commun. Biol.* 6, p. 312
- [7] Liu Y., Feizi T. (2008) *Glycoscience*. Springer, Berlin, Heidelberg, Germany
- [8] Katrlík J., Švitel J., Gemeiner P. et al. (2010) *Med. Res. Rev.* 30(2), p. 394
- [9] Temme J. S, Campbell C. T, Gildersleeve J. C. (2019) *Faraday Discuss.* 219, p. 90
- [10] Grant O. C., Smith H. M., Firsova D. et al. (2014) *Glycobiology*. 24(1), p. 17
- [11] Kilcoyne M., Gerlach J. Q., Kane M. et al. (2012) *Anal. Methods-UK*. 4(9), p. 2721
- [12] Padler-Karavani V., Song X., Yu H. et al. (2012) *J. Biol. Chem.* 287(27), p. 22593
- [13] Wang L, Cummings R. D., Smith D. F. et al. (2014) *Glycobiology*. 24(6), p. 507
- [14] Ruprecht C, Geissner A, Seeberger P. H., et al. (2019) *Carbohydr Res.* 481, p. 31

Cellulose Hydroxyapatite composite based on Cigarette Waste: Influence of Concentration onto ^{133}Ba Removal

Vipul Vilas Kusumkar¹, Michal Galambos¹, Eva Viglasova¹, Süleyman İnan²

¹*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Nuclear Chemistry, Ilkovicova 6, 842 15, Bratislava, Slovak republic; kusumkar1@uniba.sk*

²*Ege University Institute of Nuclear Sciences, 35100 Bornova-İzmir, Türkiye*

Abstract

The main aims of this study were cellulose–hydroxyapatite composite derived from cigarette filter preparation and its application onto ^{133}Ba removal from an aqueous solution. The cellulose extraction and preparation of modified cellulose from cigarette filters have been successfully achieved. The characterization of prepared material was performed by using FTIR and SEM analysis. The initial concentration of the Ba^{2+} ion on the adsorption capacity of the sorbent was performed. The monolayer sorption capacity was determined to be 2.92 mmol/g, and the experimental sorption data demonstrated greater alignment with the Freundlich model. Utilizing waste products to extricate valuable products can promote sustainable development and lessen environmental damage. The results of this research offer a quick and affordable technique for creating cellulose composites with outstanding Ba^{+2} ion adsorption properties from aqueous solutions.

Keywords: *cigarette filters; hydroxyapatite; cellulose nanocrystals; Barium ion*

Introduction

Cigarette litter is a rising issue in urban areas, according to statistics provided by WHO every day almost 967 million cigarettes were burned, which accounts for nearly 6.25 trillion cigarettes throughout 2012 [1,2]. Recycling cigarette litter into value-added products such as cellulose can mitigate environmental issues concerning cigarettes and can be an economically attractive method. The cigarette filters (CFs) are made up of mainly cellulose acetate which can be transformed into various forms of cellulose such as nanocellulose, cellulose nanocrystals (CNC), or micro-fibrillated cellulose etc. [3]. The modified cellulose can find applications in various research areas and new technologies [4]. CNCs are shown excellent adsorption capacity for heavy metal ions like copper, cobalt etc. [5]. Radionuclides generated from various human activities are a threat to both ecology and humans, ^{133}Ba is an important radionuclide due to its half-life of approximately 10.55 years and its ability to easily solubilize in water, which can lead to environmental contamination [6]. Hence, it is imperative to remove ^{133}Ba as it poses a significant threat to the surroundings. Cellulose composites have been utilized for the removal of various metal ions from aqueous solutions. Using cellulose extracted from cigarette waste offers the added advantage of simultaneously mitigating waste management issues concerning CFs as well as ^{133}Ba removal. However, extracted cellulose lacks the necessary adsorption and radiation tolerance capacities required for nuclear waste management [7]. To address this issue,

the modification of cellulose using hydroxyapatite (HaP), a known excellent adsorbent for metal ions and radiation-resistant material, can significantly improve the properties of cellulose and enhance its effectiveness for nuclear waste management[8]. In this work, we extracted cellulose from cigarette filters, modifies the extracted cellulose using hydroxyapatite using in situ chemical method, and prepared material used for removing Ba^{+2} ion from the aqueous solution.

Materials and methods

Materials

The chemicals used during the study were sodium hydroxide (NaOH), sulfuric acid (H_2SO_4), ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), Sodium chlorite (NaClO_2), di-ammonium hydrogen phosphate $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$, calcium nitrate tetrahydrate $[(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})]$, 25% ammonia solution (NH_4OH), hydroxyapatite, phosphoric acid (H_3PO_3) were with the pure chemical quality and obtained from Sigma Aldrich. Cigarette filters (CFs) were collected from public places near FNS CU.

Conditioning of CFs

The CFs were collected and washed multiple times with water to eliminate the ash and tobacco. After washing, the CFs were soaked in water and the charred tips were cut off. To prepare the CNC, acid hydrolysis was performed on the washed CFs followed by treatment with phosphoric acid, resulting in the production of phosphorylated CNC (P-CNC). Finally, the P-CNC was dried in an oven at 30°C for 24 hours.

Preparation of CNC-HaP composites

10 % of P-CNC was mixed in water, and 5.7g of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ was added. The solution pH was adjusted to ~ 10 and 1.6 g $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ was added dropwise in the solution the temperature was raised to 80°C for 5 hours at an 800-rpm ion magnetic stirrer. The prepared was neutralized using water. Then composite was dried and used for further studies.

Instrumentation and Sorption Experiments

Fourier Transform Infrared Spectroscopy was used to obtain spectra using the FTIR-ATR instrument in the $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ region. (FTIR). The surface morphology of the sorbent is examined, using scanning electron microscopy-energy dispersive X-ray spectrometry (SEM-EDS). The study used radioisotope indication to measure ^{133}Ba sorption on CNC-HaP under lab conditions. Different parameters were tested by combining 5mL of the aqueous phase with 0.05g of CNC-HaP using a laboratory extractor. The study was then performed on a sample of each supernatant using a Modumatic model gamma spectrometer with a NaI(Tl) detector. The

^{133}Ba sorption qualities of CNC-HaP were determined using Equations I & II:

Equilibrium concentration (C_{eq})

$$C_{eq} = \frac{C_0 \times a}{a_0} \quad (\text{I.})$$

Sorption capacity (q)

$$q = K_d \times C_{eq} \quad (\text{II.})$$

In the above equations, C_0 is the initial concentration (mol/L), C_{eq} is the equilibrium concentration (mol/L), V is the volume (mL), m is the mass of sorbent (g), a_0 is the initial volume activity of solution (mL/s), a is the equilibrium volume activity of solution (mL/s).

Results and discussion

Characterization studies

Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

In figure 1. we compared the spectra of CFs, CNC, P-CNC, CNC-HaP and commercial hydroxyapatite. The typical cellulose bonds are observed in all materials (CFs, CNC, P-CNC, CNC-HaP) in IR spectra for each material, at 3350cm^{-1} for the -OH groups, 2903 cm^{-1} for the $-\text{CH}_2$, 1639 cm^{-1} for the H-O-H due to moisture present in the sample, 1380cm^{-1} for the -CH, 1160 cm^{-1} for -C-O-C stretching, 1054 cm^{-1} for the -C-O-C- bending vibrations glycosidic units or from β -(1 $\rightarrow$ 4)-glycosidic bonds. CNC formation can be confirmed by hydroxy groups' presence around 3300 to 3380 cm^{-1} due to acid hydrolysis. To confirm the phosphorylation of CNCs, a band of 1268 cm^{-1} verifies P=O stretching mode; 986 cm^{-1} and 876cm^{-1} for P-OH can be observed in P-CNC. The sharp peak was observed at 1030 cm^{-1} in CNC-HaP and commercial HaP due to the PO_4^{3-} stretching mode.

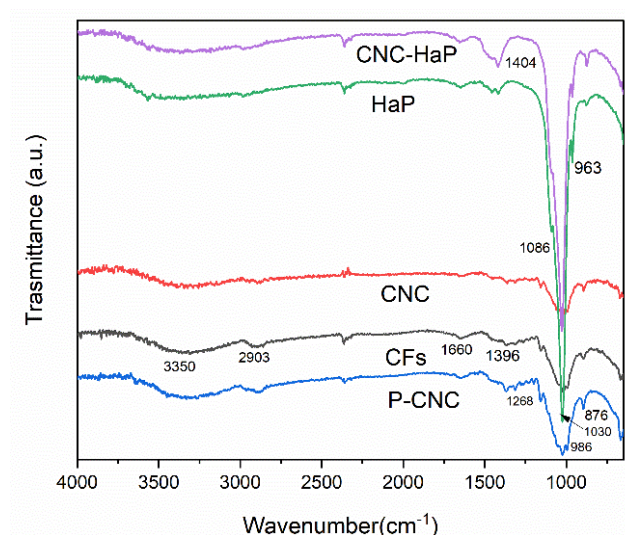


Fig. 1. FT-IR spectra of CFs, CNC, P-CNC, HaP, and CNC-HaP adsorbents

Scanning electron microscopy-energy dispersive X-ray spectrometry (SEM-EDS)

SEM examination was done to clarify the morphological characteristics of the prepared CNC-HaP. The surface of the CNC-HaP is irregular in size, and the shapes and agglomerates were randomly organized with smooth and low visible porosity (figure 2), SEM-EDS of composite shows the surface of the CNC covered with Calcium (Ca) and Phosphorus (P) indicating the formation of HaP.

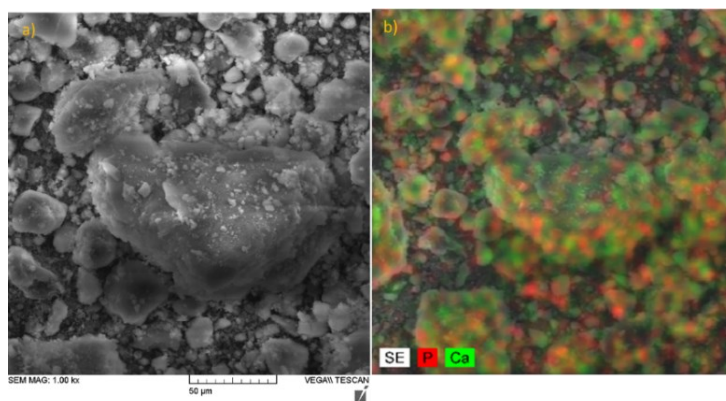


Fig.2. a) SEM image showing the morphology of CNC-HaP composite b) EDS image showing element distribution on the composite surface.

Influence of initial concentration of Ba²⁺ ion and the Isotherm analysis

The adsorption of Ba²⁺ ion in the concentration range from 1×10^{-5} to 5×10^{-2} mol/L on the CNC-HaP has been studied. The findings demonstrated that the uptake capacity of the sorbent grew along with the concentration of Ba²⁺ ions in the solution. Figure 3a shows that

the rate of capacity growth slowed down when the initial concentration was 5×10^{-2} mol/L, and the uptake capacity was estimated to be 2.59 mmol/g. Figure 3b. presents the sorption isotherm figure for Ba^{2+} .

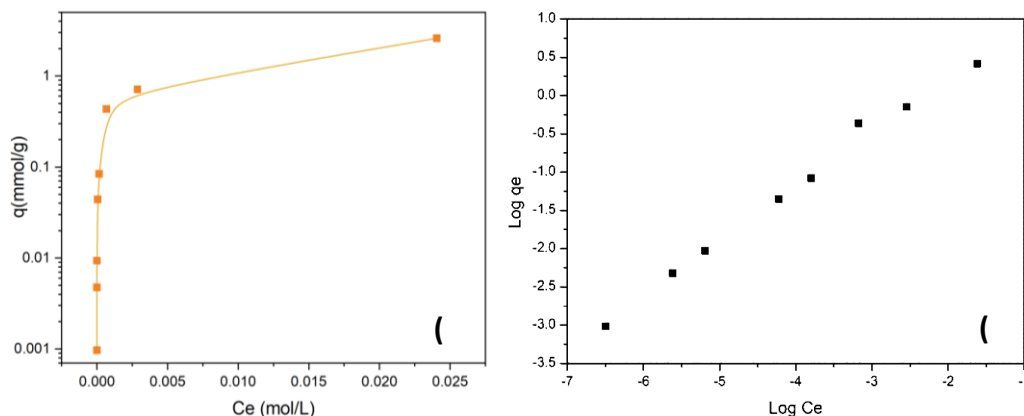


Fig. 3. (a) Influence of metal concentration on ^{133}Ba adsorption, (b) Freundlich isotherm model (initial pH 6.4; contact time: 180 min; dosage: 10 g/L; temperature: ambient conditions).

The Langmuir equation can be written as follows in its linearized version [9]:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{C_e}{q_m} + \frac{1}{q_m \times b} \quad (\text{III.})$$

In Eq. IV., q_m is the monolayer adsorption capacity (mol/g), q_e is the mole number of metal ions adsorbed at equilibrium (mol/g), C_e is the concentration of metal ions in the solution at equilibrium (mol/L), and b is the constant associated with the free energy of adsorption. Table 1. lists the Langmuir values and R^2 numbers. The Langmuir model was used to suit the experimental data, It was found that the highest monolayer barium sorption capacity was 2.92 mmol/g.

Tab 1. Langmuir and Freundlich isotherm model parameters.

Model	Parameter	Value
Langmuir	q_m (mol/g)	2.92×10^{-3}
	b	263
	R^2	0.915
Freundlich	$1/n$	0.72
	K_f	48.24
	R^2	0.993

The Freundlich model can be used to explain multilayer sorption on diverse surfaces [11]. It is expressed in linear form as follows:

$$\log q_e = \log K_f + \frac{1}{n} \times \log C_e \quad (\text{IV.})$$

In Eq.IV, the adsorption capacity is represented by the constant K_f (mol/g), and the adsorption strength is represented by the number $1/n$. The parameters $1/n$ and K_f had estimated values of 48.24 and 0.72, respectively.

Conclusion

In this work, we successfully extracted cellulose from waste cigarette filters. The cellulose was obtained to prepare a composite of cellulose and hydroxyapatite to remove Ba^{2+} ions in the solution. The efficiency of CNC extracted from wasted cigarette butts was improved by modifying the CNC with the surface-grown hydroxyapatite using in situ wet chemical method. The confirmation of the CNC-HaP Composite was verified using FT-IR spectroscopy whereas its morphology was examined using SEM, showing the homogeneous distribution of HaP on its surface. Langmuir and Freundlich's isotherm models were also performed to understand the adsorption equilibrium of the composite. The experimental sorption data showed better agreement with the Freundlich model, the monolayer sorption capacity was found to be 2.92 mmol/g. The findings show the preparation of a CNC-HaP composite with excellent adsorption capacity for Ba^{2+} ions from an aqueous solution.

References

- [1] Ng M., Freeman M. K., Fleming T. D., et al. (2014) Jama. 311, p. 183
- [2] W. H. O. (2017) Tobacco and its environmental impact: an overview World Health Organization
- [3] Kostag M., Gericke M., Heinze T., et.al. (2019). Cellulose. 26, p. 139
- [4] Sharma A., Thakur M., Bhattacharya M., et.al. (2019) Biotech. Rep.2, p.e00316
- [5] Burba P., Willmer P. G.,(1983). Talanta, 30(5), p381
- [6] Workman J. B.,(1977). The relevance of barium releases to problems of the nuclear environment, Topical Report
- [7] Askarieh M. M., Chambers A. V., Daniel F. B., et. al.(2000) Waste Manag. 20(1), p.93
- [8] Zhou J., Kirk M., Baldo P., et. al. (2021) Jour. of Nucl. Mater. 557, p. 153271
- [9] Langmuir I., (1918) J. Am. Chem. Soc. 40, p. 1361

Influence of pH onto ^{137}Cs and ^{133}Ba removal by montmorillonite/biochar composite

Brian Liška¹, Eva Viglašová¹, Vipul Vilas Kusumkar¹, Michal Galamboš¹

¹*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Nuclear Chemistry, Ilkovičova 6, 842 15, Bratislava, Slovakia; liska45@uniba.sk*

Abstract

The aim of this study is to investigate the influence of pH onto the ^{137}Cs and ^{133}Ba removal from modeled solution by using biochar sorbents modified with montmorillonite. This research discusses the importance of disposal of radioactive waste generated by nuclear power plants, particularly the pollutants ^{133}Ba and ^{137}Cs . The accumulation of these radioactive materials in humans can cause serious health problems. The process of adsorption is a widely used method to minimize the impact of radioactive waste, with biochar being a promising and cost-effective adsorbent for various contaminants in liquid wastes, and soils. To further improve the sorption properties, two biochar/montmorillonite composites were produced and synthesized using bamboo and corn cobs as biomass. The maximum adsorption capacity achieved by bamboo/corn cobs-based biochar composites was at pH 4 for ^{133}Ba and pH 8 for ^{137}Cs . By results both biochar/montmorillonite composites are pH dependent and exhibit good sorption capacities and can be used for ^{137}Cs and ^{133}Ba removal from radioactive waste.

Keywords: Biochar; Montmorillonite; Composite; Cesium; Barium; Sorption

Introduction

Many countries are turning to nuclear energy as a substitute for fossil fuels due to the increasing global energy demand and concerns about climate change. Nevertheless, the radioactive waste generated by nuclear power plants presents an extremely difficult challenge for proper management and can cause severe harm to the environment if not disposed of correctly³. During the last decades, there has been a growing focus on adequately managing and disposing of radioactive waste, particularly after unexpected incidents such as the Chernobyl and Fukushima-Daiichi accidents. These events resulted in significant pollution of aquatic ecosystems, including seawater, surface water, and groundwater, as well as contamination of agricultural products by radioactive materials [1; 2].

The ^{133}Ba , ^{60}Co , ^{90}Sr , and ^{137}Cs are radioactive products, found in the radioactive wastes produced from nuclear power plants and research reactors. They are of concern due to their relatively long half-life times and the danger they possess to a living organism. Among these, ^{137}Cs and ^{90}Sr are the most common radioactive pollutants produced by nuclear power plants and contribute significantly to radioactivity [1; 3].

The ^{137}Cs isotope is one of the most common radioactive pollutants generated by nuclear power plants [1]. Typically found in cationic form in aqueous solutions, Cs is highly mobile in soils and has the ability to concentrate and accumulate in food chains [4]. As such

Cs can easily accumulate for prolonged duration in plants, humans and other animals because Cs is chemically similar to potassium (K) and possess a long half-life of 30.23 years [1;3]. While stable Cs isotopes have little impact on human health, uptake of its radioactive isotopes, released by nuclear weapons tests or nuclear power plant accidents can cause severe health problems, and even death [5].

The radioactive Ba isotopes, which are fission fragments, have relatively short half-lives and are of minor environmental significance. The most significant of these isotopes is ^{133}Ba with a half-life of 10.7 years [2]. Radioactive Ba^{2+} ion is recognized as one of the primary radioactive products of nuclear fission included in the radioactive wastes produced from nuclear power plants and research reactors due to their relatively long half-life. This radionuclide emits gamma rays, which are harmful to living organisms. Furthermore, the high solubility of radioactive Ba^{2+} ions in aqueous solutions allows them to be easily accumulated into human bodies and aquatic organisms through the food chains. Which may offer major threat for human health and ecological system, causing diseases and disorders [1].

Based on these reasons, removal of ^{137}Cs and ^{133}Ba from contaminated water is essential for the effective disposal of radioactive liquid waste generated during the operation of nuclear power plants and for the remediation of contaminated waters, such as groundwater and seawater [1; 6].

Researchers have introduced numerous technologies such as adsorptive separation, vaporization, electro-coagulation, sedimentation, membrane separation, ion-exchange, and solidification to minimize the impact of radioactive waste [7]. Despite the availability of multiple methods, adsorption techniques have been applied widely in environmental remediation because of their inexpensive setup, simple operation, absence of by-product generation, and scalability [1].

Biochar is a promising and cost-effective adsorbent for various contaminants in liquid wastes, aqueous solutions, and soils [7]. Biochar is a carbon-rich porous material, produced by pyrolysis of agricultural by-products and wastes under low oxygen conditions. Biochar is known to have the ability to adsorb organic and inorganic compounds, including heavy metals, and has been used for remediation of polluted soil [2]. The properties of biochar are determined by several factors, including the feedstock source, preparation conditions and the synthesis method or technique employed [8]. These factors affect various properties namely the surface functional group, charge on the surface, pH, porous nature, and specific surface area. All these properties are largely responsible for the adsorption efficiency of biochar. As a result of these factors, biochar is considered a cost-effective and efficient approach for eliminating water

contaminants [9]. However, the removal efficiency of unmodified biochar is insufficient for practical applications [7]. Therefore, engineered biochar has been developed by using various physical and chemical modifications. The improved physicochemical properties of engineered biochar make it a desirable option for removing radioactive substances from nuclear wastewaters [1].

The combination of biochar and clay has gained popularity as an effective method for removing pollutants, as it enhances biochar's structure and sorption characteristics. Clay minerals are an abundant and inexpensive natural resource that possesses high surface area, cation exchange capacity, and structural properties. Among the various types of clay materials, montmorillonite (MMT) is the most extensively studied. MMT is composed of layers of one octahedral and two tetrahedral sheets, forming an irregular lamellar crystal structure. The fine particles of MMT are not suitable for water treatment, but when incorporated into a composite with biochar, MMT can be well-supported by the good porous structure of biochar. Moreover, MMT can contribute exogenous metal atoms such as aluminum and magnesium that can react with biochar, resulting in the formation of a high-performance biochar complex. The composite utilizes the good sorption capacity of both biochar and MMT, making it a low-cost and efficient sorbent [10;11].

One of the key parameters affecting sorption of contaminants is pH, which directly affects the biochar surface. This is related to the oxygen-containing functional groups, which are pH-dependent. The electrostatic interaction between sorbates and sorbents mainly depends on both their surface charges. Consequently, the surface charge and ionization on the biochar surface are pH dependent, leading to different sorption capacity for the removal of given contaminants [12].

The objective of this work is to study the influence of pH onto ^{137}Cs and ^{133}Ba removal from radioactive waste using biochar sorbents modified with montmorillonite.

Materials and methods

Sorption experiments: The sorption of Ba and Cs on bamboo composites was performed by the radioisotope indication method using a radioisotope ^{133}Ba and ^{137}Cs . A batch method was used in static arrangement of experiment under the aerobic conditions at laboratory temperature. The influence of pH on the Ba^{2+} and Cs^{+} ions sorption in the pH range from 3 to 9 was analyzed. The pH was adjusted by 0.1 M HCl and 0.1 M NaOH solutions. Samples were prepared by adding 0.05g of sorbent to 5ml of aqueous phase. Aqueous phase consisted of 0.05ml of radiotracer ($^{133}\text{Ba}/^{137}\text{Cs}$) and 0.05ml of respective ion solution ($\text{BaCl}_2/\text{CsCl}$) and

4.9ml of prepared solutions at different pH. Prepared samples were mixed on rotary mixer at a constant speed for two hours. After the mixing, the samples were filtrated through PTFE 0.45 μm filters using syringe. Filtrate was collected inside plastic tubes and analyzed with a modumatic model gamma spectrometer equipped with a NaI(Tl) detector.

Results and discussion

With the use of corn cob and bamboo-based composites, we were able to adsorb ^{133}Ba and ^{137}Cs relatively good. There were 7 samples analyzed for each sorbent and radiotracer. In the Fig. 1 we can see the influence of pH on the sorption of Ba^{2+} and in Fig.2 on the sorption of Cs^+ ions onto both composites. For Ba, the percentage of sorption reached the highest capacity at $\text{pH} \sim 4$. Corn cob composite had the highest sorption capacity around 26% and for bamboo composite the highest sorption capacity was around 72%. The Cs sorption was much more stable. In this case sorption peaked for both sorbents at the $\text{pH} \sim 8$. Adsorption capacity for corn cob composite was around 67% and for bamboo-based composite it was around 73%.

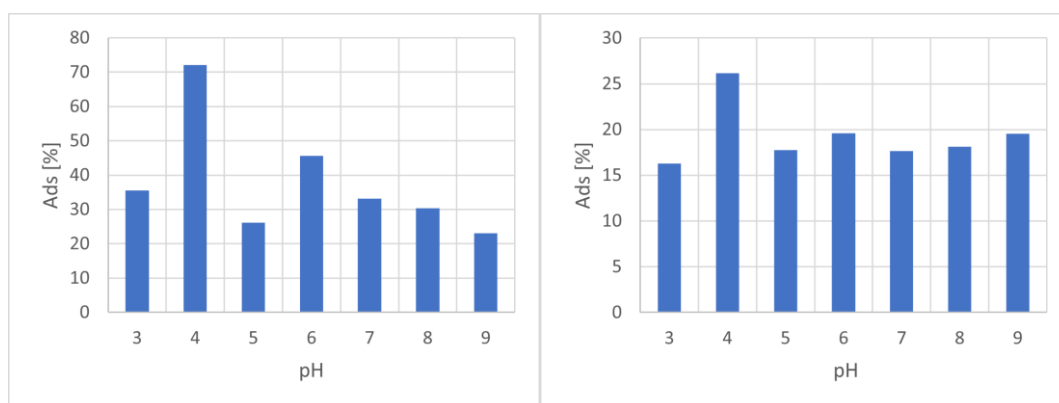


Fig. 1. Effect of pH on the sorption of Ba^{2+} ions using bamboo composite (left) and corn cob composite (right).

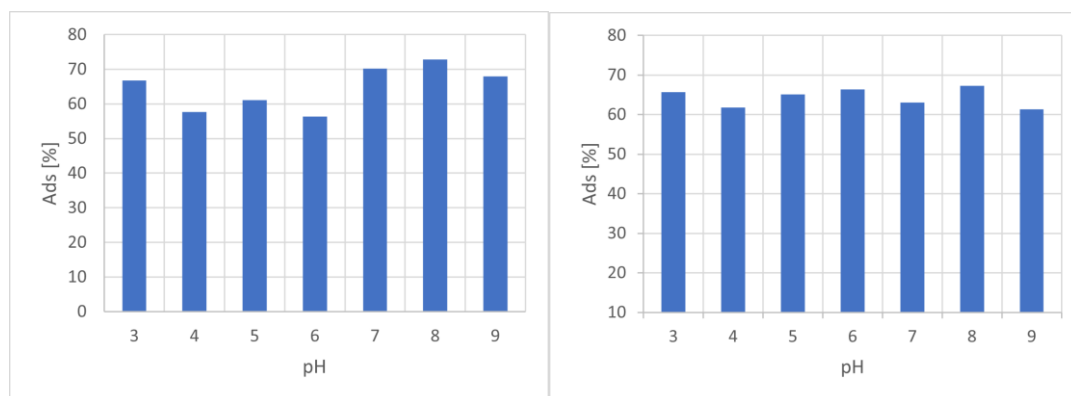


Fig. 2. Effect of pH on the sorption of Cs^+ ions using bamboo composite (left) and corn cob composite (right).

Conclusion

In this study, the sorption dependence of pH onto the ^{133}Ba and ^{137}Cs removal by biochar/montmorillonite composites was investigated. Sorption studies were performed in the pH range from pH 3 to pH 9. The results showed that sorption of Cs^+ was affected by pH, but not noticeably. In the case of Ba^{2+} the effect of pH was significant, mainly at pH 4, where the sorption is much higher. Although, the biochar composite prepared from corn cob as biomass might not be suitable for removal of ^{133}Ba , based on the sorption capacity, which was low. Overall, our study demonstrates the potential of corn cob/bamboo-based biochar modified by montmorillonite, as a promising sorbent for the removal of radionuclides and provides insights onto the factor which has an influence onto the sorption performance.

References

- [1] Shin J., Kwak J., Lee Y. G., et al. (2021) *Environ. Res.* 199, p. 111346
- [2] Kimura K., Hachinohe M., Klasson K. T., et al. (2014) *Food Sci. Technol. Res.* 20(6), p. 1183
- [3] Palansooriya K. N., Yoon I. - H., Kim S. - M., et al. (2022) *Environ. Res.* 214(4), p. 114072
- [4] Noli F., Fedorcea V., Misaelides P., et al. (2021) *Appl. Radiat. Isot.* 170, p. 109600
- [5] Rai H., Kawabata M. (2020) *Front Plant Sci.* 11, p. 528
- [6] Yang H. - M., Woo Park C., Kim I., et al. (2020) *Appl. Surf. Sci.* 536, p. 147776
- [7] Khandaker S., Chowdhury M. F., Awual M. R., et al. (2020) *Chemosphere.* 262, p. 127801
- [8] Dwivedi S., Dey S. (2022) *Int. J. Environ. Sci. Technol.* p. 1735
- [9] Praveen S., Jegan J., Bhagavathi Pushpa T. et al. (2022) *Biochar* 4(1), p. 10
- [10] Wang P., Stenrød M., Wang L., et al. (2022) *Front. Environ. Sci.* 10, p. 494
- [11] Yao Y., Gao B., Fang J., et al. (2014) *Chem. Eng. J.*, 242, p. 136
- [12] Ambaye T. G., Vaccari M., van Hullebusch E. D., et al. (2020) *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 18(10), p. 3273

Glykomická a proteomická analýza extracelulárnych vezikúl zo séra

Veronika Lukáčová^{1,2}, Zuzana Pakanová¹, Matúš Jurčík², Peter Baráth^{1,2}

¹*Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Centrum glykomiky, Oddelenie glykobiológie, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika;*

veronika.lukacova@medirexgroup.sk

²*Medirex Group Academy n.o., Novozámocká 1/67, 949 05 Nitra, Slovenská republika*

Abstract

Glycomic and proteomic analysis of extracellular vesicles from serum

Extracellular vesicles are heterogeneous, membrane-bounded structures released by almost all cell types. They contain proteins, lipids, and nucleic acids, and thus provide essential information about the state of their cell of origin. Extracellular vesicles are involved in many physiological and pathophysiological processes in the organism. Their composition and participation in different biological processes make them useful tools for identifying biomarkers of various diseases. The aim of presented work was to determine the differences in the proteomic and glycomic composition of extracellular vesicles compared to serum using mass spectrometry. In total, we were able to identify 188 proteins. Up to 27 of the 41 proteins with elevated levels compared with serum (FDR < 0.05) had an annotation for extracellular vesicles. Glycomic analysis revealed raised levels of high mannose and monosialylated structures in extracellular vesicle samples. These observations provide the basis for a systematic analysis of endometrial carcinoma.

Keywords: *extracellular vesicles; mass spectrometry; proteins; glycans*

Úvod a formulácia cieľa

Termín extracelulárne vezikuly označuje skupinu membránových štruktúr uvoľňovaných bunkami do prostredia. Jednotlivý členovia tejto skupiny sa medzi sebou líšia veľkosťou, obsahom a spôsobom ich vzniku. Najznámejšími štruktúrami zaraďovanými k extracelulárnym vezikulám sú exozómy (50 – 150 nm) a mikrovezikuly (100 – 1000 nm). V organizme plnia rôzne funkcie, pôsobia napríklad ako signálne vektory pri homeostatických, ale aj rôznych patologických procesoch v organizme. Extracelulárne vezikuly sú tvorené proteínmi, lipidmi a nukleovými kyselinami. Vďaka tomu vo veľkej miere odrážajú fyziologický stav buniek, z ktorých boli uvoľnené. Pretože hladiny mnohých proteínov v bunkách sú dynamické a menia sa aj v závislosti od ochorenia, slúžia proteíny ako indikátory rôznych ochorení.

Glykozylácia je jednou z najčastejších post-translačných modifikácií proteínov. Pri tomto procese sú sacharidy viazané s inými sacharidmi, proteínmi alebo lipidmi. Práve aberantná glykozylácia koreluje s vývojom a progresiou nádorov [1].

Proteomická a glykomická analýza zloženia extracelulárnych vezikúl môže poskytnúť informácie o markeroch skúmaných ochorení.

Izolácia extracelulárnych vezikúl je pomerne náročná vzhľadom na ich rozdielnu

veľkosť a prítomnosť iných nevezikulárnych štruktúr v sére. Vhodnou metódou na izoláciu extracelulárnych vezikúl zo séra je gélová filtrácia. Tento spôsob separácie oddeľuje častice na základe veľkosti. Veľké častice sú eluované ako prvé, pretože nie sú schopné vstupovať do pórov náplne kolóny. Na druhej strane, menšie častice vstupujú do pórov materiálu, čím dochádza k ich spomaleniu. Tento spôsob separácie umožňuje oddeliť extracelulárne vezikuly od bohato zastúpených sérových proteínov.

Cieľom tejto práce bola izolácia extracelulárnych vezikúl zo vzoriek humánneho séra, pomocou gélovej filtrácie, a porovnanie rozdielov medzi proteínovým a glykánovým zložením extracelulárnych vezikúl a séra.

Materiál a metódy

Proteíny z 5 μ l séra boli vyzrážané kyselinou trichlóroctovou (TCA) [2]. K sérum bolo pridaných 95 μ l PBS a 10 μ l TCA. Vzorka bola krátko vortexovaná, inkubovaná na ľade (30 min) a centrifugovaná (15 min, 10 000 x g, 4 °C). Pelet bol trikrát premytý 500 μ l vymrazeného acetónu, centrifugovaný (5 min, 10 000 x g, 4 °C) a vysušený v Concentrator plus (Eppendorf).

Na izoláciu extracelulárnych vezikúl z 500 μ l séra bola použitá kolóna qEVOoriginal 70 nm Gen 2 (IZON Science LTD), ktorá využíva princíp gélovej filtrácie. Ako elučný roztok bol použitý 200 mM hydrogénuhličitan amónny. Frakcia obsahujúca extracelulárne vezikuly (1,6 ml) bola vysušená.

Pre proteomickú analýzu boli vysušené vzorky denaturované v 100 μ l 8M močoviny v 100 mM TEAB pH 8,5 (30 min, 60°C), redukované 5 mM ditiotreitolom (30 min, 60°C) a alkylované 15 mM iodoacetamidom (60 min, RT, tma). Následne bola karbamidometylácia cysteínov zastavená prídavkom 5 mM ditiotreitolu. Vzorky boli prečistené metódou SP3 (*single-pot solid-phase-enhanced sample preparation*) s použitím magnetických karboxymodifikovaných guľčiek Sera-Mag (Cytivia; 0,5 μ g guľčiek/ 1 μ l vzorky) [3]. Proteíny boli z magnetických guľčiek uvoľnené 100 mM hydrogénuhličitanom amónnym a štiepené s použitím LysC (BioLabs; 2 h, 37°C) a trypsínom sekvenčnej kvality (Pierce; 16 h, 37°C). Štiepna reakcia bola zastavená 0,5 % kyselinou trifluóroctovou. Koncentrácie peptidov vo vzorkách boli stanovené pomocou kitu *Quantitative Fluorometric Peptide Assay* (Pierce).

Na LC-MS/MS analýzu bolo použitých približne 600 ng z každej vzorky. Najprv boli vzorky nanášané na trapovaciu kolónu (PepMap100 C18, 75 μ m x 20 mm, 3 μ m particle size; Dionex) a následne separované na EASY-Spray C18 analytickej kolóne s integrovaným nanosprejovým emitérom (75 μ m x 500 mm, 5- μ m particle size; Thermo Fisher Scientific).

Dĺžka gradientu bola 60 minút (3–43% B), konkávny tvar krivky 7 s prietokom 250 nl/min. Ako mobilné fázy boli použité – 0,1% kyselina mravčia (v/v) a 80% acetonitril (v/v) v 0,1% kyseline mravčej. Eluované peptidy boli nastrekované priamo do hmotnostného spektrometra Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific), cez EASY-Spray iónový zdroj. Spektrá boli zbierané v DDA móde, využívajúc Top 15 stratégiu pre výber prekurzorových iónov[4]. Každá vzorka bola analyzovaná v technických duplikátoch.

Získané dáta boli analyzované v programe MaxQuant v1.6.17.0 [5] voči proteómu *H. sapiens* z databázy UniProt (75004 sekvencií) [6]. V prehľadávaní bola nastavená karbamidometylácia cysteínov ako fixná modifikácia, oxidácia metionínov a acetylácia N-konca proteínu boli nastavené ako variabilné modifikácie. Relatívne množstvá jednotlivých proteínov boli stanovené pomocou LFQ (*label free quantification*) algoritmu, ktorý poskytuje normalizované intenzity LFQ pre identifikované proteíny [7].

Pre glykomickú analýzu boli vysušené vzorky extracelulárnych vezikúl rekonštituované v 10 mM PBS pH 7.4 s prídavkom 0.1% SDS a denaturované inkubáciou pri 100°C počas 10 minút. Po ochladení bolo pridaných 1 µl (1 U) enzýmu PNG-ázy F (Roche) a deglykozylačná reakcia prebiehala počas inkubácie cez noc pri 37°C. Na druhý deň boli vzorky rozpustené v 5% ACN a glykány boli izolované prostredníctvom PGC SPE (extrakcia na tuhej fáze s použitím porózneho grafitizovaného uhlíka) s použitím 100 mg ENVICarb preparatívnych kolón (Supelco). Po premytí a kondicionovaní kolóny s 5% ACN bola nanosená a reaplikovaná vzorka. Následne bola kolóna opäť premytá 5% ACN a glykány boli vyizolované použitím 60% ACN s prídavkom 0.1% TFA. Pre zvýšenie stability kyseliny sialovej v iónovom zdroji boli izolované glykány permetylované [8]. Permetylované N-glykány boli analyzované v reflektónovom pozitívnom iónovom móde MALDI TOF hmotnostného spektrometra UltrafleXtreme II (Bruker) s použitím externej matrice 20 mg/ml 2,5-dihydroxybenzoovej kyseliny s prídavkom 10 mM NaOH. Dáta boli interpretované pomocou GlycoWork Bench softvérového programu [9].

Výsledky a diskusia

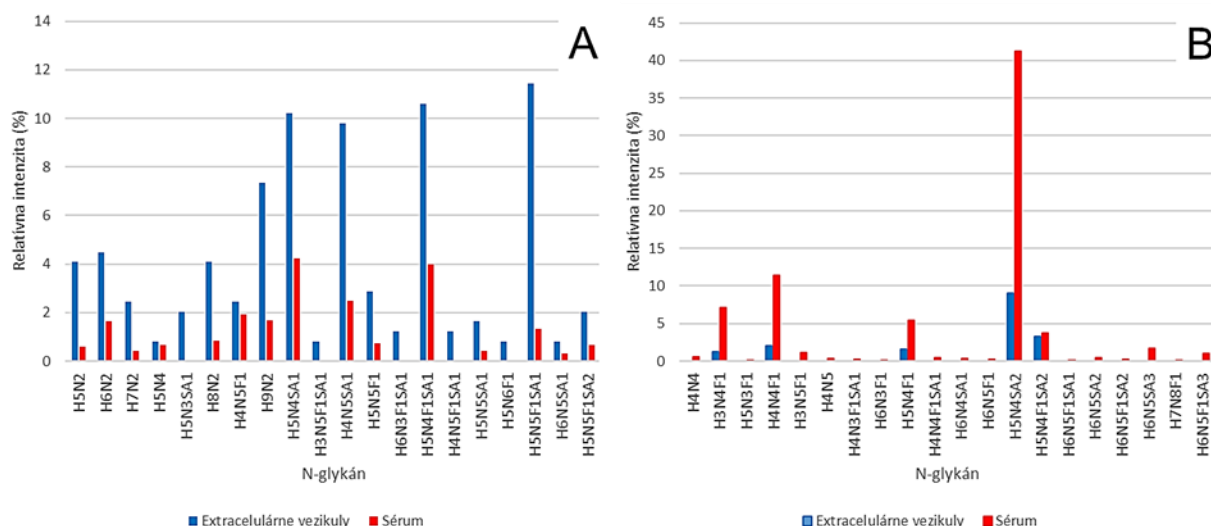
Analýzou proteínov izolovaných zo séra a extracelulárnych vezikúl sa nám podarilo identifikovať celkovo 188 proteínových skupín. Pri štatistickom porovnaní identifikovaných proteínov v extracelulárnych vezikulách so sérom (Studentov T-test, FDR 0,05) sme pozorovali signifikantné zmeny, zvýšených, resp. znížených hladín, u 142 proteínov. Z tohto počtu malo až 41 proteínov výrazne zvýšenú hladinu vo vzorkách extracelulárnych vezikúl v porovnaní so sérom. Špecifické GO z databázy UniProt (extracelulárny exozóm -

GO:0070062; mikrovezikula - GO:1990742; extracelulárna vezikula - GO:1903561) malo 27 z nich (Tab.1.). Okrem proteínov typických pre extracelulárne vezikuly, CD9 a aktín, sa medzi nimi nachádzali aj proteíny spájané s rôznymi ochoreniami, napríklad proteín viažuci galektín-3 (LGALS3BP), ficolín-2 (FCN2) a trombospodín 1 (THBS1) [10 - 12].

Tab. 1. Zoznam proteínov. Tabuľka zobrazuje 27 proteínov, ktoré mali zvýšené hladiny v extracelulárnych vezikulách v porovnaní so sérom a zároveň sú súčasťou extracelulárnych vezikúl.

UniProtKB	Názov proteínu	Názov génu	Log2 LFQ Intenzita				
			EVs Female	EVs Male	Sérum Female	Sérum Male	Pomer EVs/ Sérum
P04275	von Willebrand factor;von Willebrand antigen 2	VWF	24.10	24.13	13.39	13.56	10.64
P04114	Apolipoprotein B-100;Apolipoprotein B-48	APOB	28.13	28.44	22.43	22.23	5.95
P02656	Apolipoprotein C-III	APOC3	25.28	25.69	19.85	20.50	5.31
Q08380	Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	21.94	21.77	16.70	16.68	5.17
P60709	Actin, cytoplasmic	ACTB	20.62	21.01	16.46	14.85	5.16
P27105	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	STOM	21.10	21.35	17.12	15.13	5.10
P02730	Band 3 anion transport protein	SLC4A1	19.82	20.94	15.64	15.33	4.90
P21926	CD9 antigen;Tetraspanin	CD9	20.44	20.80	15.76	16.05	4.72
P05106	Integrin beta-3;Integrin beta	ITGB3	19.49	20.26	15.52	14.93	4.65
P02649	Apolipoprotein E	APOE	24.78	24.93	20.28	20.28	4.58
Q9Y6R7	IgGfC-binding protein	FCGBP	20.13	20.31	16.76	15.98	3.84
P01591	Immunoglobulin J chain	IGJ;JCHAIN	21.87	21.44	18.42	18.66	3.12
Q15485	Ficolin-2	FCN2	20.16	19.63	15.72	18.50	2.78
P49913	Cathelicidin antimicrobial peptide	CAMP	19.39	19.23	17.45	15.73	2.72
Q9UHG3	Prenylcysteine oxidase 1	PCYOX1	19.72	18.44	16.36	16.38	2.71
P02679	Fibrinogen gamma chain	FGG	18.37	18.54	16.92	15.44	2.28
P01871	Ig mu chain C region	IGHM	26.65	26.70	24.48	24.60	2.13
P69905	Hemoglobin subunit alpha	HBA1	19.87	18.71	17.90	17.02	1.83
P07225	Vitamin K-dependent protein S	PROS1	22.33	22.05	20.43	20.64	1.65
P02647	Apolipoprotein A-I	APOA1	25.80	25.50	24.00	24.05	1.62
P02652	Apolipoprotein A-II	APOA2	21.86	22.07	20.73	20.19	1.51
P59666	Neutrophil defensin 3	DEFA3	18.60	18.42	17.94	16.53	1.28
P00739	Haptoglobin-related protein	HPR	22.48	22.59	21.06	21.62	1.19
P68871	Hemoglobin subunit beta	HBB	19.30	19.51	17.94	18.53	1.17
P07996	Thrombospondin-1	THBS1	20.50	20.72	19.49	19.79	0.97
P10909	Clusterin;Clusterin beta chain	CLU	21.34	21.34	20.05	20.96	0.83
P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1	PON1	21.49	21.58	20.80	21.02	0.62

V prípade glykomickej analýzy sme porovnávali špecifický N-glykoprofil extracelulárnych vezikúl a séra. Pozorovali sme zvýšené hladiny celej série vysoko manózových (H5N2-H9N2) a niektorých monosialylovaných štruktúr vo vzorke izolovaných vezikúl. Relatívne intenzity reprezentatívnych 20 N-glykánov, ktorých hladiny boli zvýšené vo vzorkách extracelulárnych vezikúl v porovnaní so sérom, sú znázornené v Obr. 1A; a relatívne intenzity vybraných 20 glykánov, ktorých hladiny boli naopak zvýšené vo vzorke séra, sú znázornené v Obr. 1B.



Obr. 4. Relatívne zastúpenie jednotlivých N-glykánov izolovaných zo vzorky extracelulárnych vezikúl (modrá) a precipitovaných sérových proteínov (červená), stanovené prostredníctvom MALDI TOF hmotnostnej spektrometrie. A - relatívne intenzity reprezentatívnych 20 N-glykánov, ktorých hladiny boli zvýšené vo vzorkách extracelulárnych vezikúl, v porovnaní so sérom, B - relatívne intenzity vybraných 20 glykánov, ktorých hladiny boli zvýšené vo vzorke séra. Monosacharidové označenie: F - fukóza, H - hexóza, N- N-Acetylhexozamín, SA - sialová kyselina

Zvýšené hladiny vysoko manózových N-glykánov boli doposiaľ pozorované v mikrovezikulách (v porovnaní s parentálnou bunkovou membránou) aj prostredníctvom iných metód, napr. na báze lektínových microarrays [13]. Charakterizácia jednotlivých vysoko manózových štruktúr extracelulárnych vezikúl hmotnostnou spektrometriou môže byť v budúcnosti využitá aj v prípade štúdia onkologických ochorení, kde boli taktiež identifikované výrazne zvýšené hladiny tohto N-glykánového typu [14]. Detailná glykoproteomická analýza obsahu extracelulárnych vezikúl môže výrazne napomôcť k objasneniu molekulárnych procesov prebiehajúcich pri týchto ochoreniach. Ďalšie experimentálne kroky by mali zahŕňať analýzu glykopeptidov, spájajúcu informácie o pôvode glykánu s proteínovou sekvenciou.

Záver

Extracelulárne vezikuly sú vhodným zdrojom biomarkerov rozličných ochorení, vrátane rakoviny. Cieľom práce bola izolácia extracelulárnych vezikúl z ľudského séra a následné porovnanie ich proteomického a glykomického profilu s profilom séra. Proteomická analýza viedla k identifikácii 188 proteínových skupín. Z nich malo 27 signifikantne zvýšené hladiny proteínov vo vzorkách extracelulárnych vezikúl v porovnaní so sérom a zároveň obsahovali GO pre extracelulárne vezikuly. V prípade glykomickej analýzy boli pozorované

zvýšené hladiny niektorých štruktúr, najmä vysoko manózových, avšak ich proteínový pôvod dokáže určiť až analýza glykopeptidov. Vytvorené experimentálne postupy budú slúžiť ako podklad pre systematické analýzy biologických vzoriek s cieľom identifikácie vhodného biomarkera pre endometriálny karcinóm.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Centrum pre biomedicínsky výskum – BIOMEDIRES – II. etapa, kód ITMS: 313011W428, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Táto práca bola podporovaná Ministerstvom zdravotníctva Slovenskej republiky v rámci projektu s registračným číslom 2019/7-CHÚSAV-4.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Munkley J., Elliott D. J. (2016) *Oncotarget*. 7(23), p. 35478
- [2] Koontz L. (2014) *Methods Enzymol.* 541, p. 3-10
- [3] Cytiva [Citované: 22. marec 2023]
<<https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-34053-pdf>>
- [4] Michalski A., Damoc E., Lange O., et al. (2012) *Mol. Cell Proteomics*. 11(3), p. O111.013698
- [5] Cox J., Mann M. (2008) *Nat. Biotechnol.* 26, p. 1367
- [6] The UniProt Consortium (2019) *Nucleic Acid. Res.* 47, p. D506
- [7] Cox J., Hein M. Y., Lubner C. A., et al. (2014) *Mol. Cell Proteomics*. 13(9), p. 2513
- [8] Palmigiano A., Messina A., Bua R. O., et al. (2018) *Methods Mol. Biol.* 1750, p. 75
- [9] Ceroni A., Maass K., Geyer H., et al. (2008) *J. Proteome Res.* 7, p. 1650
- [10] Rana R., Chauhan K., Gautam P., et al. (2021) *Front. Oncol.* 11, p. 778754
- [11] Bruschi M., La Porta E., Panfoli I., et al. (2021) *Sci. Rep.* 11, p. 20807
- [12] Cen J., Feng L., Ke H., et al. (2019) *Cancers (Basel)*. 11(12), p. 1946
- [13] Batista B. S., Piobello K. T., Hendricks-Muñoz K. D., et al. (2011) *J. Proteome. Res.* 10(10), p. 4624
- [14] Martins Á. M., Ramos C. C., Freitas D., et al. (2021) *Cells*. 10(1), p. 109

Effect of hydrochar on the photo-induced activity of magnetite for removal of Rhodamine B

Arshitha Madhusudhan¹, Olivier Monfort¹

¹*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Inorganic Chemistry, Ilkovicova 6, 842 15, Bratislava, Slovak republic; m1@uniba.sk*

Abstract:

Water pollution is one of the major issues faced in the current time due to the limited resource. One of the easiest and most efficient ways of removing persistent water pollutants are using Advanced Oxidation Processes (AOPs) as they generate highly reactive radicals that oxidize and mineralize the pollutants. A composite of hydrochar and Fe₃O₄ was synthesized and used for adsorption and degradation of Rhodamine B (RhB) in presence of solar-like radiation. This was conducted at various pH and it was determined that natural pH was the best to achieve maximum removal of RhB. Also, the extent of removal using composite was compared to Fe₃O₄ and hydrochar.

Keywords: Adsorption; Photocatalysis; Fenton; Iron; Composites

Introduction

Despite 71% of the Earth's surface being covered in water, just 3% of it is consumable, and only 1% of it is readily available, water is essential for all living beings. Anthropogenic sources of pollution, especially the different types of industries, raise the level of pollutants in the natural environment by discharging treated wastewater that has not been sufficiently cleaned [1]. As a result, pesticides, drugs, and hazardous chemicals can be accumulated in the environment and affect both the ecosystem and public health by increasing their risk of contracting harmful diseases [2]. One such a pollutant is Rhodamine B which is used in the textile industry and which is toxic to humans and aquatic life. Hence, it is crucial to look for efficient wastewater treatment. Advanced oxidation processes (AOPs) have become a viable alternative method for effectively removing persistent organic pollutants from water because they generate extremely reactive inorganic radicals, such as •OH, that oxidize and mineralize the contaminants.

Fe-based oxides have been utilized extensively in AOPs because of their low cost, simplicity in synthesis, and effectiveness in removing contaminants. AOPs are surface reactions where the reactive species mineralize the pollutants which are in the vicinity of the nanomaterial [3]. If the material is an adsorbent, it can enhance the reactions as the pollutants are readily available to be oxidized. Consequently, it is essential to comprehend how various AOPs might be synergistically integrated with adsorption in Fe-based composites in order to

design more effective wastewater treatments. As a potential adsorbent, hydrochar is promising but the research for water treatment is at its early stage.

Hydrochar (HC) is a carbon-based material produced by hydrothermal method from biomass. Compared to biochar which is produced in dry oxygen starved ambience at a temperature of at least 300°C or above, hydrochar is produced using hydrothermal methods produced in subcritical water at lower temperatures of about 180-200°C [4].

Goals: To synthesize the composite of hydrochar and Fe₃O₄ using hydrothermal method and to study the degradation of pollutants used in textile industry.

Materials and synthesis

Hydrochar was prepared using orange peels. Orange peels were chopped into small pieces and dried in an oven at 80°C. The dried sample were then ground, and sieved. One gram of the above-mentioned material was hydrated for 30 min in a Teflon vessel in 10 mL of distilled water. The hydrothermal carbonization (HTC) of the precursor was carried out in a stainless-steel autoclave, heated at 200°C for 12 h under self-generated pressure conditions. Later, the synthesized hydrochar is washed with water and IPA and dried at 80°C for 5h.

Fe₃O₄ was prepared using iron (II) chloride tetrahydrate (FeCl₂·4H₂O, Acros Organics) and Sodium hydroxide (NaOH, Central Chem). Initially, 0.2M of the iron precursor was dissolved in DI water and to this 2M NaOH is added and stirred for 30min at 35°C in a glass beaker. The contents are then transferred into a Teflon autoclave and heated at 200°C for 12hrs under self-generated pressure conditions. Later, the synthesized Fe₃O₄ is washed with water and IPA and dried at 80°C for 5h.

HC/Fe₃O₄ composite of mass ratio 1:4 was synthesized in one pot method. First, the dried and ground orange peels was hydrated in Teflon vessel. Simultaneously, precursors of Fe₃O₄ were prepared in a glass beaker and after stirring for 30min, the solution was added to the same Teflon vessel containing the hydrated orange peels. The Teflon autoclave was then heated at 200°C for 12h under self-generated pressure conditions. Later, the synthesized composite is washed with water and IPA and dried at 80°C for 5h.

Adsorption and photo-induced degradation of 10ppm Rhodamine B (RhB, Acros Organics)) solution is performed in dark and under solar-like radiation (1.3 mW/cm² in the range 335-380 nm), respectively, and samples were taken every 30 min for analysis by UV-visible spectrophotometry (Jasco V-530) to follow the degradation at $\lambda = 552$ nm.

Results and discussion

Adsorption is the phenomenon in which molecules of an adsorbate adhere to molecules of an adsorbent, either as a result of physical interactions or chemical bonding. It occurs when an adsorbate i.e., a gas or liquid solute accumulates on the surface of another solid or liquid adsorbent to form a layer on the surface. In the case of RhB, the molecules adhere to the surface of Fe₃O₄ (Fig 1b), specifically at natural pH (~7), thus there is no requirement of additional acids and bases to control the pH. Also, it is the pH of wastewater. Whereas, hydrocar is not a very good adsorbent (Fig 1a) due to its hydrophobic nature and lower surface area compared to Fe₃O₄.

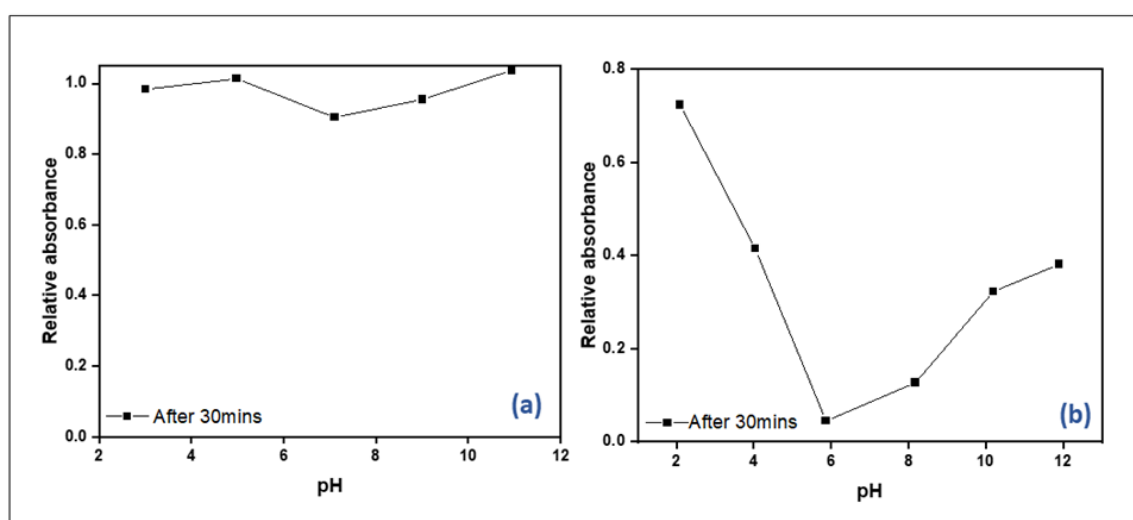


Fig. 1. a) Adsorption isotherms of RhB using HC, b) Adsorption isotherms of RhB using Fe₃O₄

Under light irradiation, a semiconductor photocatalyst like Fe₃O₄ can generate electron (e⁻) and hole (h⁺) pairs (I.), which in turn forms reactive oxygen species (ROS) such as O₂^{•-} and OH (II. and III.)[5]. As seen below in Fig 2. Fe₃O₄ has a higher removal rate of RhB compared to the composite of HC: Fe₃O₄ with ratio 1:4. As determined above in the adsorption experiments, the pH was maintained at natural pH of the solution (~6) which is favorable for the degradation experiments also. The degradation of pollutant could be improved by varying the ratio of the composite with HC acting as an electron trapping agent instead of an adsorbent.



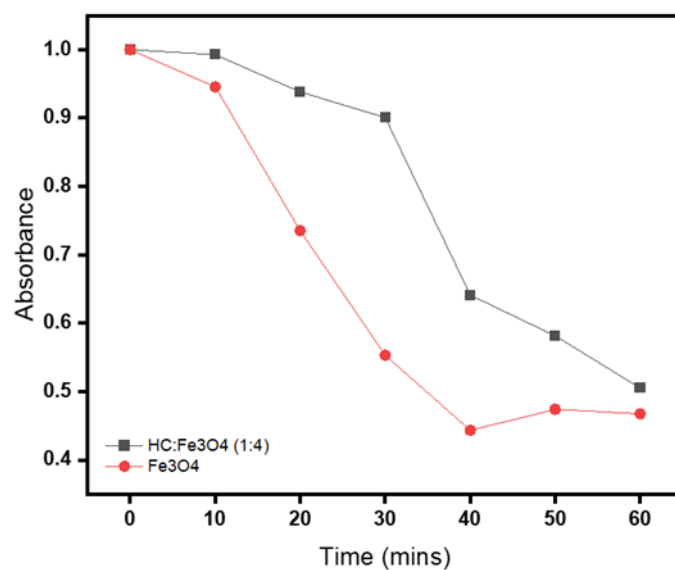


Fig. 2. Photocatalysis with RhB as pollutant

Conclusion

The composite of Hydrochar with Fe₃O₄ was successfully synthesized using hydrothermal one pot method. Rhodamine B was not adsorbed on hydrochar proving that HC is not a very porous material and activation is required to make it porous so as for HC to act as an adsorbent. Furthermore, Fe₃O₄ was a relatively good adsorbent and a photocatalyst. Although the photocatalytic activity of the composite was observed, it ought to be enhanced by varying the ratios and understanding the role of hydrochar better.

References

- [1] Bui V. K. H., Park D., Pham T. N., et al. (2019) Sci. Rep. 9(1), p. 11855
- [2] Shiyong Y., Ping W., Xin Y., et.al., (2009) J. Environ. Sci. 21(9), p. 1175
- [3] Ngoc L. T. N., Bui V. K. H., Moon J. Y, et.al., (2019) J. Nanosci. Nanotechnol., 19(10), p. 6369
- [4] Masoumi S., Borugadda V. B., Nanda S. et al., (2021) Catalysts, 11(8), p. 939
- [5] Rahimi-Nasrabadi M., Behpour M., Sobhani-Nasab A. et al., (2016) J. Mater. Sci. Mater. Electron, 27, p. 11691

Mechanochemická aktivácia v syntéze ruxolitinibu

Zuzana Mravíková, Tibor Peňaška, Radovan Šebesta

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie,
Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 841 04 Bratislava, Slovenská republika;
zuzana.mravikova@uniba.sk*

Abstract

Mechanochemical activation in synthesis of ruxolitinib

Ruxolitinib belongs to the family of Janus kinase inhibitors. Targeting Janus kinases with small-molecule inhibitors (eg. ruxolitinib) has proved to be effective in the treatment of different types of diseases (myelofibrosis, arthritis, graft-versus-host disease, vitiligo), making ruxolitinib promising and attractive candidate for drug repurposing. Use of mechanochemistry via ball milling continues to be a current topic in organic synthesis. A number of publications have demonstrated the success of using ball milling techniques in syntheses of various drugs and biologically active compounds. The goal of this project is to synthesise ruxolitinib using solely mechanochemical activation via ball milling. Key step of the synthesis is the enantioselective aza-Michael reaction, this work aims to apply chiral dual organocatalysts for introduction of stereogenic center to obtain the active stereoisomer. We already carried out the first two reaction steps of the total synthesis of ruxolitinib via ball milling with satisfactory yields.

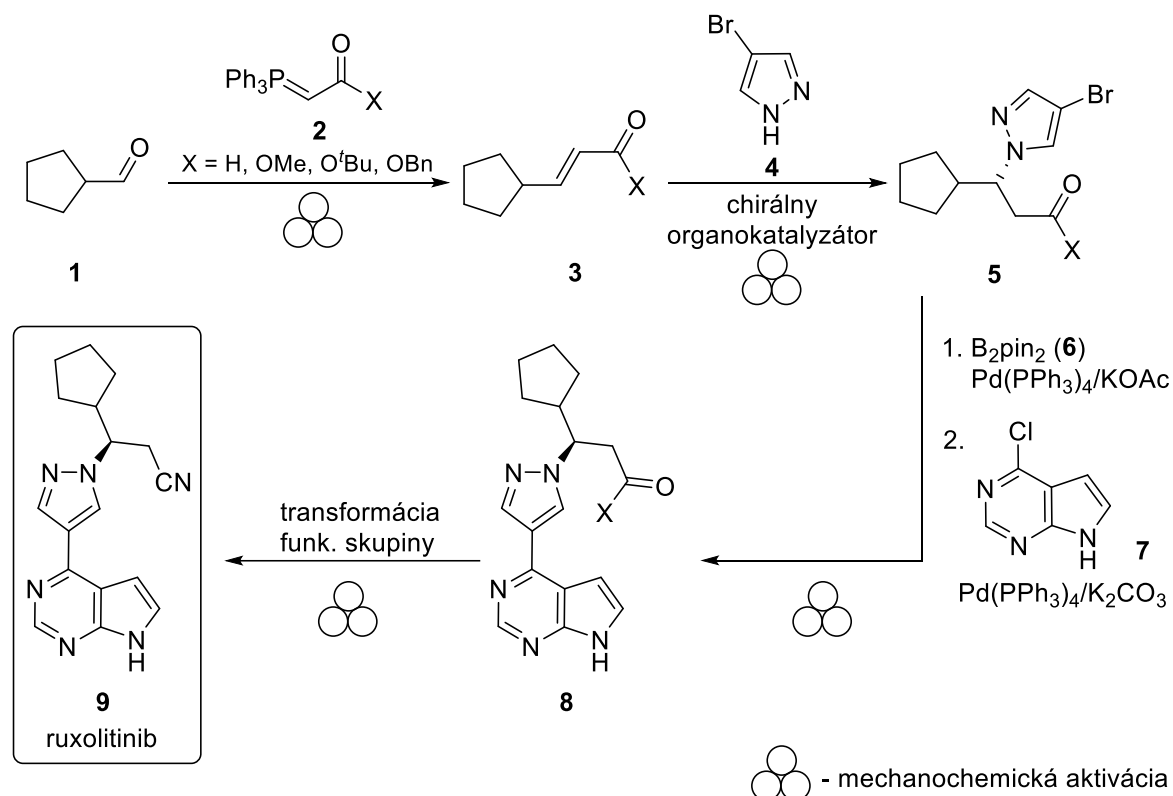
Keywords: *ruxolitinib; mechanochemistry; ball mill; organocatalysis; aza-Michael reaction*

Úvod a formulácia cieľa

Ruxolitinib, inhibítor Janus kináz 1 a 2, sa používa na liečbu rôznych ochorení (myelofibróza, pravá polycytémia, reakcia štepu voči hostiteľovi, vitiligo) a jeho širokospektrálnosť zvyšuje atraktivitu z pohľadu organickej syntézy i klinického výskumu [1]. Mechanochemická aktivácia guľovým mletím je jedným z moderných nástrojov zelenej chémie. Potreba znížiť dopad organickej syntézy na životné prostredie viedla k snahe o využitie guľového mletia aj v príprave liečiv alebo ich fragmentov [2].

Cieľom projektu je uskutočnenie celkovej syntézy liečiva ruxolitinib (Obr. 1.) s využitím výhradne mechanochemickej aktivácie pomocou guľového mletia. Syntéza vychádza z Wittigovej reakcie, ktorej produkt vystupuje ako Michaelov akceptor v nasledujúcom kroku – aza-Michaelovej adícii. Následne celková syntéza pokračuje dvomi po sebe idúcimi Suzukiho kaplingami a ukončená je transformáciou funkčnej skupiny na nitril. Enantioselektivitu aza-Michaelovej reakcie chceme dosiahnuť použitím chirálnych duálnych organokatalyzátorov. Zatiaľ žiadna z doteraz publikovaných celkových syntéz ruxolitinibu nevyužívala mechanochemickú aktiváciu, a organokatalyticky bola celková syntéza uskutočnená iba raz [3,4]. Problematika mechanochemicky aktivovaných aza-Michaelových reakcií spojených so stereoselektívnou organokatalýzou prebiehajúcou pri podmienkach

guľového mletia je málo preskúmanou témou [5,6].



Obr. 1. Navrhovaná celková syntéza ruxolitinibu

Materiál a metódy

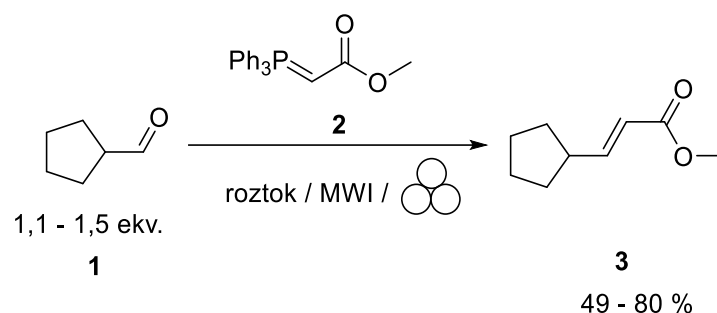
Komerčne dostupné látky boli zakúpené od firiem Alfa Aesar, Fisher Chemical, Sigma Aldrich, TCI a Thermo Scientific. Rozpúšťadlá boli čistené podľa štandardných laboratórnych postupov, mechanochemicky aktivované reakcie prebiehali v 1,5 – 10 mL nerezových reaktoroch oscilačného guľového mlyna Retsch MM 400 s frekvenciou vibrácií 30 Hz. Priebeh reakcií bol sledovaný pomocou TLC analýzy (Merck Silica gel 60 F₂₅₄). Na čistenie a izoláciu produktov bola využívaná stĺpcová chromatografia (Merck Silica gel 60). ¹H a ¹³C NMR spektrá boli merané na prístroji Varian Gemini (600 MHz pre ¹H a 151 MHz pre ¹³C), ako vnútorný štandard bol použitý tetrametylsilán (TMS) a ako rozpúšťadlo bol použitý CDCl₃.

Výsledky a diskusia

Wittigova reakcia

Produktom Wittigovej reakcie aldehydu 1 s fosfóniovým ylenom 2 je α,β-nenasýtený ester 3 (Obr. 2.). Na začiatku sme sa pokúšali o prípravu cyklopentylakrylaldehydu, ale kvôli

jeho náročnej izolácii (dochádzalo k jeho odparovaniu počas spracovania surovej reakčnej zmesi) sme sa rozhodli začať syntézu prípravou α,β -nenasýteného esteru 3. Výťažok Wittigovej reakcie aldehydu 1 s fosfóniovým ylenom 2 v podmienkach guľového mletia bol oveľa vyšší v porovnaní s reakciou v roztoku alebo pri použití mikrovlnného žiarenia (Tab. 1, vstup 1 – 3). Ester 3 bol v podmienkach guľového mletia izolovaný v 80 % výťažku. Počas optimalizácie reakčných podmienok sa ukázalo, že reakcia v guľovom mlyne prebieha účinnejšie bez použitia rozpúšťadla (Tab. 1.; vstup 3 a 4), zvyšovanie ekvivalentov aldehydu 1 nevedlo k zvýšeniu výťažku reakcie (Tab. 1.; vstup 4 – 6).



Obr. 2. Wittigova reakcia

Tab. 1. Optimalizácia reakčných podmienok Wittigovej reakcie

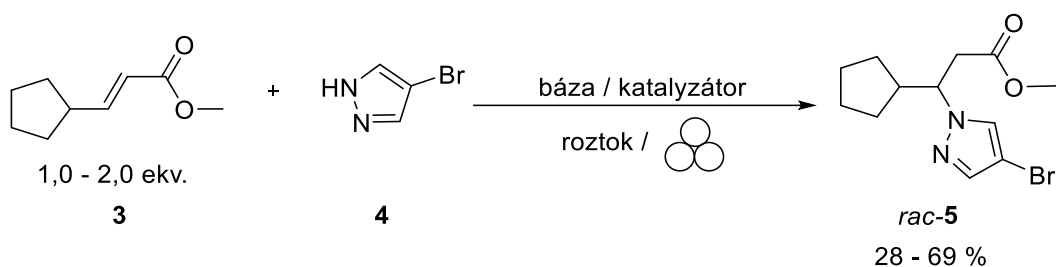
^a 50 μL DCM použitých ako LAG (*liquid assisted grinding agent*)

vstup	pomer 1:2	metóda, podmienky	rozpúšťadlo	výtazok 3 (%)
1	1,1:1	roztok, rt, 24 h	DCM	52
2	1,1:1	MWI, 50 °C, 2 h	DCM	49
3	1,1:1	BM, 30 Hz, 1 h	DCM ^a	62
4	1,1:1	BM, 30 Hz, 1 h	-	72
5	1,3:1	BM, 30 Hz, 1 h	-	80
6	1,5:1	BM, 30 Hz, 1 h	-	80

aza-Michaelova reakcia

1,4-Adíciou pyrazolu 4 na α,β -nenasýtený ester 3 vzniká ester 5 (Obr. 3.). Reakcia bez pridania bázy neprebíha (Tab. 2.; vstup 1), anorganická báza Cs_2CO_3 poskytuje mierne vyšší výťažok než organická báza DBU (Tab.2.; vstup 2 a 3). Reakcia prebieha ako v roztoku, tak i v guľovom mlyne (Tab. 2.; vstup 4). Pokusy o stereoselektívny priebeh pomocou chirálnych organokatalyzátorov (Obr. 4.) zatiaľ neboli úspešné, nepomohlo ani pridanie bázeckého aditíva Cs_2CO_3 (Tab. 2.; vstup 5 a 6). Produktom bola racemická zmes esteru 5, preto predpokladáme,

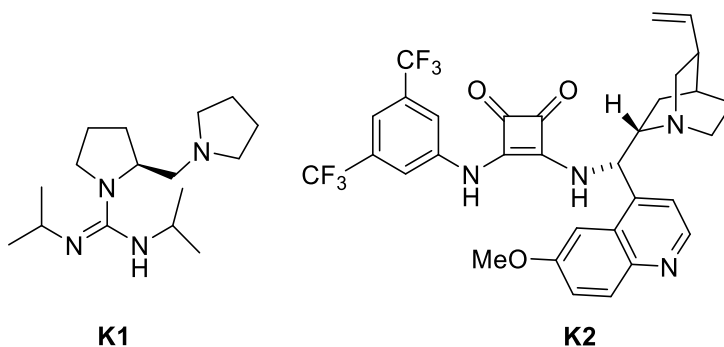
že reakcia bola katalyzovaná anorganickou bázou pre nedostatočnú bázicitu chirálnych organokatalyzátorov.



Obr. 3. aza-Michaelova reakcia

Tab. 2. Optimalizácia reakčných podmienok aza-Michaelovej reakcie

vstup	metóda, podmienky	báza/katalyzátor	výt'azok 5 (%)
1	MeCN, rt, 22 h	-	-
2	MeCN, rt, 20 h	Cs ₂ CO ₃ (1,1 ekv.)	69
3	MeCN, rt, 20 h	DBU (1,1 ekv.)	58
4	BM, 30 Hz, 1 h	DBU (1,5 ekv.)	38
5	DCM, rt, 72 h	K1 (20 mol%)	69
6	DCM, rt, 48 h	K2 (20 mol%) Cs ₂ CO ₃ (1,1 ekv.)	28



Obr. 4. Použité organokatalyzátory pre aza-Michaelovu reakciu

Záver

Optimalizovaná Wittigova reakcia prípravy Michaelovho akceptora, α,β -nenasýteného esteru **3**, prebiehala najlepšie v podmienkach mechanochemickej aktivácie guľovým mletím bez použitia rozpúšťadla, a to s výt'azkom 80 %. V budúcnosti plánujeme zmenou fosfóniových ylenov rozšíriť substrátovú škálu o ďalšie estery (OEt, O'Bu, OBn), prípadne iné

funkčné skupiny.

Zistili sme, že problém enantioselektívnej aza-Michaelovej reakcie α,β -nenasýteného esteru 3 s pyrazolom 4 je slabá bázicita katalyzátora, použitie bázického aditíva však vedie k vzniku racemického produktu 5. Najvyšší výťažok, 69 %, bol zatiaľ dosiahnutý reakciou v roztoku v prítomnosti Cs_2CO_3 . Mechanochemickou aktiváciou guľovým mletím dokážeme pripraviť opäť len racemát vo výťažku 38 %. V budúcnosti sa plánujeme zamerať na zvýšenie výťažku reakcie v podmienkach guľového mletia, ako aj na pokračovanie v skríningu organokatalyzátorov. Ďalším cieľom je dokončenie celkovej syntézy – skúmanie Suzukiho kaplingov a ich optimalizácia pri podmienkach guľového mletia, a mechanochemická transformácia funkčnej skupiny.

PodĎakovanie

Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja, projekt č. APVV-18-0242 a agentúrou VEGA, projekt č. VEGA-1-0332-19.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Li D., Hu J., Li D. (2021) Top. Curr. Chem. 379(1), p. 4
- [2] Bento O., Luttringer F., Mohy El Dine T. (2022) Eur. J. Org. Chem. 2022(21), e202101516
- [3] da Silva E. M., Vidal H. D. A., Corrêa A. G. (2021) Pharmaceuticals, 14(11), p. 1125
- [4] Lin Q., Meloni D., Pan Y. (2009) Org. Lett. 11(9), p. 1999
- [5] Rodríguez B., Rantanen T.; Bolm C. (2006) Angew. Chem. Int. Ed. 45, p. 6924
- [6] Williams M. T. J., Morrill L. C., Browne D. L. (2022) Chem. Sus. Chem. 15(2), e202102157

MALDI-TOF/TOF analysis of human milk oligosaccharide present in permethylated urine samples of an infant

Filip Pančík, Zuzana Pakanová, Rebeka Kodríková, Maroš Krchňák, Filip Květoň, Marek Nemčovič, Stanislav Kozmon, Peter Baráth

Institute of Chemistry of Slovak Academy of Sciences, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava, Slovak republic; filip.pancik@savba.sk

Abstract

Human milk is a source of nutrition for infants in their first period of life and in general is composed of lactose, proteins, free oligosaccharides, and lipids. Human milk oligosaccharides (HMOs) are important during the development of the newborns. Also, HMOs possess antiadhesive antimicrobial, prebiotic and immunomodulatory functions. HMOs are formed mostly by galactose, glucose, fucose, *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylneuramic acid. In this work, MALDI-TOF/TOF analysis of urine sample of one year old infant was performed with purpose to identify sialyllactose. The main reason for MALDI-TOF analysis of sialyllactose in urine samples is, that in TLC analysis sialyllactose is often hard to distinguish from tetrasaccharide which could be considered as a biomarker for some lysosomal storage disorders, such as Pompe disease. This may lead to false positive diagnostic results. Second goal of the analysis was the determination of cross-ring fragmentation of the sialyllactose. The results of this work clarify deeper information about the structure of this HMO.

Keywords: *sialyllactose; human milk oligosaccharides; MALDI-TOF/TOF*

Introduction and Objectives

Breast milk is an important biological fluid, that provides 100 % of mammalian nutrition during the early stages of life. Human milk contains lipids, proteins, and lactose, which are major caloric nutrients. Also, human milk contains considerable amounts of indigestible milk oligosaccharides. Human milk oligosaccharides (HMOs) are the third most abundant compounds in human milk and possess many functions, such as growth stimulation of probiotic bacteria or antiadhesive properties. HMOs have also strong influence on the composition of gut microflora, which is important for infant's immune system [1, 2]. HMOs are complex glycans formed by glucose (*Glc*), galactose (*Gal*), *N*-acetylglucosamine (*GlcNAc*), fucose (*Fuc*), and sialic acid (*Sia*). There is a plethora of analytical methods for identification and structural assignment, e.g.: high pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD), reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) etc. [1]. HMOs were also analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry [3]. In this work permethylated urine sample was analyzed by MALDI-TOF/TOF with purpose to identify sialyllactose signal and then was performed cross-ring identification for the clarification purposes of its structure in biological samples, such as permethylated urine.

Materials and methods

Initially, 50 μL of urine sample of one specimen (female, 1 y. o.) was dissolved in water (LC-MS quality). Sample was then mixed vigorously on vortex, frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ and dried overnight on lyophilizator. After drying process, permethylation was performed. Permethylation started with addition of DMSO into NaOH and mixing into a slurry. Then, approximately 150 μL of this slurry was added into a sample and then 150 μL of iodomethane was also added the mixture and mixed vigorously on vortex. Mixed sample was incubated on a shaker (50 min; $25\text{ }^{\circ}\text{C}$; 2000 rpm). After incubation, sample was extracted with chloroform and washed with ice-cold water until neutral pH was reached. Sample was then dried at laboratory temperature and consequently dissolved in 10 μL of methanol (50 %).

1 μL of permethylated sample was spotted onto a MALDI plate with 1 μL of Na-DHB matrix (2,5-dihydroxybenzoic acid dissolved in TA30 with the addition of 1 mM NaOH) and dried at laboratory temperature. MALDI-TOF/TOF analysis was performed on MALDI mass spectrometer *UltrafleXtreme II* (Bruker Daltonics, Germany) in positive reflectron ionisation mode. The results were evaluated with software program *flexAnalysis 3.4* (Bruker Daltonics, Germany). The results for cross-ring determination were evaluated with program *GlycoWorkbench* (www.eurocarbdb.org).

Results and discussion

Sialyllactose as a sample, was in some works analyzed by MALDI-TOF and ESI-MS analyses as well for structural and fragmentation purposes [4, 5]. However, in this work we analyzed sialyllactose present in permethylated urine samples. Above mentioned works analyzed this HMO in native form without any derivatization methods and as a sample, standardized sialyllactose was used. The main goal of this work was to determine the cross-ring fragmentation of the sialyllactose from permethylated urine sample of an infant. Using MALDI-TOF, signal of sialyllactose was identified with m/z value of 838.5 (Fig. 1). In native form, this oligosaccharide has a m/z value of 656.3 as Na^+ adduct [5]. Some of the signals obtained from MALDI-TOF analysis are also commonly present in breast milk, e.g.: m/z 926.5. Other signals are commonly present in feeding formula: m/z 1293.7 or m/z 1905.9. After the MALDI-TOF analysis, MALDI-TOF/TOF analysis of signal correlating with sialyllactose (m/z 838.5) was performed. We managed to identify fragment signals of this structure as well (Fig. 2). The main fragment signals of sialyllactose were m/z 620.2; m/z 463.2 and 398.1. Signal with m/z 398.1 corresponds with B_1 glycosidic cleavage of sialic acid fragment. Signal with m/z value of 463.1 corresponds with the fragment consisting of one *Glc* and one *Gal* unit (Y_2

glycosidic cleavage). Signal with m/z 620.2 correlates with fragment that is formed from one *Gal* and one *Sia* unit (C glycosidic cleavage). All the identified structures were identified as Na^+ adduct.

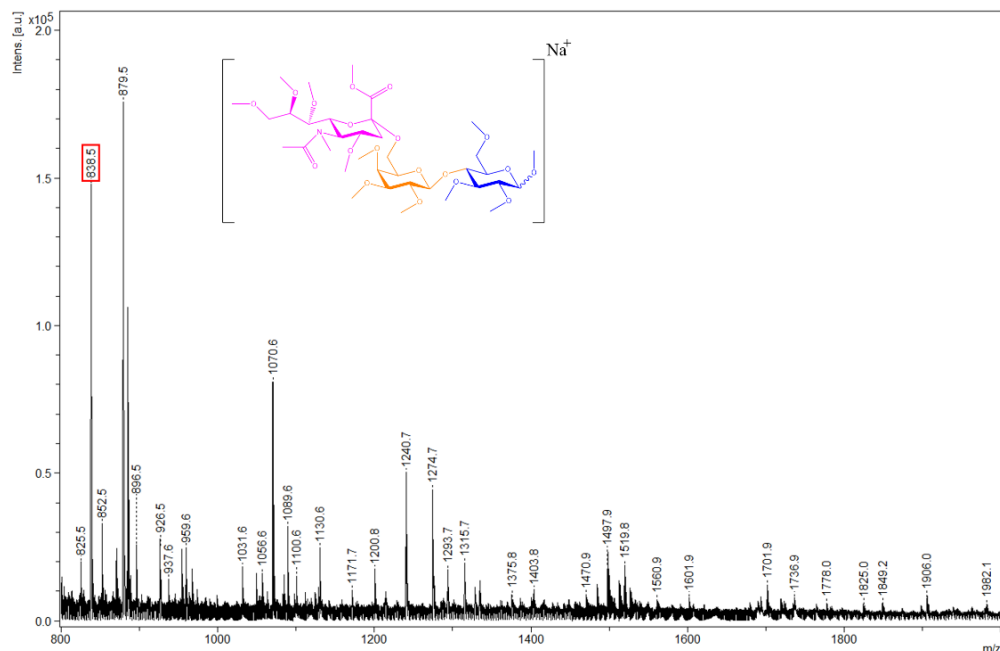


Fig. 1. MALDI-TOF spectrum of permethylated oligosaccharides from the urine sample of an infant. Signal of sialyllactose is highlighted in red rectangle. Magenta color – sialic acid, orange color – galactose, blue color – glucose.

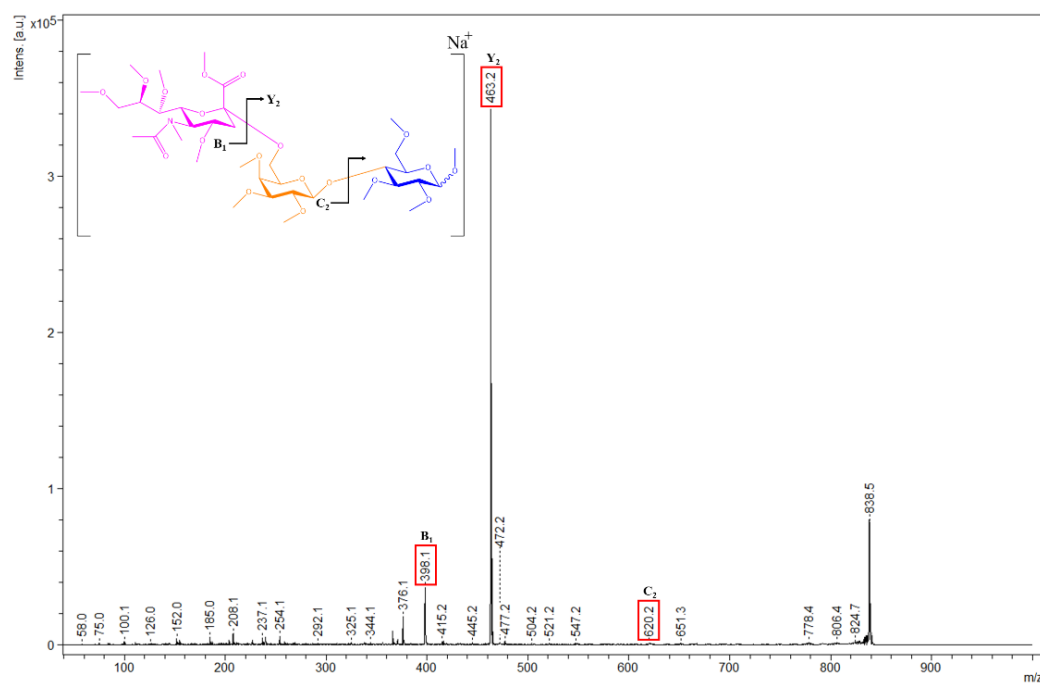


Fig. 2. MALDI-TOF/TOF spectrum of sialyllactose signal obtained from MALDI-TOF analysis of permethylated oligosaccharides from the urine sample of an infant. Typical ions (B, Y and C) of oligosaccharide fragmentation are highlighted in red rectangles. Magenta color – sialic acid, orange color – galactose, blue color – glucose.

After the MALDI-TOF/TOF analysis, the cross-ring identification of signals in obtained spectra was performed using software program *GlycoWorkbench*. Using this program, 7 signals of cross-ring fragments and 8 signals of glycosidic cleavages were identified (Fig. 3).

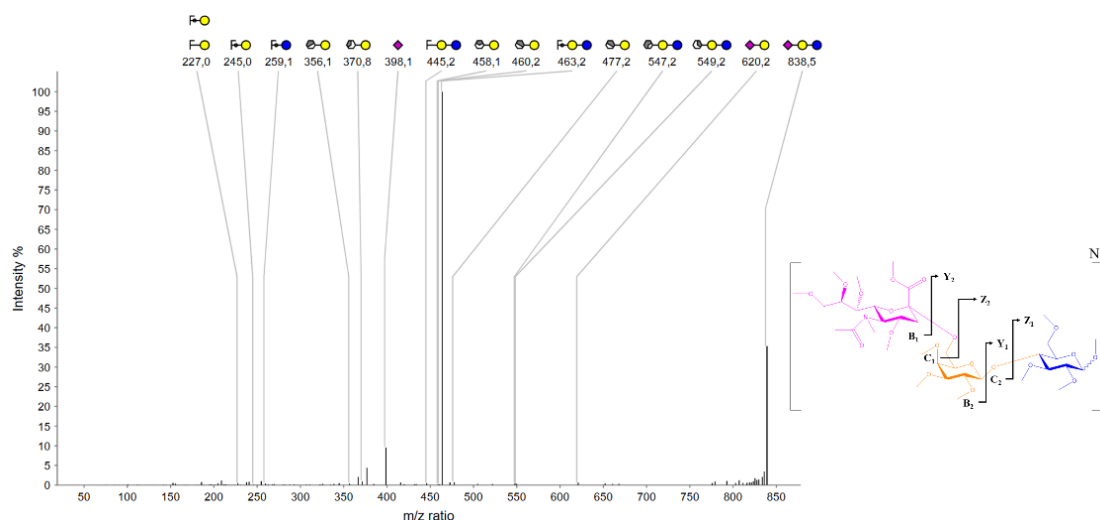


Fig. 3. MALDI-TOF/TOF spectrum of sialyllactose signal obtained from MALDI-TOF analysis of permethylated oligosaccharides from the urine sample of an infant with signals correlated with theoretical cross-ring and glycosidic cleavage fragments. Yellow circle – galactose, blue circle – glucose, purple diamond – sialic acid. Magenta color – sialic acid, orange color – galactose, blue color – glucose.

As it can be seen in Fig. 3, there is a plethora of individual cross-ring and glycosidic cleavage signals. We can see already identified cleavages (B_1 cleavage for signal with m/z 398.1, Y_2 cleavage for signal with m/z 463.2 and C_2 cleavage for signal with m/z 620.2). Glycosidic cleavage for *Gal* and *Glc* disaccharide unit with m/z value of 445.2 was identified. Glycosidic cleavages for *Gal* unit (C_1Y_1 cleavage with m/z value of 245.0 and B_2Y_1/C_1Z_2 cleavage with m/z 227.0) and *Glc* unit (Y_1 cleavage with m/z value of 259.1) were identified as well and their presence was confirmed with literature [4, 5].

Some of the important cross-ring fragments are depicted in Fig. 4. As we can see, the unit that fragments into cross-rings is mostly *Sia*. This is confirmed by the presence of two cross-ring fragments of this unit from the whole molecule of sialyllactose: $^{0,2}X$ (m/z 547.2) and $^{1,5}X$ (m/z 549.2). *Sia* is also a subject to cross-ring fragmentation in disaccharide consisting of *Sia* and *Gal*. We can confirm this phenomenon by observation of $C^{1,4}X$ (m/z 477.2), $B^{1,4}X$ (m/z 460.2) and $C^{0,4}X$ (m/z 458.1) cross-ring fragments. Cross-ring fragments of single *Sia* unit were confirmed by *GlycoWorkbench* software – $B^{0,3}X$ (m/z 356.1) and $B^{3,5}X$ (m/z 370.8) cross-ring fragments. There is also possibility of presence of other cross-ring fragments, however, these should be confirmed with ESI-MS/MS analysis and comparison with a literature.

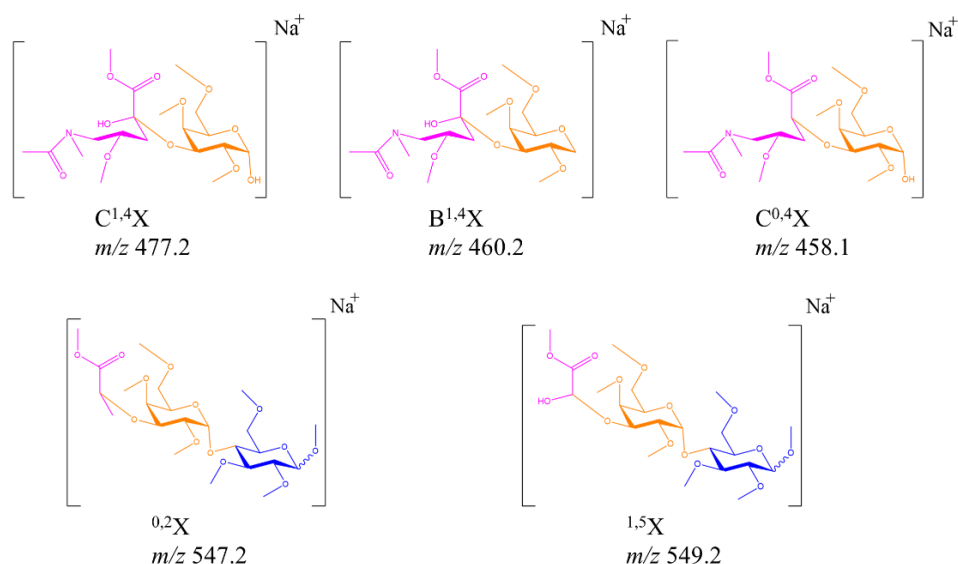


Fig. 4: Representative cross-ring fragments identified from MALDI-TOF/TOF analysis of permethylated oligosaccharides from the urine sample of an infant. Magenta color – sialic acid, orange color – galactose, blue color – glucose.

Conclusion

The structural and fragmentation analysis of sialyllactose was previously performed with standardized samples in native form. In this work, we performed this kind of analysis with MALDI-TOF/TOF of permethylated oligosaccharides sample from urine. We managed to identify almost every possible glycosidic cleavage signal of this HMO. Also, signals of 7 cross-ring fragments of this oligosaccharide were identified. There might be possibility to identify even more cross-ring fragments, but this procedure requires further analysis with ESI-MS/MS, and it is a subject of our future research of this important part of human breast milk.

Acknowledgement

This work was supported by grants VEGA 02/0137/20 and APVV-20-0230. This work was supported by projects APVV-20-0243, APVV-18-0336 and VEGA 2/0060/21. This work was supported by the Operational Program Integrated Infrastructure for the project ITMS: 313021Y920, co-financed by the European Regional Development Fund.

References

- [1] Porfirio S., Archer-Hartmann S., Brett Moreau H., et al. (2020) *Glycobiology* 30 (10), p. 774
- [2] Renee Ruhaak L., Lebrilla C. B. (2012) *Adv. Nutr.* 3 (3), p. 406S
- [3] Jovanović M., Tyldesley-Worster R., Pohlentz G., et al. (2014) *Int. J. Mol. Sci.* 15, p.

- [4] Von Seggern Ch. E., Zarek P. E., Cotter R. J. (2003) *Anal. Chem.* 75, p. 6523
- [5] De Leoz M. L. A., Simón-Manso Y., Woods R. J., et al. (2018) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 30, p. 426

C(2)-Regioselektívna paládiom katalyzovaná arylácia chromónov

Karin Schniererová, Martin Putala, Henrieta Stankovičová

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie,
Mlynská Dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
schniererova1@uniba.sk*

Abstract

C(2)-Regioselective palladium-catalyzed arylation of chromones

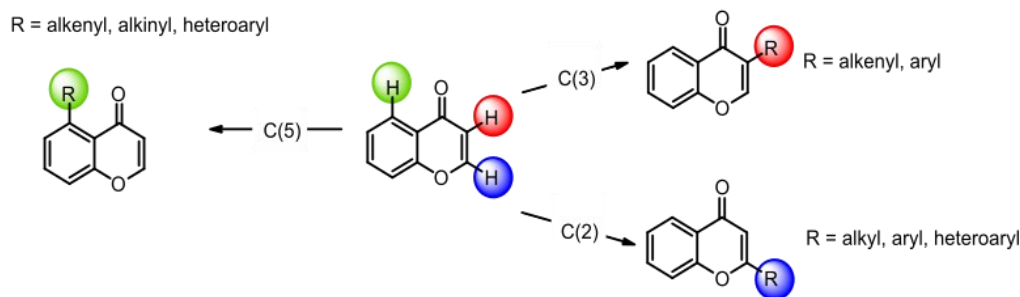
The chromone scaffold, the building block of many bioactive compounds and chemosensors, is resistant to electrophilic substitutions on pyrone moiety. Thus C–H activation appears to be a suitable method for introducing various functionalities to C(2) or C(3) positions. No pre-functionalization is required and depending on the reaction conditions, direct alkenylation or arylation to different positions on the chromone can be performed. The project aims to test and optimize the conditions of palladium-catalyzed arylation of chromone bearing donor group to form flavonoids. These flavone scaffolds are valuable intermediates for the preparation of chemosensors for detecting the presence of various ions. The expected benefit is the investigation of the effect of the donor groups on the regioselectivity of C–H activations and the preparation of a new type of chemosensor.

Keywords: C–H activation; arylation; chromone; flavone

Úvod a formulácia cieľa

Reakcie katalyzované prechodnými kovmi umožnili významný pokrok v organických syntézach. Napriek svojim nesporným výhodám sú však pre tradičné *cross-coupling*-ové reakcie potrebné dva prefunkcionalizované substráty, čo zvyšuje ekonomickú aj ekologickú náročnosť syntéz. Naproti tomu C–H aktivácie predstavujú novú stratégiu syntézy s menším počtom reakčných krokov, s čím je spojená aj nižšia spotreba rozpúšťadiel a menšie množstvo vznikajúceho odpadu. Počas posledných rokov sa veľká pozornosť venuje vývoju nových syntetických postupov funkcionizácie (hetero)arylov.

Chromónový skelet, ktorý je stavebnou jednotkou mnohých bioaktívnych látok a chemosenzorov je relatívne málo reaktívny – výnimkou sú reakcie so silnými nukleofilmi, a preto je práve C–H aktivácia vhodným spôsobom jeho derivatizácie. Nevyžaduje sa pre-funkcionalizácia a v závislosti od reakčných podmienok je možné uskutočniť priamu alkenyláciu alebo aryláciu do polohy C(2), C(3) alebo C(5) chromónového skeletu (Obr. 1). Takto pripravené štruktúry s chromónovým alebo flavónovým skeletom sú vhodnými adeptami na vývoj nových druhov chemosenzorov a tak dokážu nájsť svoje uplatnenie v mnohých odvetviach ako je analytická chémia, enviromentálna chémia či biomedicína.



Obr. 1. Možnosti derivatizácie chromónov pomocou C–H aktivácií

Cieľom práce je otestovať v literatúre opísané reakčné podmienky pre priame arylácie do polohy C(2) chromónového skeletu [1,2] a optimalizovať nové podmienky pre zavedenie aryllov do polohy C(2) chromónového skeletu s arylborónovými kyselinami ako arylačným činidlom. Pripravené flavóny sú cenným prekursorom pre syntézu chemosenzorov [3,4].

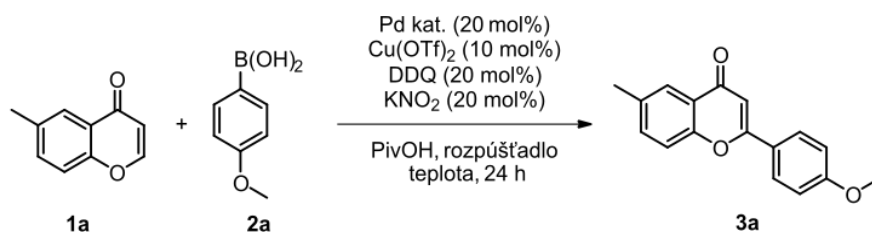
Materiál a metódy

Použíte rozpúšťadlá a chemikálie boli komerčne dostupné (Acros Organics, Sigma-Aldrich, Merck-Millipore, Fisher Chemicals, Centralchem). Rozpúšťadlá sme pred použitím predestilovali. DMF sme vysušili destiláciou z CaH_2 a uchovávali sme ho pod argónom nad aktivovaným molekulovým sitom ($4\text{\AA}$), DCM sme vysušili destiláciou z P_2O_5 . Priebeh všetkých reakcií sme sledovali pomocou TLC s použitím platničiek SiO_2 60 F254 (Merck-Millipore). Vizualizáciu sme uskutočnili pod UV svetlom s vlnovou dĺžkou $\lambda = 254\text{ nm}$ alebo $\lambda = 360\text{ nm}$. Na separáciu látok pomocou stĺpcovej chromatografie sme ako stacionárnu fázu použili silikagél 60 (0,040 – 0,060 mm, 230 – 240 mesh ASTM, Merck-Millipore) pre chromatografiu a ako mobilnú fázu vhodné organické rozpúšťadlo, prípadne zmes rozpúšťadiel. Na zisťovanie štruktúry produktov boli použité prístroje Varian NMR System 600 (600 MHz ^1H a 151 MHz pre ^{13}C) a Bruker Avance NEO 400 MHz (400 MHz pre ^1H a 101 MHz pre ^{13}C). Na meranie boli použité deuterované rozpúšťadlá CDCl_3 a $\text{DMSO-}d_6$ s TMS ako vnútorným štandardom.

Výsledky a diskusia

Na donorne substituovaných chromónoch sme ako prvé testovali podmienky priamej arylácie do polohy C(2) opísané Hongom [1]. Pri reakcii chromónu s arylborónovými kyselinami katalyzovanej $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ a $\text{Fe}(\text{OTf})_3$ v prostredí kyseliny pivalovej autori získali zmes flavónov a flavanónov. Použitím DDQ ako oxidačného činidla v prítomnosti KNO_2 sa

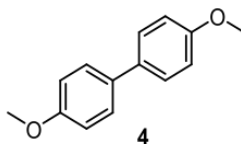
zlepšil priebeh reakcie v prospech vzniku flavónov. Po uskutočnení reakcie za týchto opísaných reakčných podmienok sme sa pokúsili uskutočniť aryláciu v prítomnosti $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ ako Lewisovej kyseliny. Ako modelové substráty sme zvolili 6-metyl-4*H*-chromén-4-ón (1a) a *p*-metoxyfenylborónovú kyselinu (2a) (Obr. 2). Vznik príslušného flavanónu sme nepozorovali.



Obr. 2. Metóda A

Príprava flavónov s arylborónovými kyselinami ako arylačným činidlom v prítomnosti Lewisovej kyseliny, pivalovej kyseliny a oxidačného činidla.

Na priebeh reakcie vplýva spôsob pridávania arylborónovej kyseliny do reakčnej zmesi. Kyselinu je nutné pridávať do reakčnej zmesi pomaly po kvapkách počas niekoľkých hodín, inak vzniká veľké množstvo produktu jej *homocoupling*-u 4 (Obr. 3).



Obr. 3. Produkt *homocoupling*-u arylborónovej kyseliny

Na zabránenie vzniku vedľajšieho produktu 4 sme reakciu uskutočnili v inertnom prostredí v atmosfére argónu, v tomto prípade však nevznikal žiadny produkt, pretože pravdepodobne nedochádzalo ku reoxidácii paládia, z reakčnej zmesi sme izolovali východiskové látky (Tab. 1).

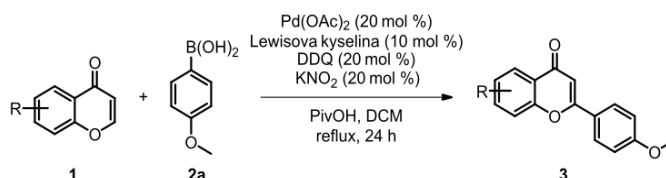
Kyselina pivalová je bežne komerčne dostupná ako 0,1 M roztok v dichlórmetáne, a tak sme sa aj my uskutočnili prvé reakcie v DCM. Ako ďalšie rozpúšťadlá sme testovali THF, DMF a dioxán, ktoré boli v našej výskumnej skupine úspešne použité pri podobných typoch reakcií. Najlepší výťažok produktu sme získali použitím DCM. V DMF reakcia neprebiehala vôbec a v dioxáne podľa ^1H NMR spektra surovej reakčnej zmesi vznikol produkt iba v stopových množstvách (Tab. 1).

Zmena katalyzátora z Pd(OAc)₂ na Pd(TFA)₂ pri uskutočnení reakcie v DCM nevedla k zlepšeniu výťažku reakcie, produkt 3a sme izolovali iba v stopových množstvách (Tab. 1).

Tab. 1. Optimalizácia reakčných podmienok metódy A

Experiment	Rozpúšťadlo	Teplota (°C)	Podmienky	Katalyzátor	Výťažok (%)
1	DCM	40	inertná atmosféra	Pd(OAc) ₂	0
2	DCM	40	Vzduch	Pd(OAc)₂	23
3	THF	60	Vzduch	Pd(OAc) ₂	17
4	DMF	60	Vzduch	Pd(OAc) ₂	0
5	Dioxán	60	vzduch	Pd(OAc) ₂	stopy
6	DCM	40	vzduch	Pd(TFA) ₂	stopy

V podmienkach uvedených v Tab. 1 sme uskutočnili aj prípravu donorne substituovaných flavónov 3 a produkty sme získali vo výťažkoch 12-27%. Použitie Fe(OTf)₃ ako Lewisovej kyseliny namiesto Cu(OTf)₂ by malo viesť k lepším výťažkom flavónov, čo sme otestovali na reakcii nesubstituovaného chromónu. Zmena Lewisovej kyseliny viedla k miernemu zlepšeniu výťažku reakcie na 31 % (Tab. 2).



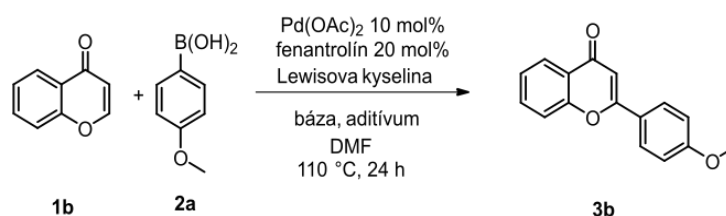
Obr. 4. Príprava rôzne substituovaných flavónov 3 metódou A

Tab.2 Príprava rôzne substituovaných flavónov 3 metódou A

Produkt	R	Lewisova kyselina	Výťažok
3a	6-Me	Cu(OTf) ₂	23
3b	H	Cu(OTf) ₂	27
3b	H	Fe(OTf)₃	31
3c	6-OMe	Cu(OTf) ₂	12

Je však známe, že donorné substituenty naviazané na homoaromatickú časť chromónu znižujú ich reaktivitu pri C–H aktivácii v polohe C(2), preto sme pri ďalšej optimalizácii zvolili ako substrát nesubstituovaný chromón.

Pretože výťažky flavónov neboli ani pri použití $\text{Fe}(\text{OTf})_3$ porovnateľné s publikovanými (89 %) [1], rozhodli sme sa otestovať podmienky paládiom katalyzovanej C–H funkcionalizácie chromónov s arylborónovými kyselinami s pridaním fenantrolínu ako ligandu opísané Khoobim [2].



Obr. 5 Metóda B

Príprava flavónov s arylborónovými kyselinami ako arylačným činidlom v prítomnosti Lewisovej kyseliny, fenantrolínu a bázy.

Uskutočnením reakcie v opísaných podmienkach, avšak iba so vzdušným kyslíkom ako oxidovadlom sme získali pri reakcii chromónu 3b s *p*-metoxyfenylborónovou kyselinou (2a) požadovaný produkt vo výťažku 26 %, ktorý je výrazne nižší ako publikovaný (lit. 86 %) [2].

Výťažok reakcie sme sa pokúsili zvýšiť pridaním Lewisovej kyseliny. Otestovali sme dva trifláty a ich použitie viedlo k miernemu zvýšeniu výťažku produktu (o 7-10 %). $\text{Fe}(\text{OTf})_3$ je aj pri tejto metóde arylácie účinnejšou Lewisovou kyselinou ako $\text{Cu}(\text{OTf})_2$. Podľa HSAB princípu je Fe^{3+} tvrdšou kyselinou ako Cu^{2+} , čo zvyšuje jeho afinitu ku karbonylovému kyslíku, ktorý je tvrdou bázou. Pri použití $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ v nadbytku (1,2 ekv.) sme však získali porovnateľný výťažok ako pri použití katalytického množstva $\text{Fe}(\text{OTf})_3$ (10 mol %) (Tab. 3).

Ďalej sme sa pokúsili zvýšiť reaktivitu arylborónovej kyseliny jej aktiváciou s bázou. Fluoridy, fosforečnany, uhličitany a hydrogensíraný sa ukázali ako nevhodné bázy. Po spracovaní reakčných zmesí, v ktorých boli prítomné tieto bázy, bol izolovaný produkt *homocouplingu* *p*-metoxyfenylborónovej kyseliny a východiskový chromón. Okrem anorganických báz sme otestovali aj pivaloany, ktoré sa pri C–H aktiváciach na chromónoch používajú [5] a nespôsobujú otváranie pyránového kruhu, ale reakcia napriek tomu pri použití CsOPiv ako bázy neprebehla. Arylácia chromónov v polohe C(2) prebiehala v prítomnosti octanov, vínanu, aj dihydrogenfosforečnanu, pričom najlepší výťažok sme dosiahli s použitím Na_2HPO_4 (Tab. 3).

Túto bázu sme použili aj v ďalšej optimalizácii a vyskúšali sme jej kombináciu s Lewisovými kyselinami resp. kyselinou pivalovou. Pri použití $\text{Fe}(\text{OTf})_3$ v prostredí Na_2HPO_4 sme získali produkt v relatívne uspokojivom výťažku 59 % (Tab.3, experiment 6). K reakčnej zmesi sme skúsili pridať aj DDQ ako oxidačné činidlo, avšak produkt sme získali len

v stopových množstvách, čo znamená, že Fe^{3+} resp. Cu^{2+} v reakcii pravdepodobne nevystupujú ako oxidanty. Použitie kyseliny pivalovej ako aditíva do reakčnej zmesi s Na_2HPO_4 taktiež nevedlo k zvýšeniu výťažku flavónu (Tab. 3).

Tab.3 Optimalizácia reakčných podmienok metódy B (vybrané reakcie)

Experiment	Lewisova kyselina	Báza	Aditívum	Výťažok (%)
1	-	-	-	26
2	$\text{Cu}(\text{OTf})_2$ (1,2 ekv.)	-	-	33
3	$\text{Fe}(\text{OTf})_3$ (0,1 ekv.)	-	-	36
4	-	Na_2HPO_4 (2 ekv.)	-	35
5	$\text{Cu}(\text{OTf})_2$ (1,2 ekv.)	Na_2HPO_4 (2 ekv.)	-	18
6	$\text{Fe}(\text{OTf})_3$ (0,1 ekv.)	Na_2HPO_4 (2 ekv.)	-	59

Záver

Zopakovaním v literatúre opísaných reakčných podmienok sme nepripravili flavóny v očakávaných výťažkoch. Navrhli sme metódu paládiom katalyzovanej arylácie chromónov s arylborónovými kyselinami s použitím fenantrolínu ako ligandu uskutočnenú v prítomnosti Lewisovej kyseliny ($\text{Fe}(\text{OTf})_3$) a bázy (Na_2HPO_4), ktorou sme získali flavón 3b vo výťažku 59 %.

PodĎakovanie

Táto práca bola finančne podporená grantom VEGA 1/0804/21.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Kim D., Ham K., Hong S. (2012) Org. Biomol. Chem. 10, p. 7305
- [2] Khoobi M., Alipour M., Zarei S., et al. (2012) Chem. Commun. 48, p. 2985
- [3] Qin T., Liu B., Xu Z., et al. (2021) Sens. Actuators, B Chem. 336, p. 1
- [4] Xu S., Tang R., Wang Z., et al. (2015) Spectrochim. Acta A Mol. Bio. Spectrosc. 149. p. 208
- [5] Min M., Choe H., Hong S. (2012) Asian J. Org. Chem. 1, p. 47

Uncovering properties of 2D materials at finite temperatures using *ab-initio* molecular dynamics and machine-learned force fields

Katarína Skladanová¹, Tomáš Bučko^{1,2}

¹*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Physical and Theoretical Chemistry, Ilkovičova 6, 841 04 Bratislava, Slovak republic;*

skladanova6@uniba.sk

²*Institute of Inorganic Chemistry of Slovak Academy of Sciences, v. v. i., Dúbravská Cesta 9, 842 36 Bratislava, Slovak republic*

Abstract

We used the on-the-fly machine-learning force field method, recently introduced in VASP, to accelerate finite-temperature *ab-initio* molecular dynamics simulations of benzene adsorption on a graphene. Dispersion interactions essential in describing the adsorption process were accounted for using several dispersion-corrected methods, including empirically corrected PBE+D methods as well as computationally more demanding nonlocal functionals. This was accomplished using machine learning perturbation theory, which reduced the computational demands of more advanced vdW methods to the level of single point calculations.

Keywords: 2D materials; van der Waals interactions; AIMD; machine learning force fields

Introduction and Objectives

Two-dimensional (2D) materials, a few-atomic-layer counterparts of layered crystals, have revolutionized the field of materials science in the past decades. Due to the constrained dimensions, the isolated layers of, e.g., graphite, transition metal dichalcogenides or black phosphorus possess a variety of unusual properties. These include high carrier mobility, layer-dependent band gap or anisotropic spectral properties, and naturally place high expectations on the contribution of 2D materials in the development of new and advanced technologies.

The properties of 2D materials and their bulk crystals are often studied using Kohn-Sham density functional theory (DFT). Therein, the weak interlayer van der Waals (vdW) forces stabilizing the layered structure are included either as an empirical correction to the electronic energy [1] or by means of nonlocal energy functionals [2] that directly account for dispersion effects. Many papers report successful use of vdW functionals in reproducing experimental lattice parameters [3] or adsorption enthalpies [4] of 2D materials. However, according to a recent study [5] on benzene dimer the performance of vdW functionals can deteriorate when they describe system in other than perfect geometry. Therefore, it is important to assess the performance of vdW functionals under more realistic conditions, which can be achieved using *ab-initio* molecular dynamics (AIMD) simulations at finite temperatures.

AIMD propagates the atomic coordinates and momenta using forces evaluated at each

time step using accurate *ab-initio* electronic-structure calculations. Unfortunately, this increases the cost of the simulation and limits its applicability to rather small systems or short time scales. Recently, significant improvements have been made using state-of-the-art machine learning (ML) techniques. Michaelides et al. [6] used the Gaussian approximation potential method and successfully accelerated AIMD simulations of graphene, hexagonal boron nitride and black phosphorene. Encouraged by a huge success of ML intermolecular potentials in extending the applicability of AIMD to large periodic systems while significantly reducing its computational workload, we decided to use this technique in assessing finite temperature properties of 2D materials and its bulk structures. Over the years, several papers [7, 8] have been published estimating interlayer cohesive energy of graphite based on the high structural similarity of benzene and other polycyclic aromatic hydrocarbons to graphene. In this work, we have taken advantage of recent advances in ML force fields (MLFF) to investigate the performance of ML-enhanced AIMD in simulating the adsorption of benzene on a graphene surface at 150 K.

The adsorption enthalpy was determined as the potential energy difference between the interacting benzene-graphene system (V_{b+g}) and the isolated components (V_g and V_b), corrected for contributions from volume changes ($-k_B T$):

$$\Delta_{ads}H = \langle V \rangle_{b+g} - \langle V \rangle_b - \langle V \rangle_g - k_B T \quad [I.]$$

where the $\langle \dots \rangle$ term denotes the observable quantity averaged over canonical (NVT) ensemble, k_B is the Boltzmann constant, and T is a thermodynamic temperature in K . The volume changes have been accounted for assuming (i) exact cancellation of the contributions arising from pure graphene and its complex with benzene; (ii) ideal gas behavior of isolated benzene molecule; and (iii) equipartition theorem according to which each degree of freedom quadratic in position has an average energy of $1/2 k_B T$. Furthermore, we assumed (iv) the harmonic approximation (HA), whereby the potential energy terms $\langle V \rangle_i$ of eq. I. can be rewritten as a sum of the potential energy $V_{0,i}$ minimized for the i th state and the contribution of thermal vibrations $\frac{N_i}{2} k_B T$, where N_i is total number of vibrational degrees of freedom of the i th state. This allowed the adsorption enthalpies to be estimated using single point calculations. Suitability of HA and contributions of anharmonic effects at desired temperature (150 K) were considered using finite-temperature AIMD simulations accelerated by ML.

Materials and methods

We employed projection-augmented wave method with plane-wave basis expanded up to kinetic energy cutoff of 400 eV, as implemented in the DFT simulation package VASP [9]. Dispersion interactions between benzene molecule and 8×8 orthorhombic graphene surface ($a_1 = 19.695 \text{ \AA}$, $a_2 = 17.057 \text{ \AA}$, $a_3 = 27.444 \text{ \AA}$; see Fig. 1) were described by PBE+D3 method of Grimme [1]. Single k-point at the center of the first Brillouin zone was used for integration in reciprocal space. The self-consistent field (SCF) convergence criterion was set to 10^{-08} eV. The geometry of the interacting system and its isolated components was optimized by single point calculations until the forces acting on atoms were less than $0.005 \text{ eV/\AA}$. The potential energies of the relaxed structures were used in the calculation of the adsorption enthalpies (see eq. I.), while the geometries served as the starting structures in canonical AIMD simulations of benzene adsorption on graphene at 150 K. This temperature was maintained by Andersen thermostat with a collision probability of 0.02 per atom and a step. The simulations were conducted for 100 ps with an integration step of 1 fs. The mass of the hydrogen atom was increased to 5 au. AIMD simulations accelerated by ML were performed using on-the-fly MLFF algorithm, which was recently implemented [10] in VASP. Reference structures that parameterized MLFF were automatically sampled during three consecutive 10 ps AIMD simulations, the first of which was performed in the temperature range of 10 to 400 K and the latter two at 150 K. To increase the accuracy of ML-accelerated AIMD simulations to the level of non-accelerated AIMD we employed the machine learning thermodynamic perturbation theory (MLPT) introduced in ref. [11]. MLPT is based on Δ -ML [12], which is a supervised ML method designed to learn the structure-property relationship between a computationally less demanding production method and a target method and to predict the differences in values of the observable properties. The perturbative procedure expresses the Hamiltonian of target method H' as a sum of production method Hamiltonian (H) and the change in the potential exerted on nuclei (ΔV). Averaged observable over canonical ensemble described by H' :

$$\langle O \rangle_{H'} = \frac{\langle O \exp\{-\Delta V/k_B T\} \rangle_H}{\langle \exp\{-\Delta V/k_B T\} \rangle_H} \quad [\text{II.}]$$

can be therefore derived from the ensemble average of the production method Hamiltonian $\langle \dots \rangle_H$ by reweighting the configurations with respect to the energies predicted by Δ -ML. Δ -ML model used in this work was trained and validated on two paired structure-energy datasets, each consisting of 100 structures separated by 2 ps in the production run. MLPT was further

used to predict the energy differences relative to other vdW methods. Configurational overlap between target and production methods necessary to achieve reasonable accuracy of MLPT approach was assessed using the procedure introduced in ref. [13].

Results and discussion

Let us first review the performance of some prominent vdW functionals in describing the adsorption of benzene to a randomly chosen position parallel to graphene surface (Fig. 1). The adsorption enthalpies, which were estimated in single point calculations by adding thermal and volume corrections to the evaluated adsorption energies (eq. I.), are summarized in Tab. 1 and naturally divide the functionals into two groups that differ in the way the dispersion effects are accounted for. The optB86b-vdW and optB88-vdW nonlocal functionals overestimate the adsorption enthalpies while the pair-additive PBE+D and SCAN+D methods underestimate them. This observation agrees well with the work of Otyepka et al. [14], who reported similar results for adsorption on fluorographene.

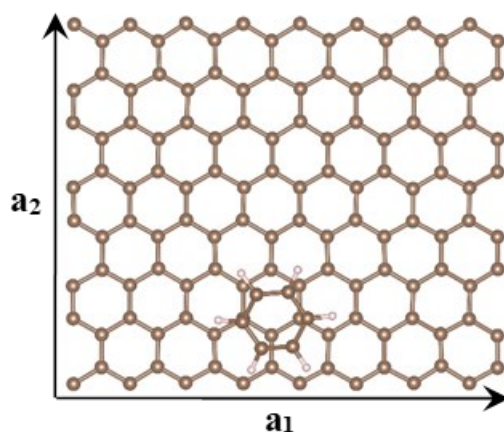


Fig. 1. Adsorption geometry – Random snapshot of benzene adsorbed on graphene selected from the production run. The arrows indicate the $\mathbf{a}_1$ and $\mathbf{a}_2$ lattice vectors of the supercell. The lattice vector $\mathbf{a}_3$ is perpendicular.

The appropriateness of HA used to account for the contribution of thermal vibrations was assessed in finite-temperature AIMD simulations, which intrinsically include anharmonic effects beyond HA. AIMD accelerated by MLFF was performed using the zero-damping variant of the PBE+D3, which proved to be computationally efficient yet reasonably accurate method, capable of properly modelling dispersion interactions essential in benzene adsorption (Tab. 1). The results of the accelerated AIMD simulations are shown in Tab. 1 and demonstrate excellent performance of HA in describing thermal effects acting on benzene-graphene system

at 150 K. To verify and possibly further improve the accuracy of the accelerated AIMD simulations we used MLPT approach. The adsorption enthalpy predicted for the target PBE+D3 method is in perfect agreement with the result of the underlying production simulation. Reasonably good agreement with the reference non-accelerated calculations was also achieved in the PBE+D3 driven single point calculations accelerated using appropriate MLFFs.

Tab. 1. Adsorption enthalpies – Adsorption enthalpies of benzene (in eV) obtained from single point calculations and MLPT based on *ab-initio* molecular dynamics (AIMD) simulations performed at the PBE+D3 level accelerated by ML. The values in parentheses correspond to ensemble averages from PBE+D3 production run.

	Single point calculations	AIMD	Ref.
Expt.	0.50±0.083		[7]
	0.51±0.013		[4]
PBE+D2	-0.394	-0.370 ± 0.009	This work
PBE+D3	-0.401 (-0.393)	-0.407 (-0.404) ± 0.009	This work
PBE+MBD@rSC	-0.355		This work
SCAN+rVV10	-0.407		This work
SCAN+MBD@rSC	-0.456		This work
optB88-vdW	-0.565	-0.571 ± 0.009	This work
optB86b-vdW	-0.572		This work

Encouraged by the promising results of the PBE+D3 functional we employed MLPT to evaluate the adsorption enthalpies for much more demanding vdW functionals. Additionally, we applied the perturbative procedure to the PBE+D2, as it belongs to the same family of dispersion-corrected functionals as the production (PBE+D3) method. Predicted time-averaged adsorption enthalpies are listed in Tab. 1 and are again in good agreement with the results of the single point calculations, which underlines the relative unimportance of anharmonic effects at the simulation temperature considered in this work (150 K). The agreement with temperature-programmed desorption [7] is within the measurement uncertainty for the majority of the vdW functionals, while the result of inverse-gas chromatography [4] is most accurately reproduced by the optB88-vdW nonlocal functional.

Conclusion

We have successfully accelerated otherwise time-consuming finite-temperature AIMD

simulations of benzene adsorption on a graphene surface, whereby the dispersion interactions were examined at different levels of theory. This was achieved using the machine-learned force fields and the machine learning thermodynamic perturbation theory, based on potential energy differences predicted by Δ -ML. Accelerated AIMD simulations were in excellent agreement with the results of single point calculations corrected by harmonic approximation, confirming negligible contribution of anharmonic effects at 150 K, as well as high accuracy of the trained ML models. Moreover, MLPT approach significantly reduced the unfavorable computational demands of more advanced vdW functionals thus allowing time-averaged adsorption enthalpies to be obtained at a cost of single-point calculations.

Acknowledgement

This work was supported by Comenius university under grant number UK/272/2023.

References

- [1] Grimme S., Antony J., Ehrlich S., Krieg H. (2010) J. Chem. Phys. 132(15), p. 154104
- [2] Klimeš J., Bowler D., Michaelides A. (2010) J. Phys. Condens. 22(2), p. 022201
- [3] Björkman T. (2014) J. Chem. Phys. 141(7), p. 074708
- [4] Otyepková E., Lazar P., Čépe K., et al. (2016) Appl. Mater. Today 5, p. 142
- [5] Gould T., Johnson E., Tawfik S. (2018) Beilstein J. Org. Chem. 14, p. 1181
- [6] Rowe P., Csányi G., Alfè D., et al. (2018) Phys. Rev. B. 97(5), p. 054303
- [7] Zacharia R., Ulbricht H., Hertel T. (2004) Phys. Rev. B. 69(15), p. 155406
- [8] Wang W., Dai S., Li X., et al. (2015) Nat. Commun. 6(1), p. 7853
- [9] Kresse G., Furthüller J. (1996) Phys. Rev. B. 54(16), p. 11169
- [10] Jinnouchi R., Karsai F., Kresse G. (2019) Phys. Rev. B. 100(1), p. 014105
- [11] Chehaibou B., Badawi M., Bučko T., et al. (2019) J. Chem. Theory Comput. 15(11), p. 6333
- [12] Ramakrishnan R., Dral P. O., Rupp M., et.al. (2015) J. Chem. Theory Comput. 11(5), p. 2087
- [13] Herzog B., Chagas da Silva M., Casier B., et.al. (2022) J. Chem. Theory Comput. 18(3), p. 1382
- [14] Karlický F., Otyepková E., Lo R., et.al. (2017) J. Chem. Theory Comput. 13(3), p. 1328

Unveiling Co -V mixed borate $\text{Co}_x\text{V}_{5-x}\text{B}_{12}\text{O}_{25}(\text{OH})$: High-pressure synthesis using multianvil press and crystal structure analysis

Janaki Devi Somasundaram¹, Hubert Huppertz², Lukáš Krivosudský¹

¹*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Inorganic Chemistry, Ilkovičova 6, Mlynská dolina, 842 15, Bratislava, Slovak republic;
somasundaram1@uniba.sk*

²*University of Innsbruck, Institute for General, Inorganic und Theoretical Chemistry, Innrain 80–82, 6020 Innsbruck, Austria*

Abstract

High-pressure synthesis of borates incorporating main group elements are well-established so far, and currently the aspect of transition metal borates are predominantly focused. The typical multianvil press is one of the most influential high pressure instruments available for leveraging exceptional pressure to the range of 25 GPa. A novel, first-of-its kind cobalt-vanadium mixed borate $\text{Co}_x\text{V}_{5-x}\text{B}_{12}\text{O}_{25}(\text{OH})$ **1** was synthesized using a 1000t multi anvil press equipped with a walker type module under 14/8 octahedron assembly. The title compound crystallizes in tetragonal space group $I4_1/acd$ (no. 142) and has eight formula units $Z = 8$, with unit cell parameters $a = 11.4360(3)$ Å, $c = 22.0200(11)$ Å. The crystal system makes up the structure type $\text{M}_5\text{B}_{12}\text{O}_{25}(\text{OH})$ where M stands for Co and V in varying occupancies throughout the structure.

Keywords: Borates; Cobalt; Vanadium; High-pressure; Multianvil press; Single-crystal

Introduction and Objectives

Pressure is a physical quantity, which has a spectacular potential to shrink the interatomic and intermolecular distances, and consequently has a direct influence on the periodicity of the elements within a compound. This unusual diminishing of the interatomic and intermolecular distances can lead to the formation of the unprecedented compounds, which are not easily synthesized under atmospheric pressure conditions [1]. The field of high-pressure synthesis of transition metal borates has gained enormous curiosity in the past two decades, due to the possibility of synthesizing unknown and compulsive structural conformations of the well-established chemical structures, and thereby enhancing their material chemistry applications. In the year 2009, the work of Almut Haberer and Hubert Huppertz reported the high-pressure synthesis and the crystal structure of the new titanium borate with the structure $\text{Ti}_5\text{B}_{12}\text{O}_{26}$ [2]. There were two other triel borates reported by Daniela Vitzhum et al. in the year 2020 such as $\text{Al}_5\text{B}_{12}\text{O}_{25}(\text{OH})$ and $\text{Ga}_4\text{InB}_{12}\text{O}_{25}(\text{OH})$ [3]. The $\text{M}_5\text{B}_{12}\text{O}_{26}$ and $\text{M}_5\text{B}_{12}\text{O}_{25}(\text{OH})$ system based borates are likely to possess prospective photocatalytic luminescence and hydrogen production. In this contribution, a novel cobalt-vanadium mixed borate with the chemical composition $\text{Co}_x\text{V}_{5-x}\text{B}_{12}\text{O}_{25}(\text{OH})$ was successfully synthesized employing high-

pressure synthesis (and high-temperature conditions) using a multianvil press and its surprising crystal structure was characterized, via single crystal X-ray measurements.

Materials and methods

All the chemicals such as V_2O_5 , Co_3O_4 , and B_2O_3 were used as commercially purchased, without further purification. The 1000 t multianvil press (Max Voggenreiter GmbH, Mainleus, Germany) furnished with a Walker-type module is the chief equipment used for generating the high-pressure & high-temperature conditions. Single crystals of the compound *I* discussed henceforth were obtained through the high-temperature/high-pressure approach. Initially, the required chemicals in desired stoichiometric proportions are weighed and then ground into fine powder in an agate mortar. The ground sample is filled in a platinum capsule (99.95%, Ögussa, Vienna, Austria). The filled platinum capsule is stationed inside a boron nitride crucible (Henze Boron Nitride Products AG, Lauben, Germany), which in succession is positioned inside an 14/8 octahedron arrangement, which is further placed inside the eight tungsten carbide cubes assembly, and it is promoted into the Walker-type module fitted with six-steel wedged anvil marshaling, and the lid of the Walker-type module is placed on the top, and the module-assembly fitted with the multianvil was vertically compressed, which brings about the quasi-hydrostatic compression of the ground sample [4]. The suitable single crystals of the compound *I* were picked under a polarizing microscope and analyzed using a Bruker D8 Quest diffractometer (Mo- K_α radiation, $\lambda = 0.7107 \text{ \AA}$) equipped with a Photon 300 CMOS detector. Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) is used to examine the chemical composition of the sample under examination. In compound *I*, it can be seen that the elements Co and V possess certain sites with the mixed occupancy. So, EDX aids in estimating the percentage composition of the individual elements.

High-pressure synthesis of $Co_xV_{5-x}B_{12}O_{25}(OH)$ (1)

V_2O_5 , Co_3O_4 and B_2O_3 were taken in appropriate stoichiometry and ground into a fine powder in an agate mortar and it was filled into the Pt capsule and loaded into the 14/8 octahedron assembly and was placed inside a cubic construction, which is in turn fed into the Walker-type module of the multianvil press, containing the six-steel wedges. The sample was subjected to appropriate high pressure (GPa), and the high temperature conditions ($>1000^\circ\text{C}$). The high pressure was built in 320 minutes and then the heating phase began with the building-up step, reaching the maximum temperature in 10 minutes and then the holding-up phase continued for 60 minutes and then the heating declined momentarily. Decompression to

the ambient conditions lasted for 950 minutes and the crystalline product was extracted from the already obtained Pt capsule.

Results and discussion

Single- crystal structure of $\text{Co}_x\text{V}_{5-x}\text{B}_{12}\text{O}_{25}(\text{OH})$

The crystal structure of $\text{Co}_x\text{V}_{5-x}\text{B}_{12}\text{O}_{25}(\text{OH})$ falls into the tetragonal space group $I4_1/acd$ (no. 142) and has eight formula units $Z = 8$, with unit cell parameters $a = 11.4360(3)$ Å, $c = 22.0200(11)$ Å. The crystal structure makes up the structure type $\text{M}_5\text{B}_{12}\text{O}_{25}(\text{OH})$, where the five metallic sites have been shared between Co and V, each contributing about 80% and 20%, respectively, according to the single crystal X-ray diffraction measurements.

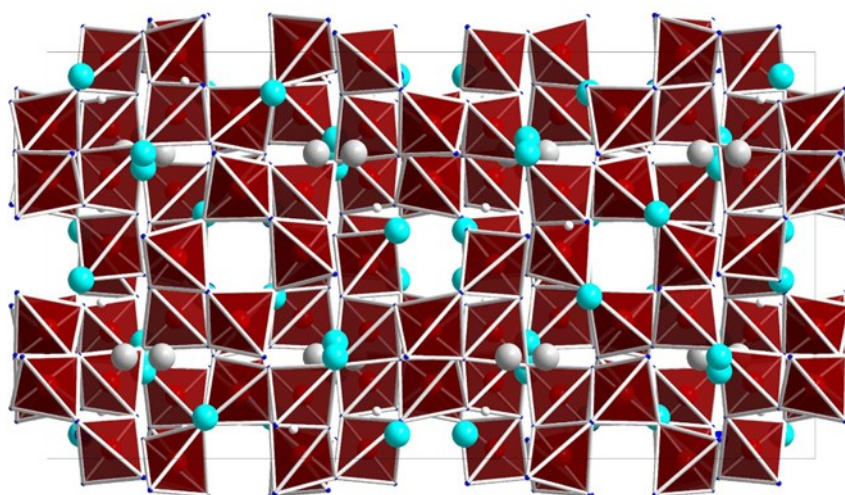


Fig. 1. The $\text{Co}_4\text{VB}_{12}\text{O}_{25}(\text{OH})$ cluster arrangement in the unit cell along $[100]$; Co aqua, V gray, B red; O blue)

With reference to the previously reported $\text{Ti}_5\text{B}_{12}\text{O}_{26}$ and two other triel borates $\text{Al}_5\text{B}_{12}\text{O}_{25}(\text{OH})$ and $\text{Ga}_4\text{InB}_{12}\text{O}_{25}(\text{OH})$ [2,3], it is evident that the cobalt-vanadium borate $\text{Co}_4\text{VB}_{12}\text{O}_{25}(\text{OH})$ has exactly the same site symmetry and structure as that of the titanium borate and other two triel borates and so their structural aspects are comparable and correlatable. $\text{Co}_x\text{V}_{5-x}\text{B}_{12}\text{O}_{25}(\text{OH})$ comprises exclusively corner-sharing BO_4 tetrahedra and has B_3O_9 as the fundamental building block. Upon the quadruple (four-fold) aggregation of B_3O_9 , the structure spreads into a $\text{B}_{12}\text{O}_{26}$. These $\text{B}_{12}\text{O}_{26}$ clusters further assemble themselves to form the structure, which is almost relevant to the crystal structure of the known Zintl phases NaTl.

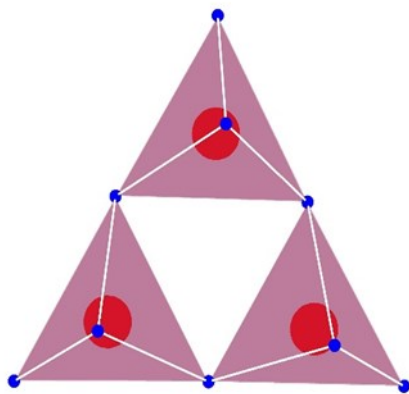


Fig. 2. The smallest building block of the structure B_3O_9 ; B red; O blue

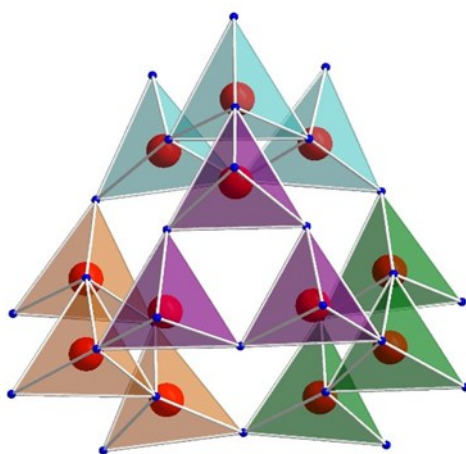


Fig. 3. The fourfold assembly of B_3O_9 units leads to the formation of the $B_{12}O_{26}$ cluster; B red; O blue. All clusters are equivalent, the color coding is for explanatory purposes only.

Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX)

Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) measurement was conducted and the outcome of the EDX analysis confirms the presence of the V and Co metals in the ratio 1:4 (expressed in atomic percentage, V = 2.09, Co = 8.10) in some specific regions, which is underlined in the below table. Therefore, the results of the EDX analysis demonstrates precisely the presence of vanadium and cobalt in 1:4 ratio, which complies fairly well and in good agreement with the obtained single-crystal structural data. However, there are also other regions of the bulk crystal where the ratio of the V : Co was not always consistent with each other and thus, deviation in the atomic percentage of the vanadium and cobalt was observed.

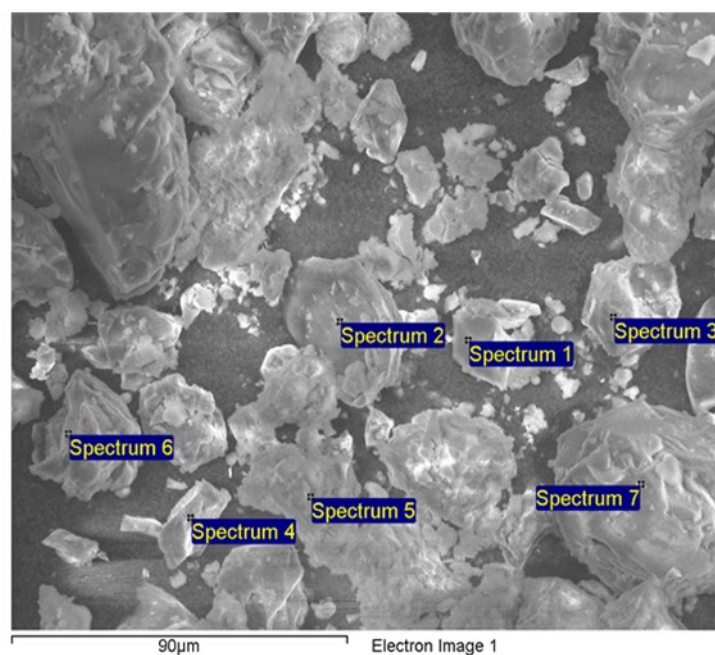


Fig. 4. Image from Scanning electron microscopy, as part of the EDX measurement

Tab.1. EDX measurements - Atomic percentage composition of Co and V in Spectrum 1-7

Spectrum	In stats.	B	O	V	Co
Spectrum 1	Yes	0.00	76.79	14.82	8.40
Spectrum 2	Yes	0.00	86.32	9.12	4.56
Spectrum 3	Yes	0.00	85.48	6.77	7.75
<u>Spectrum 4</u>	Yes	0.00	89.80	<u>2.09</u>	<u>8.10</u>
Spectrum 5	Yes	0.00	89.38	1.75	8.86
Spectrum 6	Yes	0.00	88.12	7.80	4.08
Spectrum 7	Yes	0.00	82.77	5.63	11.60
Mean		0.00	85.52	6.86	7.62
Std. deviation		0.00	4.56	4.47	2.59
Max.		0.00	89.80	14.82	11.60
Min.		0.00	76.79	1.75	4.08

Conclusion

Overall, the data supports the existence of the novel crystal structure of Co-V mixed borate system $\text{Co}_x\text{V}_{5-x}\text{B}_{12}\text{O}_{25}(\text{OH})$ with the structure type $\text{M}_5\text{B}_{12}\text{O}_{25}(\text{OH})$ which was synthesized incorporating the high-pressure approach through the multianvil press, under the

extremely high pressure and temperature conditions. The single crystals of this Co-V borate were extracted and measured for single crystal X-ray measurements and analyzed for their structural aspects. The Energy-Dispersive X-ray (EDX) measurement of the picked single-crystal reveals the proof that the crystal structure contains both the Co and V in varying atomic percentages throughout the sample bulk. Nevertheless, the expected ratio of 1:4 for V:Co from the single crystal measurements, has also been shown beyond doubt in the measurement.

Acknowledgement

The author JDS extends her foremost gratitude to almighty God and heartfelt thanks to Prof. Hubert Huppertz, Prof. Jozef Noga, Assoc. Prof. Lukas Krivosudsky, Assoc. Prof. Gunter Heymann, Prof. Dr. Rainer Pottgen, M.Sc. Leonard C. Pasqualini for their contribution, support and encouragement in various steps and stages. The authors feel extremely grateful to the University of Innsbruck, Austria, and the OeAD AKTION Austria-Slovakia research grant for doctoral students, which made it possible to carry out this specific research in the unique field of high-pressure synthesis, employing the exorbitantly pricey multianvil press instrument.

References

- [1] Wang, X., Liu, X. (2020) Inorg. Chem. Front. 7(16), p. 2890
- [2] Haberer, A., Huppertz, H. (2009). J. Solid State Chem., 182(3), p. 484
- [3] Vitzthum, D., Wimmer, D. S., Widmann, I., et al.(2020). Z. Naturforsch. B, 75(6), p.605
- [4] Zimmerhofer, F., Netzer, F., Tribus, M (2022). Z. Naturforsch. B, 77(9), p. 57

Enantioselektívna syntéza fluórovaných chirálnych dihydropyránov s potenciálnou biologickou aktivitou

Klára Stankovianska, Mária Mečiarová, Radovan Šebesta

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie,
Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
stankovianska2@uniba.sk

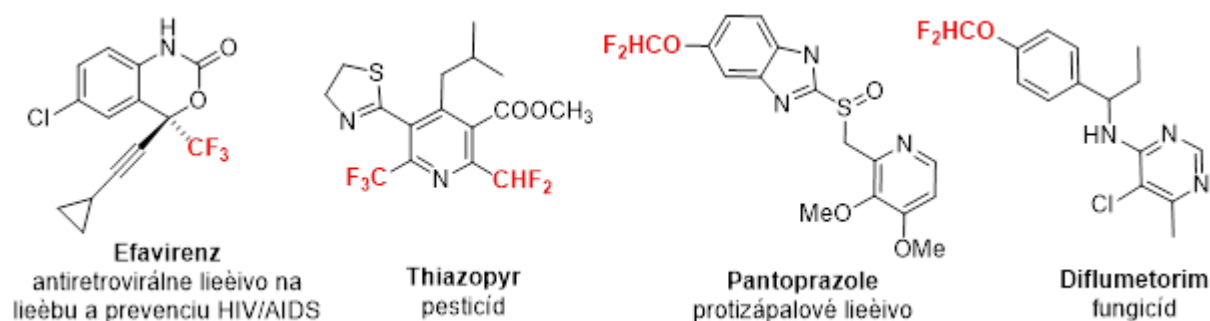
Abstract

Enantioselective synthesis of fluorinated chiral dihydropyrans with potential biological activity
Chiral pyran-based heterocycles occur in a variety of densely functionalized natural products and bioactive compounds. Oxa-Diels-Alder cycloadditions offer convenient access to these heterocyclic structures. The work aims to study the quinine-catalyzed IEDDA reactions of fluorinated β,γ -unsaturated ketones and α -ketoesters, which take place via a dienolate intermediate under mechanical activation in a ball mill. Liquid-assisted grinding proves a highly efficient way of affording high-yield pyrans, with high enantiomeric purities and short reaction times. The reaction provides different types of fluorinated dihydropyrans with three new stereogenic centres in good yield (up to 98 %) with diastereoselectivity of 3:1 dr and with enantioselectivity of up to 92 % ee. The biological activity of the prepared products will be tested in the near future.

Keywords: oxa-Diels-Alder reaction; IEDDA; dihydropyran; asymmetric catalysis; ball mill

Úvod a formulácia cieľa

Potreba syntetizovať nové typy liečiv kvôli rýchlej mutácii a zvyšujúcej sa rezistencii vírusov, či baktérií na doposiaľ používané liečivá je stále aktuálnejšia. Enantioselektívny prístup dokáže zabezpečiť syntézu liečiv vo vysokej optickej čistote a zabrániť tak nežiadúcim vplyvom iných enantiomérov. V mnohých štruktúrach liečiv majú atómy fluóru významnú funkciu. Štruktúry obsahujúce fluórové funkčné skupiny sú prítomné v mnohých prírodných zlúčeninách a biologicky aktívnych molekulách (Obr. 1.) [1–3].

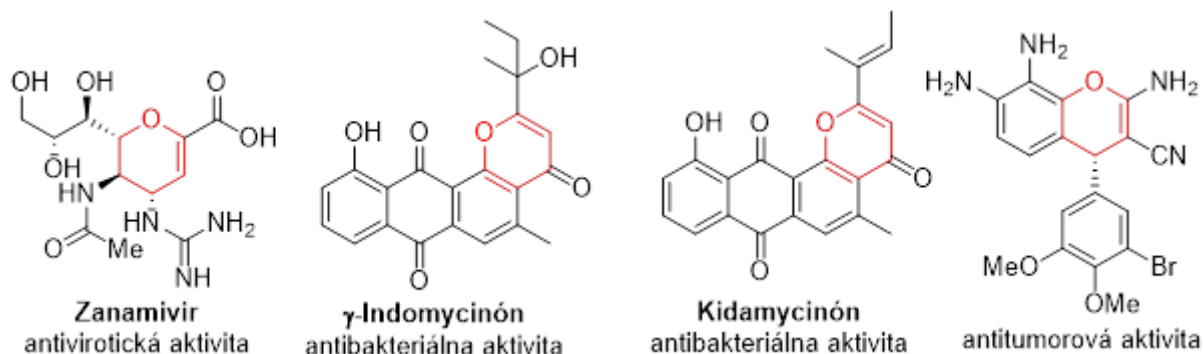


Obr. 1. Príklady biologicky účinných látok obsahujúcich v molekule fluór

Asymetrické hetero-Dielsove-Alderove (HDA) reakcie predstavujú účinnú metódu pre vytváranie nových σ -väzieb a syntézu chirálnych šesťčlánkových heterocyklov, ktoré môžeme nájsť v štruktúre mnohých biologicky aktívnych prírodných látok a farmaceutických výrobkoch [4].

Hlavným cieľom predkladaného projektu je štúdium enantioselektívnej syntézy 3,4-dihydropyránov oxa-Dielsovou-Alderovou reakciou s obrátenými elektrónovými požiadavkami (oxa-IEDDA), katalyzovanej bifunkčnými organokatalyzátormi a alkaloidmi chinínového typu. Ako východiskové látky boli použité β,γ -nenasýtené ketóny a β,γ -nenasýtené α -ketoestery. Pripravené produkty obsahujú heterocyklický skelet a atómy fluóru, čo môže pozitívne ovplyvniť ich biologickú aktivitu. Reakcie sú uskutočnené v podmienkach LAG (kvapalinou asistované mletie) v guľovom mlyne, čím sa zníži množstvo použitých rozpúšťadiel a zároveň negatívny dopad na životné prostredie. Pripravené produkty IEDDA reakcie môžu byť ďalej derivatizované za vzniku biologicky aktívnych látok.

Pomocou IEDDA reakcie je možné pripraviť z relatívne jednoduchých organických zlúčenín cyklické dihydropyrány, ktoré vykazujú významnú biologickú aktivitu, napr. antivirotickú, antibakteriálnu či antitumorovú aktivitu (Obr. 2.) [5–10].



Obr. 2. Príklady biologicky aktívnych chirálnych dihydropyránov

Materiál a metódy

Pri príprave východiskových látok boli použité komerčne dostupné chemikálie a rozpúšťadlá (Sigma-Aldrich, Acros, TCI, Mikrochem, Lach-Ner). Reakcie s využitím mechanickej aktivácie boli uskutočnené vo vibračnom guľovom mlyne značky MM400 (firma Retsch) (Obr. 3.) v reaktoroch s objemom 1,5 ml. Priebeh reakcií bol sledovaný tenkovrstvovou chromatografiou (TLC) na silikagélových platničkách (E. Merck silica gel 60 F₂₅₄). Vizualizácia zlúčenín bola uskutočnená UV svetlom (254 nm), alebo použitím vizualizačných

roztokov (kyselina fosfomolybdénová, anisaldehyd, KMnO_4) s následným zahrievaním teplovzdušnou pištoľou. Pri stĺpcovej chromatografii bol používaný silikagél značky Merck silica gel 60 (0,040–0,063 mm). ^1H a ^{13}C NMR spektrá boli merané na prístroji Varian NMR SystemTM 600 (600 MHz pre ^1H , 151 MHz pre ^{13}C). Ako vnútorný štandard bol použitý tetrametylsilán. Spektrá boli spracované v programe MestReNova. Optická čistota pripravených látok bola stanovená metódou HPLC s chirálnou kolónou Chiralpak-IA a UV detektorom (215 nm). Ako mobilná fáza bola použitá zmes hexánu a *i*PrOH (93:7).

Výsledky a diskusia

Po príprave potrebného východiskového materiálu bola uskutočnená štúdia oxa-Dielsovej-Alderovej reakcie. Vplyv organokatalyzátorov na stereoselektívny priebeh reakcie bol testovaný na modelovej oxa-Dielsovej-Alderovej reakcii fluórovaného difenylového ketónu 1a s ketoesterom 2a. Reakcie prebiehali v guľovom mlyne s 20 mol% katalyzátorov K1–K10 po dobu 5 min pri frekvencii mletia 20 Hz, pričom vznikali dva diastereoizoméry, ktoré boli následne chromatograficky izolované a plne charakterizované. Reakčná zmes bola zmáčaná dichlórmétanom (LAG). Metódou HPLC sme stanovili enantioméren nadbytok a pomer diastereoizomérov bol kontrolovaný analýzou ^1H NMR spektier surových reakčných zmesí. Výsledky pre všetky testované katalyzátory sú uvedené na obrázku 4.

Testované boli katalyzátory na báze prírodných alkaloidov a bifunkčné organokatalyzátory na báze skvaramidov a tiomočovín s chinínovou jednotkou K1–10, ktoré aktivujú substráty prostredníctvom tvorby vodíkových väzieb. V uskutočnených reakciách vznikali produkty vždy vo forme zmesi dvoch diastereoizomérov, ktoré bolo možné izolovať chromatograficky na stĺpci silikagélu. Na prípravu racemického štandardu potrebného pre HPLC merania sme reakciu uskutočnili s Et_3N ako bázou.

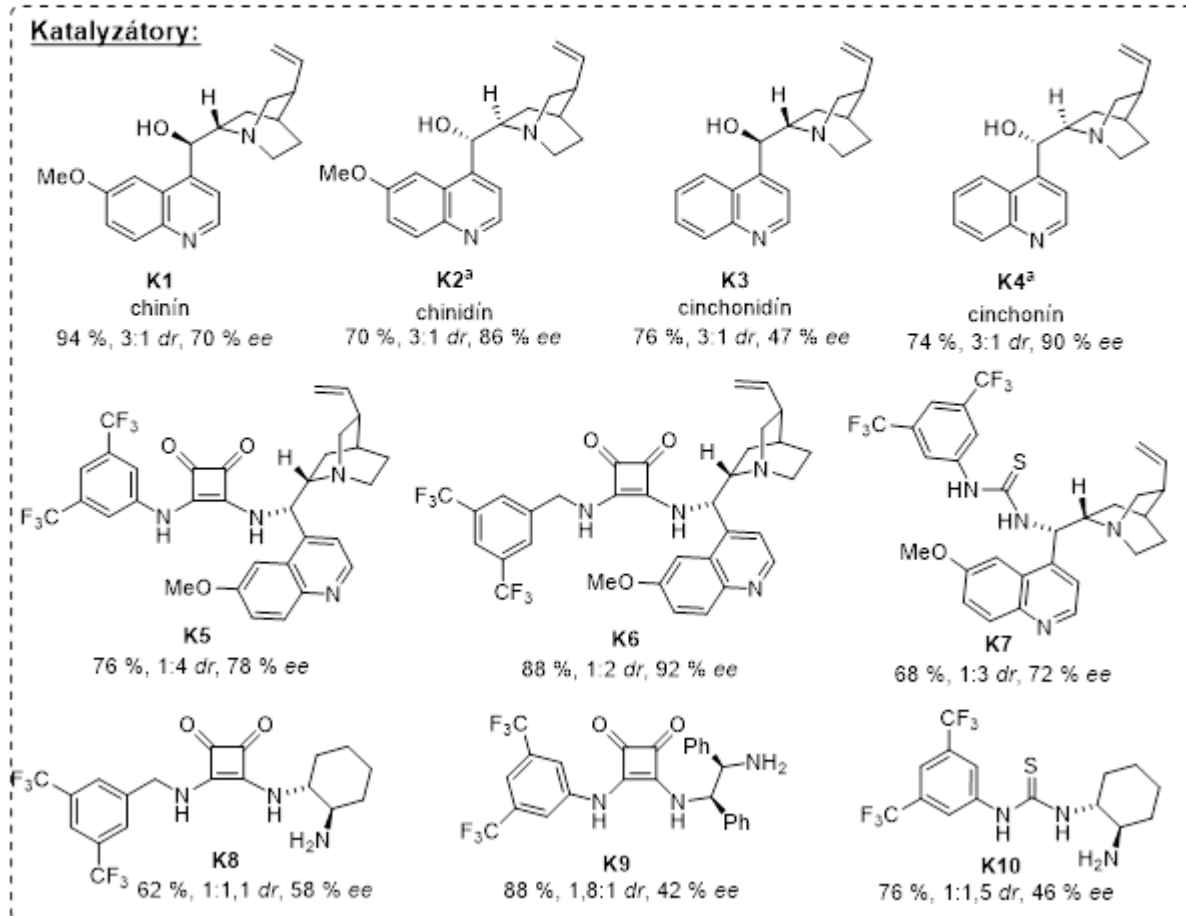
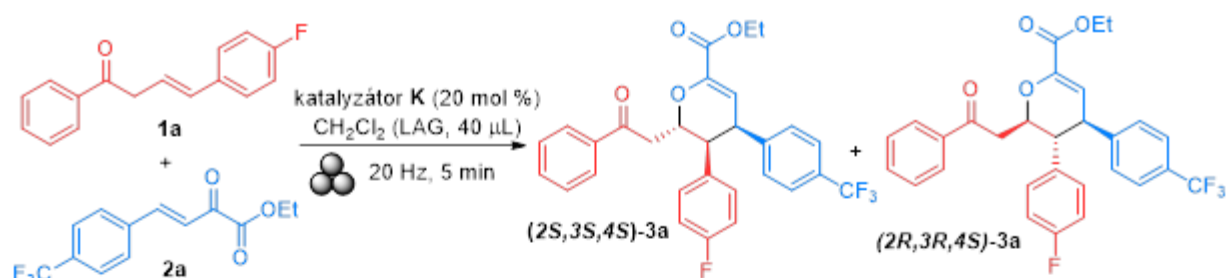
Pri reakciách katalyzovaných prírodnými alkaloidmi izolovanými z kôry chinínovníka bol dosiahnutý najlepší výťažok (94 %) s pomerne vysokou enantioselektivitou 70 % *ee* v reakcii s 20 mol% chinínu (K1), pričom v nadbytku vznikol (2*S*,3*S*,4*S*)-diastereoizomér. Najlepšia enantioselektivita reakcie (90 % *ee*) bola dosiahnutá v reakcii s cinchonínom (K4), avšak v nadbytku vznikol opačný enantiomér.

Pri testovaní bifunkčných skvaramidových katalyzátorov boli dosiahnuté najlepšie výsledky s katalyzátorom K6, pričom v nadbytku vznikol (2*R*,3*R*,4*S*)-diastereoizomér. Dihydropyrán 3a bol izolovaný vo výťažku 88 %, s pomerom diastereoizomérov 1:2 *dr*, pričom

enantiomérny nadbytok bol 92 %.

Reakcie katalyzované bifunkčnými tiomočovinovými katalyzátormi taktiež poskytli druhý (2*R*,3*R*,4*S*)-diastereoizomér v nadbytku. Reakcia s tiomočovinou K7 poskytla produkt 3a v 68 % výťažku s pomerom diastereoizomérov 1:3 *dr* a optickou čistotou 72 % *ee*.

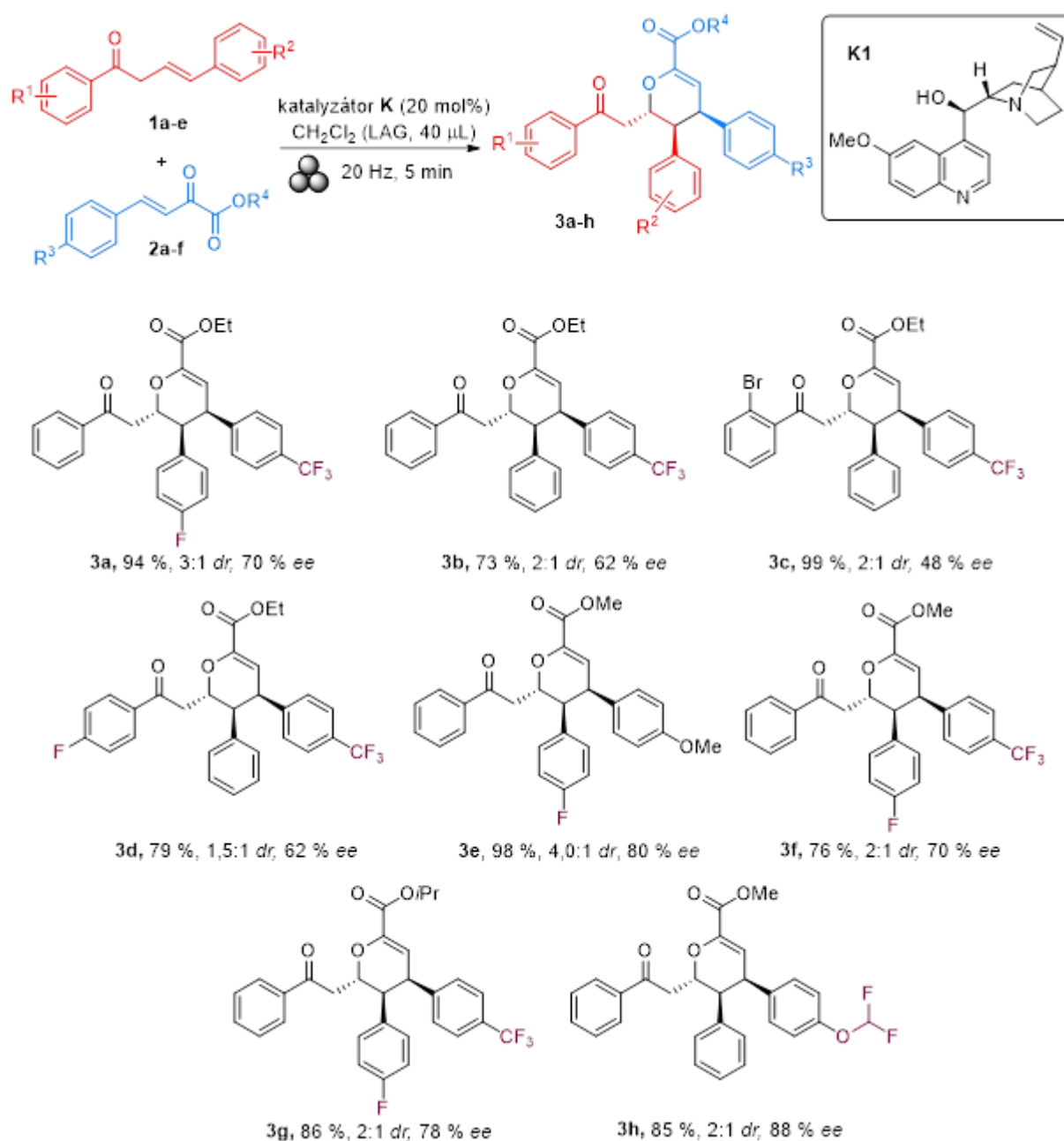
Na základe dosiahnutých výsledkov sme sa v ďalšom štúdiu zamerali na katalyzátory K1 pre prípravu (2*S*,3*S*,4*S*)-diastereoizoméru v nadbytku. Pre prípravu druhého (2*R*,3*R*,4*S*)-diastereoizoméru sme sa v ďalšom štúdiu zamerali na skvaramidový katalyzátor K6 a tiomočovinovú katalyzátor K7.



^a v nadbytku vznikol opačný enantiomér

Obr. 4. Testovanie katalyzátorov

Následne bol uskutočnený substrátový skrining s chinínovým katalyzátorom pre prípravu (2*S*,3*S*,4*S*)-diastereoizoméru v nadbytku (Obr. 6.). So sériou rôzne substituovaných β,γ -nenasýtených ketónov (1a-e) s α -ketoestermi 2a-f sme pripravili sériu 7 dihydropyránov (3a-h). Vo všetkých prípadoch sa jedná o nové doteraz neopísané zlúčeniny, ktoré boli plne charakterizované. Pre každú zlúčeninu bol pripravený racemický, potrebný pre HPLC merania. Touto metódou bola z dvoch achirálnych jednoduchých molekúl v jednom stupni pripravená molekula s tromi stereogénnymi centrami.



Obr. 5. Substrátový skrining IEDDA reakcie

Záver

Uskutočnili sme štúdiu oxa-Dielsovej-Alderovej reakcie s obrátenými elektrónovými požiadavkami β,γ -nenasýtených ketónov s α -ketoesterami obsahujúcimi atóm fluóru, CF_3 , OCF_3 , resp. OCHF_2 skupinu v podmienkach mechanického mletia v guľovom mlyne. Diastereo- a enantioselektívny priebeh reakcie bol zabezpečený použitím vhodných chirálnych bifunkčných organokatalyzátorov na báze skvaramidov a tiomočovín s chinínovou jednotkou, ako aj alkaloidov chinínového typu, ktoré aktivujú substráty prostredníctvom tvorby vodíkových väzieb. Reakcia poskytla rôzne dihydropyrány s tromi novými stereogénnymi centrami vo výťažku až 98 %, s diastereoselektivitou až 3:1 *dr* a s enantiomérou čistotou až 92 % *ee*.

PodĎakovanie

Táto práca bola podporená grantami VEGA 1/0332/19 a UK/147/2022.

Zoznam použitej literatúry

- [1] O'Hagan D. (2008) Chem. Soc. Rev. 37, p. 308
- [2] Xing L., Blakemore D. C., Narayanan A., et al. (2015) Chem. Med. Chem. 10, p. 715
- [3] Lee J. W., Zheng W., Morales-Rivera C. A., et al. (2019) Chem. Sci. 10, p. 3217.
- [4] Xie M., Lin L., Feng X. (2017) Chem. Rec. 17, p. 1
- [5] Donslund B. S., Monleón A., Larsen J., et al. (2015) Chem. Commun. 51, p. 13666
- [6] Richichi B., Lunghi C., Papakyriakou A., et al. (2013) Pure Appl. Chem. 85, p. 1803
- [7] Fatykhov R. F., Khalymbadzha I. A., Chupakhin O. N., et al. (2019) Synthesis 51, p. 3617
- [8] Jeziorek M., Damianakos H., Kawiak A., et al. (2019) Ind. Crop. Prod. 137, p. 446
- [9] Mabit T., Siard A., Pantin M. (2017) Org. Chem. 82, p. 5710
- [10] Peňaška T., Modrocká V., Stankovianska K., et al. (2022) Chem. Sus. Chem. 15, p. 1

Organokatalytická trojkomponentná domino Knoevenagelova/Dielsova-Alderova reakcia

Henrich Szabados, Eva Veverková, Radovan Šebesta

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie,
Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
szabados.henrich@gmail.com*

Abstract

Organocatalytic threecomponent Knoevenagel/Diels-Alder reaction

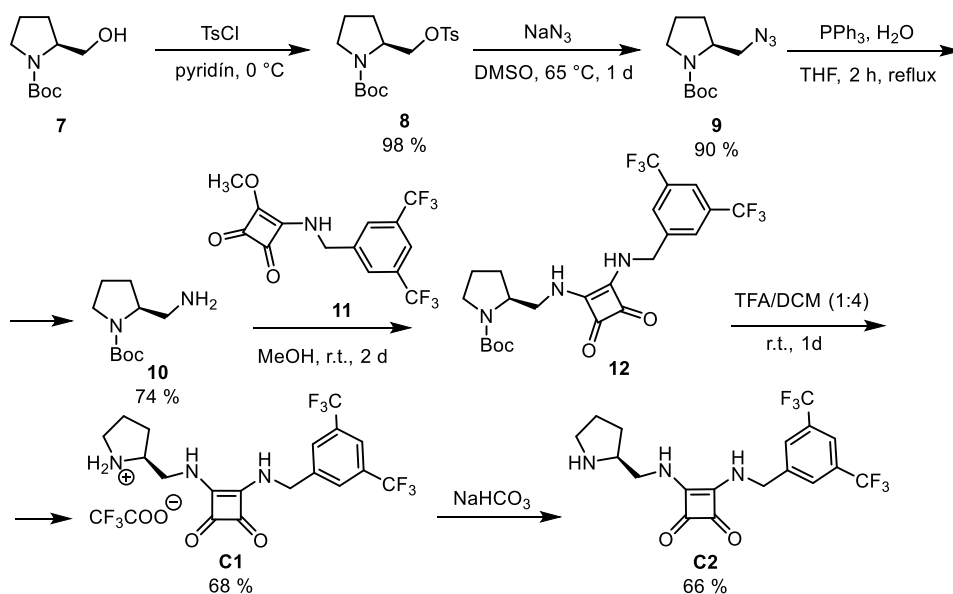
Preparation of spirocyclic ketones is possible via asymmetric domino Knoevenagel/Diels-Alder reaction using chiral amines as catalysts and commercially available starting compounds. Presented submission studies Knoevenagel/Diels-Alder reaction catalyzed by proline and 4-hydroxyproline derivatives in organic solvents, in water and under „solvent-free“ conditions using a ball mill.

Keywords: *asymmetric organocatalysis; Knoevenagel condensation; Diels-Alder reaction*

Úvod a formulácia cieľa

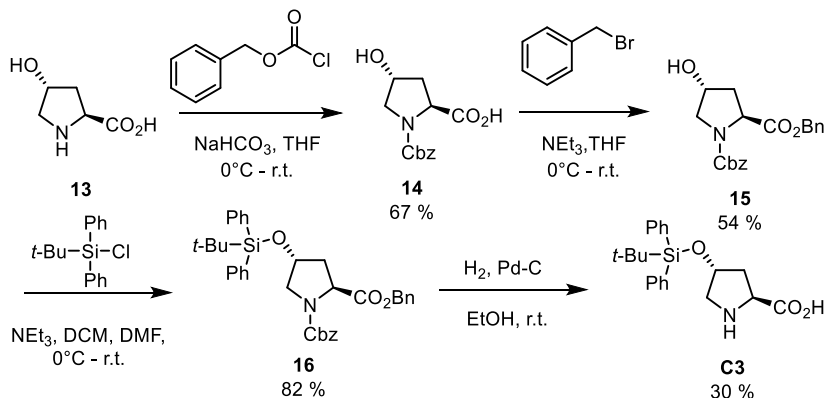
Asymetrická organokatalýza predstavuje významnú možnosť prípravy enantiomérne čistých zlúčenín. V porovnaní s katalyzátormi obsahujúcimi kov a dokonca aj biokatalyzátormi majú organokatalyzátory veľa predností. Sú menej citlivé na prítomnosť vody, nevyžadujú inertné podmienky a v porovnaní s enzýmami, ktorých použitie je veľmi špecifické, umožňujú reakcie so širokou škálou substrátov. Tieto unikátne vlastnosti organokatalyzátorov sú v súlade s princípmi zelenej chémie, ktoré sa usilujú o vývin procesov a produktov s ohľadom na minimalizáciu vzniku škodlivých látok, využívania neobnoviteľných zdrojov a vzniku odpadu [1]. Spirocyclické zlúčeniny nachádzajú využitie v syntéze prírodných látok a medicínskej chémií [2]. Z tohto dôvodu je potrebné rozvíjať metódy ich prípravy. Z literatúry je známe, že tieto zlúčeniny je možné pripraviť aj trojkomponentnou domino Knoevenagelovou/Dielsovou-Alderovou reakciou katalyzovanou sekundárnymi amínmi [3,4]. Túto metodológiu sme sa rozhodli rozšíriť o škálu použitých organokatalyzátorov a možnosť uskutočnenia tejto reakcie vo vodnom prostredí alebo za pomoci mechanického mletia v guľovom mlyne. Zamerali sme sa na reakciu α,β -nenasýtených ketónov 1a-c, 4-nitrobenzaldehydu (2) a Meldrumovej kyseliny (3) alebo 1,3-indandiónu (5) katalyzovanú organokatalyzátormi obsahujúcimi pyrrolidínovú jednotku C1-10 (Obr. 1.).

zredukovaná na amino skupinu za vzniku medziproduktu 10 [5]. Pyrolidínový skelet bol naviazaný na skvaramid 11 a Boc chrániaca skupina bola odstránená za vzniku finálneho organokatalyzátora C1 v 68% výťažku. Na získanie katalyzátora C2 bolo potrebné voľný amín uvoľniť z odpovedajúcej soli pomocou bázy pričom výťažok bol 66% (Obr. 2.) [6].



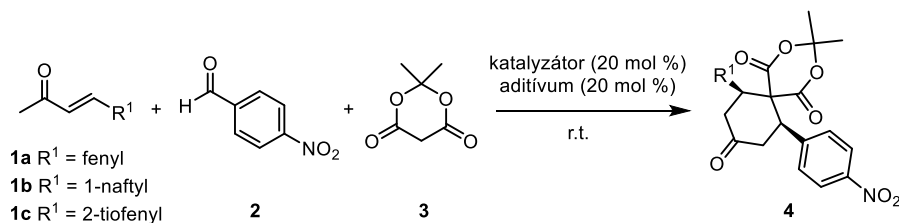
Obr. 2. Syntéza skvaramidových organokatalyzátorov C1 a C2

Organokatalyzátor C3 bol pripravený štvorstupňovou syntézou vychádzajúc z 4-hydroxyprolínu (13). Amino skupina bola ochránená benzyl chloroformiátom za vzniku medziproduktu 14. Karboxylová kyselina bola ochránená pomocou benzyl bromidu tvoriac medziprodukt 15 [7]. Substitúciou bol vodík hydroxylovej skupiny nahradený za *tert*-butyldifenylsilyl za vzniku medziproduktu 16. Nakoniec boli odstránené chrániace skupiny pomocou redukcie s vodíkom za vzniku organokatalyzátora C3 v 30% výťažku (Obr. 3.) [8].



Obr. 3. Syntéza organokatalyzátora C3

Optimalizácia reakčných podmienok bola uskutočnená s benzilydén acetónom (1a), 4-nitrobenzaldehydom (2) a Meldrumovou kyselinou (3) s využitím organokatalyzátorov C1-C10 a niekoľkých organických rozpúšťadiel (Obr. 4.).



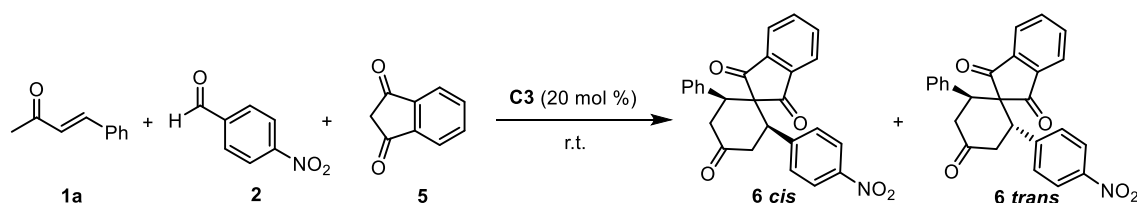
Obr. 4. Knoevenagelova/Dielsova-Alderova reakcia s rôznymi katalyzátormi a ketónmi

Skvaramidové organokatalyzátory C1 a C2 sa ukázali ako nevhodné pre tento typ reakcie z hľadiska výťažkov aj enantioselektív (Tab. 1.). Ako najúčinnější organické rozpúšťadlo pre túto reakciu sa ukázal byť tetrahydrofurán. S organokatalyzátormi C5-C9 boli síce dosiahnuté najlepšie výťažky avšak najvyššie enantioméne čistoty produktov boli získané s organokatalyzátormi C3 a C4. Príprava enantioméne obohatených produktov je našou prioritou, preto sme sa rozhodli v štúdií reakcie pokračovať s týmito organokatalyzátormi. Ďalej sme sa zamerali na štúdium predmetnej Knoevenagelovej/Dielsovej-Alderovej reakcie vo vodnom prostredí a v guľovom mlyne ako aj v organickom prostredí avšak s inými ketónmi. Zistili sme, že reakciu je možné efektívne uskutočniť aj vo vodnom prostredí s porovnateľnými výťažkami a enantioselektivitami. Prídavok kyslých alebo bázičných aditív nemal výraznejší vplyv na reakciu vo vode ani v guľovom mlyne. Z výsledkov je taktiež zrejmé, že využitie mechanického mletia v guľovom mlyne je efektívny spôsob prevedenia reakcie nakoľko za oveľa kratší čas ako je potrebný v organickom rozpúšťadle alebo vodnom prostredí je možné dosiahnuť porovnateľné výsledky. Zvýšenie reakčného času na 7 dní v prípade vodného prostredia a na 8 hodín v prípade guľového mlynu nemalo za následok výraznejšie zvýšenie výťažkov ani enantioselektív. Reakcia s rôznymi ketónmi sa preukázala byť veľmi efektívna obzvlášť s ketónom obsahujúcim naftylový zvyšok 1b bol dosiahnutý pomerne dobrý výťažok (68%) a vysoká miera enantioménej čistoty produktu (79% *ee*).

Tab. 1. Skríning reakcie v guľovom mlyne, vodnom a organickom prostredí

	R ¹	katalyzátor	aditívum	reakčné podmienky	t (h)	4 (%)	ee (%)
1	Ph	C1	-	THF	48	23	rac.
2	Ph	C1	-	DCM	168	13	rac.
3	Ph	C1	-	DMSO	48	14	rac.
4	Ph	C2	-	THF	48	19	rac.
5	Ph	C3	-	THF	48	31	21
6	Ph	C4	-	THF	48	47	26
7	Ph	C5	-	THF	48	45	7
8	Ph	C6	-	THF	48	40	11
9	Ph	C7	-	THF	48	35	5
10	Ph	C8	-	THF	48	58	16
11	Ph	C9	-	THF	48	63	5
12	Ph	C10	-	THF	48	-	-
13	Ph	C3	-	H ₂ O	48	64	18
14	Ph	C3	NaHCO ₃	H ₂ O	48	21	26
15	Ph	C3	<i>p</i> Cl-C ₆ H ₄ CO ₂ H	H ₂ O	48	25	29
16	Ph	C4	-	H ₂ O	48	26	41
17	Ph	C4	NaHCO ₃	H ₂ O	48	26	23
18	Ph	C4	<i>p</i> Cl-C ₆ H ₄ CO ₂ H	H ₂ O	48	34	26
19	Ph	C4	NaHCO ₃	H ₂ O	168	55	14
20	Ph	C4	<i>p</i> Cl-C ₆ H ₄ CO ₂ H	H ₂ O	168	35	24
21	Ph	C3	-	guľový mlyn (20 Hz)	3	29	18
22	Ph	C3	NaHCO ₃	guľový mlyn (20 Hz)	3	18	32
23	Ph	C3	<i>p</i> Cl-C ₆ H ₄ CO ₂ H	guľový mlyn (20 Hz)	3	29	27
24	Ph	C4	-	guľový mlyn (20 Hz)	8	23	31
25	Ph	C4	NaHCO ₃	guľový mlyn (20 Hz)	3	24	28
26	Ph	C4	<i>p</i> Cl-C ₆ H ₄ CO ₂ H	guľový mlyn (20 Hz)	3	28	26
27	1-naftyl	D,L-prolín	-	THF	48	60	rac.
28	1-naftyl	C3	-	THF	48	68	79
29	2-tiofenyl	D,L-prolín	-	THF	48	67	rac.
30	2-tiofenyl	C3	-	THF	48	36	47

V rámci substrátového skríningu sme vymenili kyselinu meldrumovú (3) za 1,3-indandión (5). S katalyzátorom C3 sme produkt 6 získali ako zmes *cis* a *trans* izomérov (Obr. 5.).



Obr. 5. Knoevenagelova/Dielsova-Alderova reakcia s 1,3-indaniómom (5)

V THF sme získali produkt 6, v ktorom významne prevládal *cis* izomér v recemickej forme (Tab. 2.). Zaujímavé a veľmi podobné výsledky z hľadiska pomeru izomérov boli získané vo vodnom prostredí a mletím v guľovom mlyne. Vo vode vznikol produkt 6 s pomerom *cis* a *trans* izomérov 1:1, pričom bola dosiahnutá vynikajúca enantiomérna čistota

trans izoméru (>99 % *ee*). V guľovom mlyne bol pomer *cis* a *trans* mierne v prospech *trans* izoméru (0,8:1), ktorý mal opäť veľmi dobrú enantioselektivitu (85 % *ee*).

Tab. 2. Skríning reakcie v 1,3 indandóme (5)

	pomer <i>cis:trans</i>	reakčné podmienky	t(h)	6 <i>cis+trans</i> (%)	<i>ee</i> 6 <i>cis</i> (%)	<i>ee</i> 6 <i>trans</i> (%)
1	1:0,15	THF	72	37	rac	-
2	1:1	H ₂ O	72	41	17	>99
3	0,8:1	guľový mlyn	3	15	31	85

Záver

Boli syntetizované organokatalyzátory C1, C2, C3 a východiskové enóny 1b, 1c. Organokatalyzátory obsahujúce pyrrolidínovú jednotku C1-C9 boli úspešne použité na katalýzu domino Knoevenagelovej/Dielsovej-Alderovej reakcie. Reakcia bola otestovaná s rôznymi substrátmi v rôznych organických rozpúšťadlách, vo vodnom prostredí alebo uskutočnená pomocou mechanického mletia v guľovom mlyne a produkty 4 a 6 boli získané v 13-68% výťažkoch s enantiomérnymi čistotami pohybujúcimi sa v rozmedzí 5->99%.

PodĎakovanie

Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-18-0242.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Kreuder A. D., House-Knight T., Whitford J. et al. (2017) ACS Sustainable Chem. Eng. 5, p. 2927
- [2] Hiesinger K., Dar'in D., Proschak E. et al. (2021) J. Med. Chem. 64, p. 150
- [3] Ramachary D. B., Chowdari N. S., Barbas, C. F. III (2003) Angew.Chem. Int. Ed. 42, p. 4233
- [4] Ramachary, D. B., Chowdari, N. S., Anebouselvy, K. et al. (2004) J. Org. Chem. 69, p. 5838
- [5] Dahlin H., Bogevig A., Adolfsson H. (2004) Adv. Synth. Catal. 346, p. 1101
- [6] Albrecht L., Dickmeiss G., Acosta F.C. et al. (2012) J. Am. Chem. Soc. 134, p. 2543
- [7] Zhang D., Yuan Ch. (2008) Tetrahedron 64, p. 2480
- [8] Itagaki N., Kimura M., Iwabuchi Y. (2005) Org. Lett. 7, p. 4185

Vývoj vysoko účinných a selektívnych ALR2 inhibítorov a ich disulfidových dimérov určených na ovplyvnenie komplikácií diabetu a rastu tumorov

Terézia Teplanová,¹ Ambroz Almássy,¹ Gabriela Addová,¹ Milan Štefek,² Andrej Boháč¹,
Lucia Kováčiková^{1,2}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie,
Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
teplanova16@uniba.sk

²Ústav experimentálnej farmakológie a toxikológie Slovenskej akadémie vied, v. v. i.,
Oddelenie biochémie a farmakológie, Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava, Slovenská
republika

Abstract

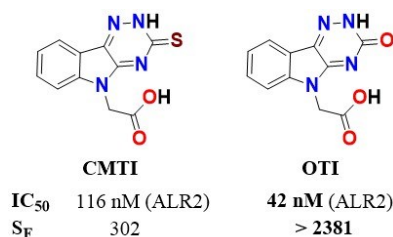
Development of highly potent and selective ALR2 inhibitors and their disulfide dimers designed to influence complications of diabetes mellitus and tumour growth

Inhibition of aldose reductase (AR, ALR2), the first enzyme of the polyol pathway, is a promising approach in treatment of diabetic complications and of tumour growth. We carried out optimization of our AR inhibitors possessing thioxo- (CMTIs) and oxotriazinoindole (OTIs) leading scaffolds by fluorine substituents on aromatic ring. A series of *in silico* predicted (8-F)CMTI, (8-F)OTI, (7-F)CMTI, (7-F)OTI and two disulfide dimers pro-drugs were synthesized and screened. Obtained fluorinated derivatives are turned out to be excellent ALR2 inhibitors with IC₅₀ values in a nanomolar range. Moreover (8-F)OTI represents one of the most powerful AR inhibitors with the highest known selectivity in relation to the detoxification aldehyde reductase (ALR1). Prepared derivatives were tested to study and optimize pharmacokinetic properties of passive gastrointestinal absorption and metabolism in University of Beograd, Serbia. All developed compounds are dedicating to determine their anticancer properties on 60 hu-tumour cell lines in NCI, USA.

Keywords: aldose reductase; ALR2 inhibitors; selectivity; diabetic complications; cancer

Úvod a formulácia cieľa

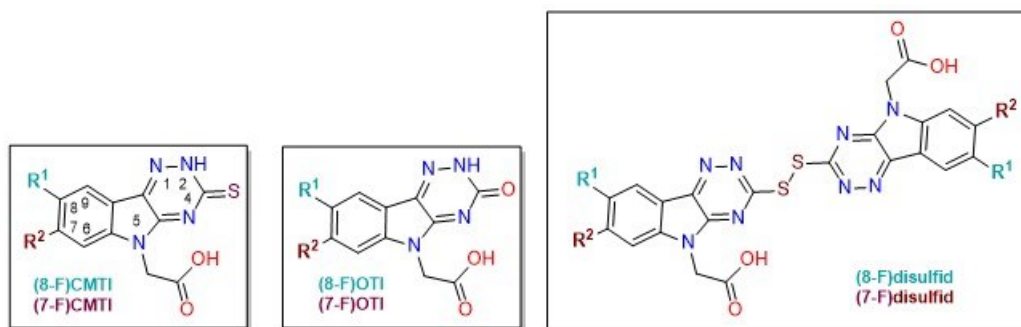
Pri hľadaní nových derivátov inhibítorov aldózareduktázy (ALR2) naša výskumná skupina vychádzala z tioxotriazinoindolu cementirestatu (CMTI, kyselina 2-(3-tioxo-2,3-dihydro-5*H*-[1,2,4]triazino[5,6-*b*]indol-5-yl)octová), ktorý bol navrhnutý ako sľubná nosná štruktúra s vynikajúcou inhibičnou aktivitou voči ALR2, dobrou selektivitou a antioxidačnou aktivitou [1-4]. V následnej štúdii sme (bio)izostérnou zámenou cementirestatu pripravili oxotriazinoindol (OTI, kyselina 2-(3-oxo-2,3-dihydro-5*H*-[1,2,4]triazino[5,6-*b*]indol-5-yl)octová), ktorý bol ešte účinnejší inhibítor voči ALR2 ako samotný CMTI a navyše mal výrazne zvýšenú selektivitu (obr. 1) [5].



Obr. 1. Cemtirestat (CMTI) a jeho (bio)isostény *O*-analog OTI s uvedenými hodnotami inhibičnej aktivity a faktoru selektivity ($S_F = IC_{50}(ALR1)/IC_{50}(ALR2)$)

Nedávno sme *N*(2)-benzylový derivát OTI použili ako východiskový skelet na štúdium série substituovaných derivátov obsahujúcich rôzne funkčné skupiny v *orto* polohe na benzylovej skupine. Cieľom bolo využiť ďalšie interakcie v neobsadenom vrecku ALR2 obklopenom Trp219, Ala299 a Leu301 (pozri komplex PDB: 4QX4). Derivát obsahujúci planárnu a najmenej solvatovanú funkčnú skupinu -CN v *orto* polohe benzylového kruhu bol nájdený ako najúčinnnejší inhibítor ALR2 z tejto série [6]. V ďalšej štúdii sme syntetizovali sériu alifatických, kyslík obsahujúcich *N*(2)-substituovaných oxotriazínoindolov s cieľom ďalej skúmať potenciálne interakcie vo vyššie spomínanom vrecku ALR2. Dosiahli sme približne dvojnásobne zvýšenú inhibičnú účinnosť najúčinnnejšieho derivátu 14 (*N*(2)-CH₂CH₂COOH) v porovnaní s nesubstituovaným OTI, pritom však došlo k výraznému zhoršeniu selektivity voči detoxifikačnému enzýmu ALR1. Na vysvetlenie potenciálnych interakcií zodpovedných za inhibičnú účinnosť a selektivitu sme použili prístupy *in silico* molekulového modelovania [7].

V tejto práci sme sa zamerali na syntézu tioxo- a oxotriazínoindolov s možnosťou substitúcie na aromatickom jadre indolového skeletu. Zvolili sme si substitúciu fluórom, ktorý má dôležitú úlohu v medicínskej chémii, napr. pri zlepšení metabolickej stability, či zmene fyzikálno-chemických vlastností, ako aj zvyšovaním lipofility, alebo zvyšovaním väzbovej afinity pomocou fluórových, či iných interakcií [8,9].



Obr. 2. Návrh derivátov (7-F)- a (8-F)CMTI/OTI a ich disulfidov

Pripravené deriváty boli testované, aj kvôli optimalizáciu farmakokinetických vlastností OTI a CMTI derivátov, stanovením ich pasívnej gastrointestinálnej absorpcie v rámci medzinárodnej spolupráce s Farmaceutickou fakultou Univerzity v Belehrade v Srbsku.

NF- κ B transkribuje veľké množstvo zápalových cytokínov, rastových faktorov (GF) a chemokínov, ktoré sú zodpovedné za zápalovú odpoveď. Zistilo sa, že inhibícia AR zabráňuje tvorbe takto indukovaných cytotoxických signálov a expresii zápalových markerov [10]. To naznačuje, že inhibícia AR by mohla byť protizápalová. Zápalové ochorenia čriev sú do veľkej miery zodpovedné za karcinogézu hrubého čreva. Ukázalo sa, že inhibícia AR zabráňuje rastu rakovinových buniek hrubého čreva. [11] Preto nami navrhnuté a pripravené deriváty plánujeme testovať na 60 typoch ľudských tumorových bunkových líniiach v NCI v USA.

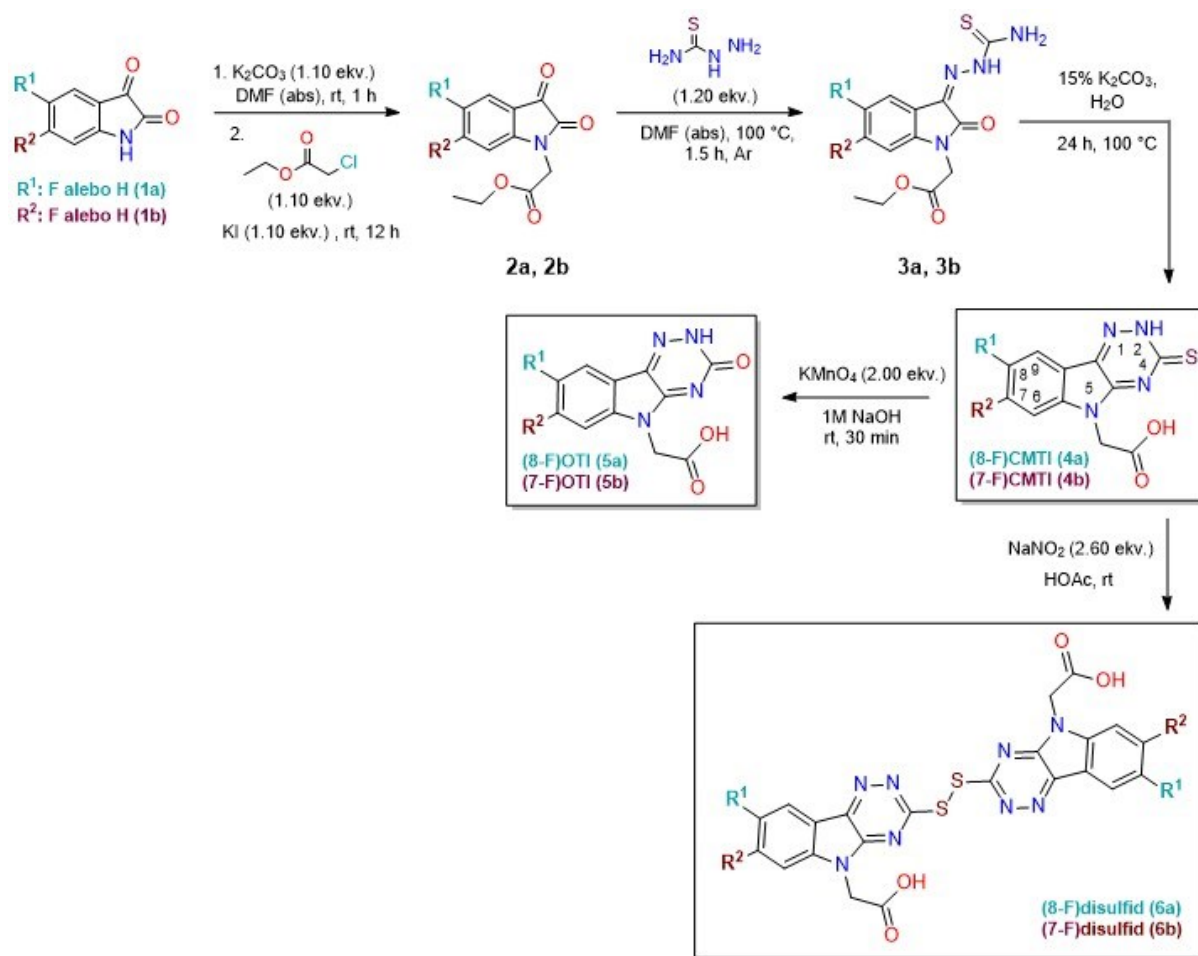
Materiál a metódy

Syntéza predpovedaných ALR2 inhibítorov (F)-CMTI/OTI sa uskutočnila z komerčných (F)-izatínov (1a, 1b), etyl-chlóracetátu a tiosemikarbazidu za vzniku esteru (F)-tiosemikarbazónu (3a, 3b), ktorý následnou cyklizáciou poskytol (F)-tioxotriazínindol. Hydrolyza esterovej skupiny prebiehala súčasne počas cyklizácie uskutočnenej v bázičných podmienkach. Oxidáciou síry v pripravenom (F)-CMTI (4a, 4b) a jej substitúciou za kyslík v bázičkom prostredí sme získali požadované deriváty (F)-OTI (5a, 5b). Disulfidové deriváty (6a, 6b) boli pripravené oxidáciou z (F)-CMTI (4a, 4b) v ľadovej kyseline octovej s NaNO_2 .

Enzým ALR2 bol izolovaný z očných šošoviek a ALR1 z obličiek potkanov. Inhibičné aktivity testovaných zlúčenín boli merané spektrofotometricky stanovením spotreby NADPH pri vlnovej dĺžke 340 nm.

Výsledky a diskusia

Všetky synteticky pripravené a biologicky testované deriváty mali čistotu vyššiu ako 95 % (HPLC). Ich štruktúra bola potvrdená pomocou ^1H , ^{13}C -NMR, IČ spektier, teploty topenia ako aj elementovej analýzy alebo HRMS. Syntéza derivátov je znázornená na Obr. 3.



Obr. 3. Schéma syntézy derivátov (7-F)- a (8-F)-CMTI/OTI a ich disulfidov

V tejto práci sme pripravili štyri fluórované deriváty CMTI a OTI, pričom všetky tieto látky mali, voči ich nosným zlúčeninám, vylepšené ALR2 inhibičné aktivity. Z Tab.1 vyplýva, že inhibičná ALR2 aktivita najúčinnnejšieho derivátu (8-F)OTI bola skoro 3-násobne lepšia ($IC_{50} = 15$ nM) v porovnaní s nesubstituovaným OTI inhibítorom (42 nM). Porovnateľné hodnoty sme získali aj pre (7-F)OTI. Zavedenie fluóru do molekuly CMTI sa viac prejavilo v polohe 7, kedy sme získali viac ako 3-násobne účinnejší inhibítor (7-F)CMTI (32 nM) oproti nesubstituovanému CMTI (116 nM). Takisto sme zistili 3-násobné zvýšenie selektivity 8-fluórovaných CMTI a OTI derivátov voči ALR1 oproti ich nesubstituovaným inhibítorom. Vyvinutý derivát (8-F)OTI má výborné vlastnosti a patrí medzi naše najúčinnnejšie ALR2 inhibítory ($IC_{50} = 15$ nM) s dosiaľ najvyššou nami stanovenou selektivitou ($S_F > 6667$). Pripravené dva dimérne disulfidické fluorované deriváty neboli testované priamo na ALR2, nakoľko tieto sú inhibične aktívne až po ich redukcii napr. pomocou GSH (glutatión).

Tab. 1. Inhibičné aktivity testovaných derivátov voči enzýmom ALR2 a ALR1 s hodnotami S_F

^a Výsledky sú uvedené ako priemerné hodnoty z dvoch meraní alebo priemerné hodnoty $\pm$ SD z najmenej troch meraní.

	ALR2 IC_{50} (nM) ^a	ALR1 IC_{50} (μM) ^a	S_F $IC_{50}(ALR1)/IC_{50}(ALR2)$
(8-F)CMTI	95 $\pm$ 6	82 $\pm$ 2	863
(8-F)OTI	15 $\pm$ 2	> 100	> 6 667
(7-F)CMTI	32 $\pm$ 2	23 $\pm$ 1	719
(7-F)OTI	19 $\pm$ 1	40 $\pm$ 2	2 105
CMTI	116 $\pm$ 8	35 $\pm$ 2	302
OTI	42 $\pm$ 1	> 100	> 2 381

Všetky vyššie spomínané fluorované deriváty CMTI, OTI, ako aj disulfidické dimérne zlúčeniny budú testované na 60 typoch ľudských tumorových bunkových líniiach v NCI v USA a zisťovať sa bude ich kancerostatická a kancerotoxická aktivita.

Záver

Modifikáciou štruktúry CMTI a OTI zavedením fluóru do polohy 7 a 8 aromatického jadra molekuly sme získali nové analógy, napr. (8-F)OTI so zvýšenou inhibičnou aktivitou voči enzýmu ALR2 a výrazne vylepšenou selektivitou voči ALR1. Všetky tu vyvinuté zlúčeniny budú slúžiť aj pri experimentálnom skúmaní ich farmakokinetických vlastností a účinku nielen pri ovplyvnení komplikácií diabetu, ale aj na zastavenie rastu tumorov. Zlúčeniny s polyvalentným terapeutickým účinkom (zasahujúcim naraz viacero mechanizmov a patológií) a vlastnosťami liečiv (drug properties) sú veľmi žiadané na trhu s liečivami.

PodĎakovanie

Táto práca bola financovaná projektami VEGA 2/0008/22, APVV SK-SRB-21-0047 (451-03-43/2022-09/02/2), pomocou Operačného programu integrovanej infraštruktúry pre projekt, ITMS2014+: 313021X329 a ITMS2014+: 313021BUZ3 spolufinancovaná prostredníctvom Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Stefek M., Prnova M. S., Majekova M., et al. (2015) J. Med. Chem. 58(6), p. 2649
- [2] Stefek M., Milackova I., Diez-Dacal B., et al. (2015) Use of 5-carboxymethyl-3-mercapto-1,2,4-triazino-[5,6-b]indoles and their pharmaceutical composition,

- [3] Prnova M. S., Ballekova J., Majekova M., et al. (2015) Redox Rep. 20(6), p. 282
- [4] Prnova M. S., Medina-Campos O., Pedraza-Chaverri J., et al. (2020) Neuroscience 443, p. 206
- [5] Hlaváč M., Kováčiková L., Prnová M. Š., et al. (2020) J. Med. Chem. 63(1), p. 369
- [6] Hlaváč M., Kováčiková L., Prnová M. Š., et al. (2021) Bioorg. Med. Chem. 29, 115885
- [7] Kováčiková L., Almášiová K., Almassy A., et al. (2023) Eur. J. Med. Chem. *odoslané do tlače*
- [8] Oyima I., (2009) Fluorine in Medical Chemistry and Chemical Biology. Wiley-Blackwell, United Kingdom, p. 4
- [9] Böhm H. J., Banner D., Bendels S., et al. (2004) Chembiochem 5(5), p. 637
- [10] Ramana K. V., Srivastava S. K., (2010) Int. J. Biochem. Cell Biol. 42(1), p. 17
- [11] Tammali R., Srivastava S. K., Ramana K. V., (2011) Curr. Cancer Drug Targets 11(5), p. 560

Novel synthesis approach for the preparation of chalcogenide perovskites

Sameer K. Tiwari,¹ Roman Bystrický,^{1,2} Peter Hutár,^{1,3} Milan Sýkora¹

¹*Comenius University, Faculty of Natural Sciences, Laboratory for Advanced Materials
Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak republic; tiwari1@uniba.sk*

²*Institute of Inorganic Chemistry of Slovak Academy of Sciences, v. v. i., Dúbravská cesta 9,
845 36 Bratislava, Slovak republic;*

³*Institute of Electrical Engineering of Slovak Academy of Sciences, v. v. i., Dúbravská cesta
9, 841 04 Bratislava, Slovak republic*

Abstract

Chalcogenide perovskites (CPs) with general composition ABX_3 where A and B are metals cations and X = S, Se are a new class of materials predicted to have similar or better photovoltaic application then of halide perovskites. The photovoltaic applications of these materials are limited due to the less favorable synthesis approach previously used. Here, we present a new synthesis approach for the synthesis of crystalline and pure CPs with reduced reaction times. This new approach uses precursors chemically stable and less hazardous reaction conditions. Several CPs $BaZrS_3$, $SrHfS_3$, $BaHfS_3$, β - $SrZrS_3$ were synthesized demonstrating the generality of the new synthesis approach.

Keywords: Chalcogenide perovskite; solid state synthesis; photovoltaic; solar cell;

Introduction and Objectives

Lead based Organic-inorganic hybrid perovskites (OIHPs) have attracted significant interests in recent years primarily due to their extraordinary performance as active components of solar cells, rapidly reaching and even exceeding the performance of much more mature silicon technologies [1, 2]. Although OIHPs have excellent photophysical properties and impressive performance in devices, they suffer from poor ambient stability, rapidly degrading in the presence of oxygen, humidity, or high temperature [3]. Although, introduction of inorganic cations, such as formamidium or inorganic cation, into their structure, has somewhat improved the environmental stability, it has also introduced phase instability. Therefore, there is a great deal of interest in identifying alternative chemically and thermally stable materials with optical and electrical properties similar to the OIHPs. Several categories of materials have been suggested as promising alternatives, including halide perovskite with Sn^{2+} and Ge^{2+} [4], halide double-perovskites ($A_2B'B''X_6$) [5], vacancy ordered perovskites (A_2BX_6) [6] and chalcogenide perovskites (ABX_3 , where A, B are cations and X = S, Se, Te) [7, 8]. These chalcogenide perovskites (CPs) offer number of important advantages, as they can be prepared from non-toxic and abundant elements. Many recent computational studies suggest that CPs

are likely to have similar or even more appealing electronic properties for application in photovoltaics (PV) than OIHPs.

CPs are structurally related to previously extensively studied oxide perovskites with general formula ABO_3 . While these materials are known for their good thermal and chemical stability and methods for preparation of oxide PSs are available in literature, these materials are not suitable for application in PV because of their large bandgaps, typically extending to UV portion of the solar spectrum [9]. The larger energy differences between the transition metal d-orbital conduction band and O2p orbital valence band typically leads for larger bandgaps. By replacing oxygen from ABO_3 with S, Se we can move the valence band composed of mainly chalcogen (S, Se) 3p or 4p orbital higher and decrease the bandgap to visible-NIR range. CPs are predicted to retain many of the chemical properties of oxides, but at the same time have narrower electronic bandgap suitable for application in PVs and possess many appealing properties of OIHPs.

The methods used for the preparation of CPs typically involve high temperature processing (Fig. 1). Majority of CPs were synthesized by conventional solid-state reaction process, where elemental or binary precursors like $AS + BS_2$ were vacuum sealed in quartz tube and heated at around 1000 °C for many hours or days (Fig. 1a).

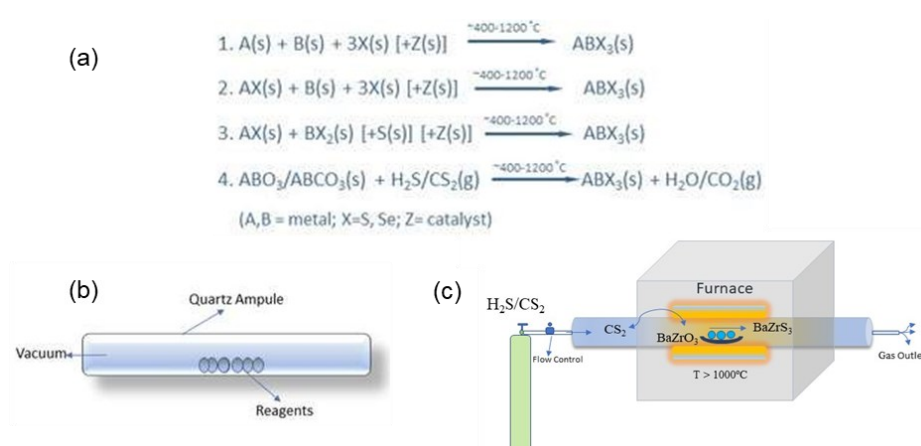


Fig. 1. (a) Methods used in preparation of chalcogenide PSs described in literature; (b) generalized synthesis apparatus used in synthesis methods 1, 2 and 3 shown in (a); (c) scheme of the apparatus typically used in sulfurization process, method 4 shown in (a).

By this process, distorted perovskites ($BaZrS_3$ [10], $BaHfS_3$ [11], $SrHfS_3$ [11]) and non-perovskite materials ($PbHfS_3$ [12], $PbNbS_3$ [13]) were synthesized. As a byproduct, this method sometimes yields unwanted binary sulfides, or oxides i.e., as described in literature which does not provide high reliability in the formation of CPs and requires some optimization of the

synthesis process. Another reported method is the solid-state synthesis of ternary oxide followed by its sulfurization using H_2S or CS_2 (Fig. 1c) [8]. The sulfurization using $\text{CS}_2/\text{H}_2\text{S}$ requires the use of careful safety measures due to its high flammability and toxicity.

In this work we developed a new synthesis approach for the synthesis of CPs that addresses the limitations of the above methods. We also studied the synthesis from this approach at moderate temperature.

Materials and methods

The starting materials were BaZrO_3 (99 %, Alfa Aesar), SrZrO_3 (99.3 %, Alfa Aesar), Eu_2O_3 (99.99 %, Alfa Aesar), ZrO_2 (Pure, Soviet Union), B (98 %, Alfa Aesar), S (99.98 %, Sigma Aldrich). BaHfO_3 and SrHfO_3 precursors were synthesized by mixing of BaCO_3 , SrCO_3 with HfO_2 respectively and annealing it for 16 h at 1100 °C.

In the typical reaction, the starting oxide precursor were grounded with stoichiometric ratio of boron (10 mol%) and sulfide in an agate mortar for 10-15 minutes. Well ground powder was transferred to a 15 mm i.d. quartz tube. The quartz tube was connected to Schlenk line and evacuated at $\sim 10^{-2}$ mbar for 30 min and then flame sealed by a propane torch. The sealed tube was then transferred to the furnace and was heated at 400-1000 °C with (intermediate holding for 5hr at 300 and 600°C). Purification of all synthesized samples were done by sonicating the powders in 20 ml HPLC grade methanol and vacuum filtering by Buchner funnel to wash the byproduct B_2O_3 .

The product was characterized by X-ray diffraction (XRD) (Panalytical Empyren, Netherlands, Cu $K\alpha$ radiation). Rietveld analysis for quantitative analysis and lattice parameters determination was done using HighScore plus on scans with 2θ ranging from 15° to 70° with a step of 0.026°. Scanning electron microscopy (SEM) images were obtained on cold-pressed pellets using dual-beam scanning electron microscope combined with a high current focused ion beam (FIB) -FEI Quanta 3D 200i. SEM images of the surface morphology of the pellets were recorded at a magnification of 4000x.

Results and discussion

The as-synthesized materials BaZrS_3 , $\beta\text{-SrZrS}_3$, BaHfS_3 , SrHfS_3 were characterized by X-ray diffraction (Fig. 2a). The results show that all materials contain pure single phase of GdFeO_3 type structure validating the formation of CP's. The product lattice parameters were in good agreement with the literature values, indicating the formation of pure phases. The shape of the diffraction peaks and flat background indicate good crystallinity of the products. The

high temperature synthesis also prompts us to study the conversion at moderate temperature ($T = 500\text{--}600\text{ }^{\circ}\text{C}$) as this range is important for technological standpoint. The Rietveld analysis of X-ray diffraction (XRD) patterns of moderate temperature recreation shows that at $500\text{ }^{\circ}\text{C}$, the conversion to BaZrS_3 was completed to about 48.5% after 48 h and increased to about 63.8% after 168 h. The remaining components of the product mixture were BaZrO_3 and ZrS_3 . At $600\text{ }^{\circ}\text{C}$, the product consisted of about 97% BaZrS_3 after 5h and reduced to about 92% after 10 h. In both cases, the remaining mixture of products was ZrO_2 . To achieve complete conversion, samples heated at $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 h were subsequently exposed to temperatures ranging from 650 to $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$, and complete conversion was found to be achieved at $900\text{ }^{\circ}\text{C}$ or higher. Interestingly, full conversion was also achieved by simply increasing the temperature to $900\text{ }^{\circ}\text{C}$ at a rate of $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, without any preheating at lower temperatures. Remarkably, this reaction, including the cooling process, was completed in less than six hours. SEM analysis (Fig. 2b) was done to study the change in grain size before and after sulfurization, where grain growth was clearly seen due to high temperature annealing.

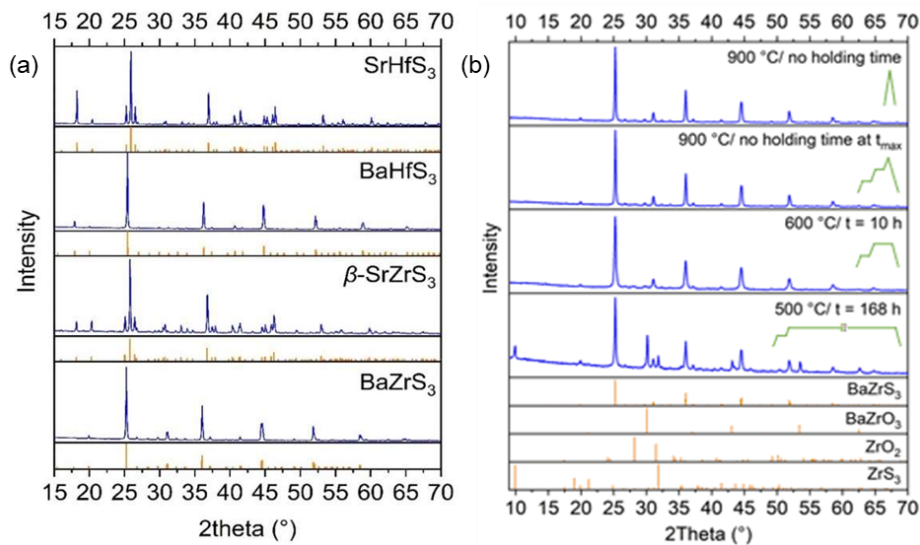
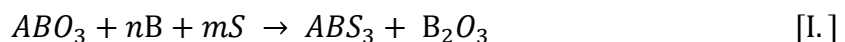


Fig. 2. (a) Powder x-ray diffraction patterns (blue traces) of the CPs prepared from the corresponding ABO_3 oxides and the reference literature patterns (orange traces) of the CPs obtained from the ICDD database, (b) sulfurization at moderate temperature.



In a typical reaction [I.], the italicized symbols A and B represent metal cations ($A = \text{Ba}^{2+}$ and Sr^{2+} and $B = \text{Zr}^{4+}$ and Hf^{4+}), and the nonitalic letter B represents boron.

The reaction gives pure phases because of high effectivity of gaseous boron sulfides as sulfurizing agents for oxides is, in part due to a large difference in the thermodynamic stability of the byproduct B_2O_3 ($\Delta G_f^{298} = -1192.3$ kJ/mol) then B_2S_3 ($\Delta G_f^{298} = -247.6$ kJ/mol) and BS_2 ($\Delta G_f^{298} = -120$ kJ/mol). Thus, boron sulfides serve not only as a source of sulfur but also as an effective “oxygen” trap [14].

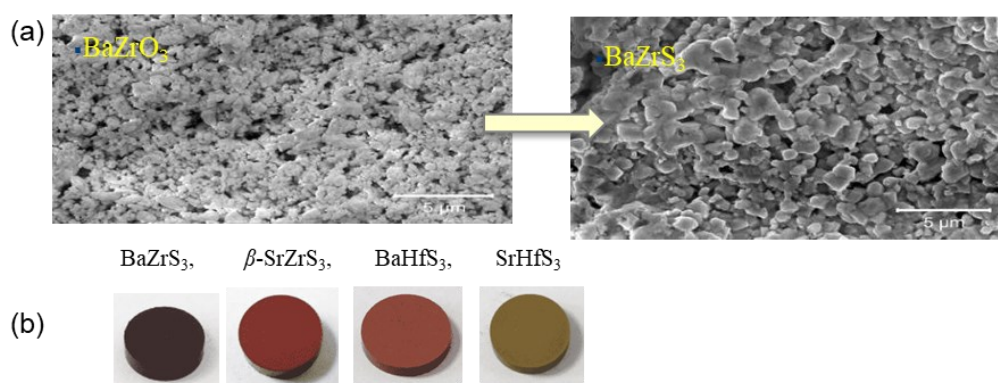


Fig. 3. (a) Morphology analysis by SEM before and after sulfurization (b) picture of pellets prepared from the product powders

Conclusions

In summary, we presented a new method for the preparation of CPs, based on the sulfurization of ternary oxides with boron sulfides in closed ampules. By this method we prepared $BaZrS_3$, $SrHfS_3$, $BaHfS_3$, β - $SrZrS_3$ in pure phase form. This method offers high conversion rates using chemically stable starting materials. It also shows the generality for the synthesis of chalcogenide perovskites and improved safety comparing the previously reported methods. We also investigated the reaction at shorter time and moderate temperature resulting partial conversion at 500 °C and near pure (95%) conversion of $BaZrO_3$ to $BaZrS_3$ at 600 °C.

Acknowledgements

This work was supported by the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement no. 810701 and by the Slovak Research and Development Agency under grant agreement no. APVV-19-0410 and Slovak Ministry of Education under grant agreement No. 1/0892/21. S.K.T. acknowledges partial support from project USCCCORD (ŽoNFP: NFP313020BUZ3), co-financed by the European Regional Development Fund within the Operational Programme Integrated Infrastructure.

References

- [1] Kojima A., Teshima K., Shirai Y., et al. (2009) *J. Am. Chem. Soc.* 131(17), p. 605
- [2] Li B., Fei C., Zheng K., et al. (2016) *J. Mater. Chem. A*. 4(43), p. 17018
- [3] Berhe T. A., Su W.-N., Chen C.-H., et al. (2016) *Energy Environ. Sci.* 9(2), p. 323
- [4] Nasti G., Abate A. (2020) *Adv. Energy Mater.* 10(13), p. 1902467
- [5] Kung P.-K., Li M.-H., Lin, P.-Y., et al. (2020) *Sol. RRL*. 4(2), p. 1900306
- [6] Maughan A. E., Ganose A. M., Scanlon D. O., et al. (2019) *Chem. Mater.* 31(4), p. 1184
- [7] Pecunia V., Occhipinti L. G., Chakraborty A., et al. (2020) *APL Mater.* 8(10), p. 100901
- [8] Perera S., Hui H., Zhao, C., et al. (2016) *Nano Energy*. 22(2), p. 129
- [9] Kuhar K., Crovetto A., Pandey, M., et al. (2017) *Energy Environ. Sci.* 10(12), p. 2579
- [10] Nishigaki Y., Nagai T., Nishiwaki, M., et al. (2020) *Sol. RRL*. 4(5), p. 1900555
- [11] Hanzawa K., Iimura S., Hiramatsu H., et al. (2019) *J. Am. Chem. Soc.* 141(13), p. 5343
- [12] Wiegers G. A., Meetsma A., Haange R. J., et al. (1989) *Acta Crystallogr. C*. 45(6), p. 847
- [13] Schmidt, L. (1970) *Phys. Lett. A*. 31(10), p. 551
- [14] Bystrický R., Tiwari S. K., Hutár P. et al. (2022) *Inorg. Chem.* 61(47), p. 18823

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA**



**eŠVK
PRIF UK
2023**

GEOLOGIA

**ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2023
ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV**

Deciphering the variability of authigenic $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ ratio from deltaic to offshore facies: An attempt to improve applicability of method for dating

Kishan Aherwar¹, Michal Šujan¹, Katarína Šarinová², Régis Braucher³, Arjan De Leeuw⁴, Andrej Chyba⁵, Anton Matoshko⁶, Peter Uhlík², Barbara Rózsová¹, Aster Team³

¹*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Geology and Paleontology, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak republic; aherwar1@uniba.sk*

²*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Mineralogy, Petrology and Economic Geology Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak republic*

³*Aix-Marseille University, CNRS-IRD-INRAE-Collège de France, UM 34 CEREGE, Technopôle de l' Environnement Arbois- Méditerranée, BP80, 13545 Aix-en-Provence, France*

⁴*University Grenoble Alpes, Institut des Sciences de la Terre ISTERRE, Grenoble, France*

⁵*Slovak Academy of Sciences, Institute of Chemistry, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovak republic*

⁶*Utrecht University, Faculty of Geosciences, Palaeomagnetic Laboratory 'Fort Hoofddijk', Netherlands*

Abstract

Authigenic $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ ratios in 47 samples were analyzed from Slanicul de Buzau section, Romania. 28 samples from a section of Pontian stage (Late Miocene) which marks a phase of transgression followed by regression shows a four-fold increase in authigenic $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ ratio from deltaic to offshore facies. 19 samples from Dacian stage (Early Pliocene) from two parasequences exhibit consistent authigenic $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ ratio without much variability apart from 3 outliers. In authigenic $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ dating method, initial ratio determination is of utmost importance, and its values are expected to vary for different environment such as open shelf, delta front, prodelta and offshore. The section considered in this study from the Pontian stage marks 4th order cycle of water level fluctuation, similarly the two parasequences marks high frequency of water level fluctuation and serves the purpose to decipher the change in isotopic ratio from deltaic to offshore environment. Our results implies that 4th order sequence changes affect the initial ratio, but the high frequency cycles do not seem to affect it.

Keywords: *Authigenic $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ dating; Dacian Basin; Deltaic-Offshore Facies*

Introduction and Objectives

The authigenic $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ dating method is a novel method which utilizes the decay of atmospheric cosmogenic radionuclide ^{10}Be to determine the depositional ages of the sediment. The sediment in the age range of 0.2 Ma to 14 Ma can be dated, owing to ~ 1.387 Ma half-life of ^{10}Be , some examples include [1, 2]. However, there are some factors which affects the applicability of this dating method. For example, [3] suggested a four-fold increase in authigenic $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ ratio from deltaic to offshore sediments in their study conducted offshore Chile. Another study from [4] conducted in the northern south China sea suggests higher value of $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ ratio in sea water for open ocean and deep environment as compared to their counterpart shelfal and estuarine value.

It is important to quantify how, the shift in sediment source proximity, sediment provenance and depositional process affects the applicability of this new method. So far there are no studies conducted which describes the issue of variability in authigenic $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ ratio and its effect on the method's applicability in epicontinental basins. Thus, the main aim of this study is to decipher the changes in the authigenic $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ ratio from deltaic to offshore facies.

The Slanicul de Buzau section from Dacian Basin, Romania serves as a suitable study area to decipher the variability in authigenic $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ ratio, as it was dated by magnetostratigraphy [5, 6]. In the Late Miocene, as described in [6] the Dacian Basin experienced several water level fluctuations resulting in episodes of regression and transgression and deposition of deltaic to offshore facies. During the Mid-Pliocene age, the succession marks deltaic progradation because of water level fall and transgression [5]. Numerous few meters thin regressive parasequences were formed due to frequent autogenic delta lobe switching. As a result, different depositional environment ranging from offshore, distal prodelta, proximal prodelta, distributary mouth bar and delta front were deposited.

Materials and methods

We considered a predated interval from Slanicul de Buzau section Romania, which marks phase of regression followed by transgression (Fig. 1). In case of this interval from Pontian age (Late-Miocene) which represents 4th order cycle of water level fluctuation, 28 clay samples namely BB-P-001 to BB-P-025 with two samples each for BB-P-001 and BB-P-010 were collected. The palaeomagnetic age for this interval ranges from 6.1 Ma to 5.38 Ma.

In addition, 19 samples from two parasequences D (BB-D-051 to BB-D-060) & E (BB-D-062 to BB-D-070) from Dacian stage (Early Pliocene) were analyzed. The parasequences are of known ages D (~4.45 Ma) and E (~4.43 Ma) through magnetostratigraphy [5]. These two parasequences represent high frequency cycles of water level fluctuation.

Altogether 47 samples (28 from Pontian stage and 19 from Dacian stage) were analyzed for authigenic $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ isotopic ratio based on methodology described in [7]. The methodology extracts reactive authigenic phase as it primarily consists of Fe-Mn-(hydr)oxides which are the main carrier of beryllium. In case of 25 samples from Pontian stage the initial ratios in these samples were calculated as per [Eq. I.] by utilizing measured isotopic ratios in the samples and predetermined paleomagnetic ages.

$$N = N_0 \cdot e^{-\lambda t} \quad [\text{I.}]$$

Where, N is the isotopic ratio measured in the sample, N_0 is the calculated initial ratio, λ the radioactive decay constant of ^{10}Be , and t is paleomagnetic age.

Results and discussion

The measured isotopic ratio for 28 samples from Pontian stage ranges from 6.89×10^{-11} to 4.78×10^{-10} with lowest and highest value for samples BB-P-016 and BB-P-008 respectively. The isotopic ratio for sample belonging to offshore facies is generally higher than those deposited in deltaic environment (Fig. 1). The initial ratio calculated after ^{10}Be decay correction follows the same pattern as measured ratio in samples (Fig. 1, graph on right side). The calculated mean initial isotopic ratio $\sim 1.7 \times 10^{-9}$ of samples belonging to middle deltaic unit (BB-P-13 to BB-P-020) is nearly four times lower than mean initial ratio $\sim 7.1 \times 10^{-9}$ of samples belonging to lower offshore unit (BB-P-001 to BB-P-011). This four-fold increment in authigenic $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ from offshore to deltaic facies is comparable with [3]. Thus, this higher variability in the initial ratio suggests that in case of 4th order sequences it is important to take into consideration the sediment source proximity.

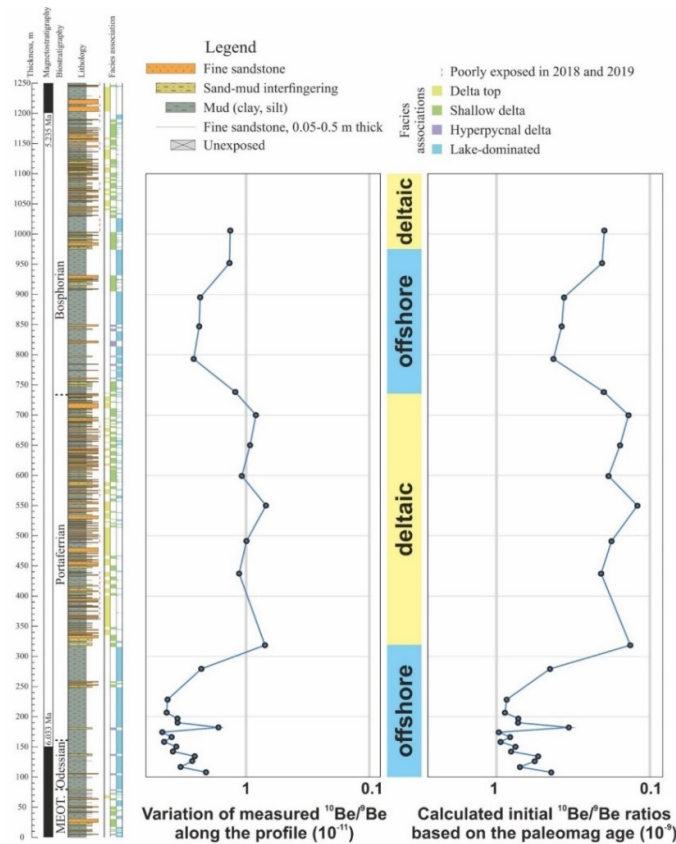


Fig. 1. Result from 28 samples (from bottom to top samples BB-P-001 to BB-P-025) –A section of Pontian stage indicating variability in measured authigenic $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ ratios in samples from different facies. (Note that the value of ratio increases from right to left), graph on the right shows calculated initial $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ ratios.

The measured isotopic ratios for parasequence D (Fig. 2) ranges from 2.21×10^{-10} for sample BB-D-059 to 2.99×10^{-10} for sample BB-D-055. Similarly, for parasequence E (Fig. 5) the values are consistent ranging from 1.72×10^{-10} for sample BB-D-062 to 2.29×10^{-10} for sample BB-D-066. The samples BB-D-052, BB-D-053 from parasequence D and sample BB-D-064 from parasequence E exhibits comparatively higher measured isotopic ratio values and appears as outliers. However, these three significant outliers appearing in lower delta front, when analyzed for smectite and carbonate content, shows comparatively higher values than other samples (Figs. 2 right, 3, 5).

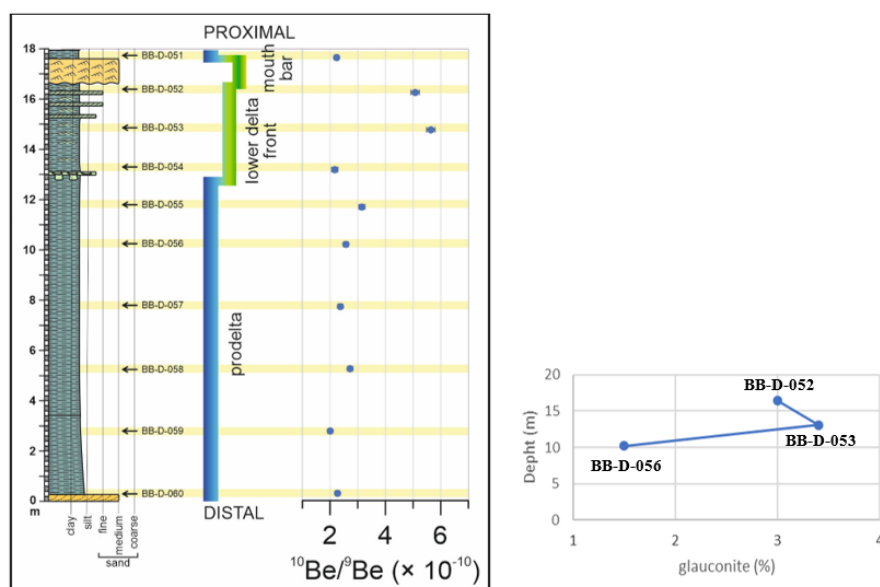


Fig. 2. Parasequence D: Sedimentological log, along with depositional environment and measured authigenic $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ ratios. Fig. on the right showing increased glauconite content for outlying samples.

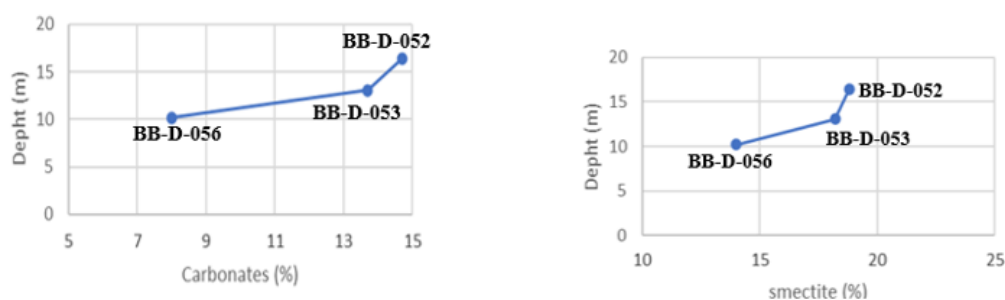


Fig. 3. Carbonate and smectite content- The outliers samples BB-D-052 and BB-D-053 showing higher wt. % as compared to BB-D-056 as a representative of the other samples.

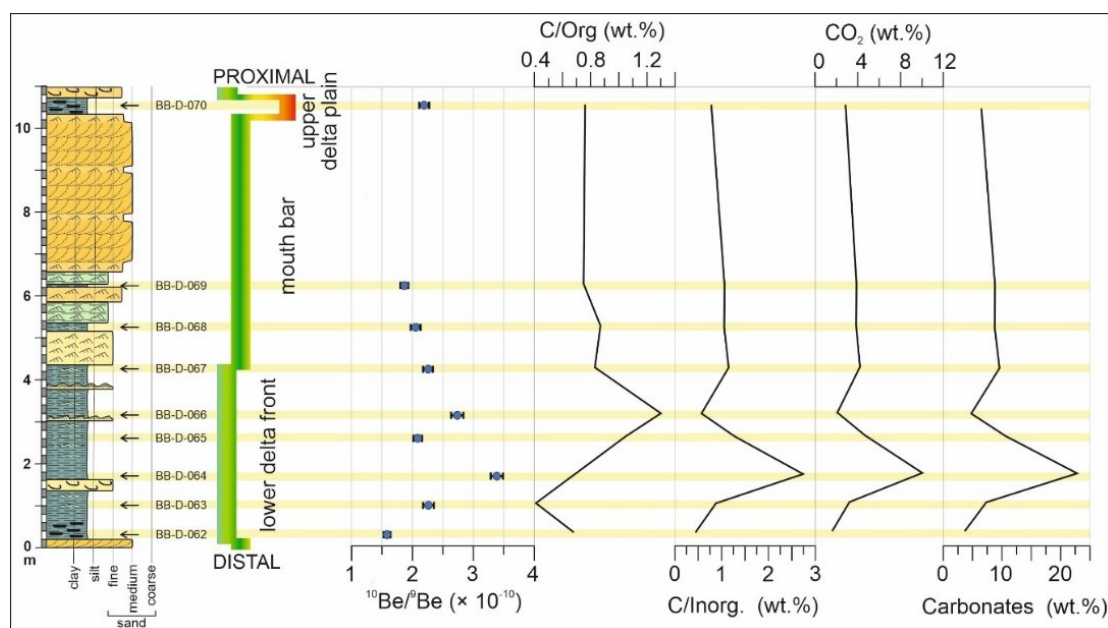


Fig . 4. Parasequence E: sedimentological log with depositional environment and measured authigenic $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ ratio in addition to other geochemical proxies.

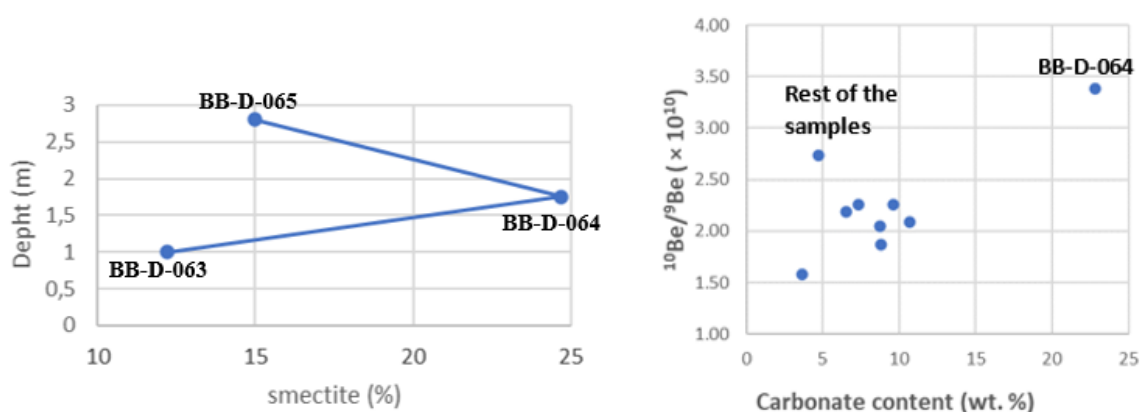


Fig. 5. Smectite and carbonate content: sample BB-D-064 from parasequence E, which appears as outlier also exhibits higher wt. % of smectite and carbonate.

It can be assumed that the samples appearing as outlier might have been deposited in low accumulation rate or during the phase of condensed deposition and the ratio might have been affected by post depositional process. The low variability of authigenic $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ ratio in these two parasequences is encouraging for the applicability of the method in parasequence scale which represents high frequency cycles of water level fluctuations.

Conclusion

The four-fold increase in the authigenic $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ ratio from middle deltaic to lower

offshore unit suggest that in case of 4th order cycle of water level fluctuation, the authigenic $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ initial ratio variability can be predicted. The highest mean value obtained for lower shelfal (offshore unit) also suggest that the sediment source proximity plays a role in variability of initial authigenic ratio.

In case of the parasequence scale or high frequency cycle of water level fluctuation the authigenic $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ ratio is not much variable and sediment source proximity or depositional process variability does not affect the ratio.

It is also necessary to take into consideration other parameters such as long-term sedimentation rate to understand the variability of the ratio better, since in this study the sedimentation rate was assumed to be constant. Once the variability of authigenic $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ ratio can be predicted or known, the method can be effectively applied more precisely to river-dominated deltas elsewhere.

Acknowledgement

This project was supported by the Slovak Research and Development Agency under contract APVV-20-0120.

References

- [1] Lebatard A. E., Bourlès D. L., Durringer P., et al. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(9), p. 3226
- [2] Šujan M., Braucher R., Kováč M., et al. (2016) *J. Glo. Pla. Cha.* 137, p. 35
- [3] Wittmann H., Von Blanckenburg F., Mohtadi M., et. (2017) *Geo. Res. Let.* 44(16), p. 8443
- [4] Kong W. Y., Zhou L. P., AsterTeam. (2021) *Geo. Res. Let.* 126, p. 7
- [5] Jorissen E. L., de Leeuw A., van Baak C. G., et al. (2018) *Sed. Geolo.* 368 p. 1
- [6] Lazarev S., De Leeuw A., Stoica M., et al. (2020) *Glob. Planet. Change* 192 p. 103224
- [7] Bourles D., Raisbeck G., Yiou F. (1989) *Geo. Cosm. Ac.* 53(2), p. 443

The effect of organics removal using cyclohexane and bleach on mineralogical and physico–chemical properties of mature fine tailings (MFT) from Alberta, Canada

Yuqing Bai, Marek Osacký, Peter Uhlík

Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Mineralogy, Petrology and Economic Geology, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak republic; bai2@uniba.sk

Abstract

Oil sands surface mining in Alberta has generated a huge amount of mature fine tailings (MFT). If left untreated, it requires hundreds of years to fully dewater and settle out. Residual organics and in particular clays have significant (negative) impact on the settling behavior of MFT. In present study, two different agents (cyclohexane and bleach) were used for removal of residual organics from MFT. The results show that removal of organics using bleach is more effective than cyclohexane. After bleaching, the amount of 0.2 – 2 μm fraction decrease in favor of <0.2 μm fraction. The partial disintegration of 0.2 – 2 μm clay aggregates indicated that organics were removed by bleach even from the clay sized particles.

Keywords: *mature fine tailings; clay minerals; mineral composition; elemental analysis*

Introduction and Objectives

About 20 % of Alberta oil sands resources and around 45 % of the bitumen production in Alberta can be accessed using surface mining techniques [1]. The extraction of bitumen from these techniques (hot or warm water processes) produces a slurry waste that is hydraulically transported and stored within surface tailings ponds. The fast-settling sand particles segregate (mostly quartz) from the slurry upon deposition at the edge of the tailing ponds while the fine fraction (mostly clay minerals) accumulates in the center of the pond and settles to become mature fine tailings (MFT) [2], a mixture of fines (<44 μm), residual organics (bitumen and solvents) and water [3]. In 2021, Alberta has already generated over one billion cubic meters of mature fine tailings (MFT) and covered approximately 220 square kilometers [4]. The large volume of MFT requiring safe containment and the vigilant management of capping waters represent a significant management challenge and liability for the industry [2]. Therefore, the investigation of MFT is essential to solve the environmental and reclamation problems faced by oil sands tailings management.

Currently, we used two most accepted reagents for organic matter removal, the cyclohexane extraction process and oxidative procedures using sodium hypochlorite. So, the present study aimed to compare the mineralogical, and physico-chemical characterization of the raw and these two pretreatments of different size fraction and especially clay fraction (<0.2

μm and $0.2 - 2 \mu\text{m}$) of MFT to better understand the effect of mineralogical and geochemical factors on MFT settling and rheological behaviors.

Materials and methods

Mature fine tailings (MFT) were stirring 10 min to make MFT homogeneous. The homogenized sample was then taken into three equal parts and labeled M1, M2 and M3. M1 did not do any treatment. M2 was washed several times with cyclohexane followed by centrifugation (3500 rpm/40 min). The supernatant containing dissolved bitumen was decanted and replaced with fresh cyclohexane. The process was repeated until the supernatant appeared clear. M3 samples were mixed with 5 % sodium hypochlorite (NaOCl) adjusted to PH 9.5 with concentrated HCl (35 %) at a ratio of 1:2.5. Then stirring for 30 min, continue stirring and heated sample to approximately 80°C . Then, centrifuge the mixture for 40 min at 3500 rpm. The supernatant was siphoned from the Teflon bottles and keep it in a beaker. Repeat the above process five times. The NaOCl-treated M3 was shaken with distilled water followed by dialysis until chloride free (electrical conductivity $<25 \mu\text{S}/\text{cm}$). Then, $>250 \mu\text{m}$, $63 - 250 \mu\text{m}$, and $40 - 63 \mu\text{m}$ size fractions of all three type samples were separated by sieving in a Dayton sieve shaker, using deionized water. The sub-sieve fraction was separated into fines ($2 - 40 \mu\text{m}$ and $<2 \mu\text{m}$) by settling, then centrifugate $<2 \mu\text{m}$ fraction for 4500 rpm/16 min to get fractions of $0.2 - 2 \mu\text{m}$ and $<0.2 \mu\text{m}$.

To better characterize mineralogical and physico-chemical properties of the raw MFT and MFT after cyclohexane and bleach bitumen removal, M1, M2 and M3 were examined by particle size distribution using laser diffraction, x-ray diffraction (XRD) analyses of oriented and random preparations, cation exchange capacity (CEC), elemental analysis (CHNS).

Results and discussion

The bulk samples were mainly composed of quartz (13.6 – 17.8 wt%) with 69.8 – 78.8 wt% of clay minerals (e.g., kaolinite, illite, chlorite and illite-smectite), 3.3 – 13.3 wt% of feldspars and traces ($<1 \text{ wt}\%$) of TiO_2 minerals (anatase and rutile) and pyrite. In all cases, the <0.2 and $0.2 - 2 \mu\text{m}$ size fraction of MFT are mainly kaolinite and 2:1 clays (illite, illite-smectite, and kaolinite-smectite). Quartz is mainly concentrated in the coarse fractions ($63 - 250$, $40 - 63$ and $2 - 40 \mu\text{m}$). The finest size fraction ($<0.2 \mu\text{m}$) almost did not contain quartz, whereas contain the highest percentage of 2:1 clays (60.2 – 63.2 wt%). The contribution of ultrafine clays ($<0.2 \mu\text{m}$) for M3 increased a little compared with M1 and M2, indicating that the bleach oxidation procedure can break more clay-bitumen aggregate than solvent treatment.

The carbon content loss less in the finer fractions than in the coarser fractions for treated MFT samples. M2 and M3 have significantly lower carbon content than M1. The amount of hydrogen increased with the size fraction decreased. In all cases, M3 samples, treated with bleach, contained the lowest amounts of carbon, hydrogen, nitrogen, and sulfur for each size fraction.

For all MFT samples, the fine fractions (0.2 – 2 μm and <0.2 μm) had higher CEC values (12.4 – 35.4 meq/100g) than coarse fractions (63 – 250 μm , 40 – 63 μm , and 2 – 40 μm) (0.8 – 4.7 meq/100g). The highest CEC values (35.4 meq/100g) and lowest CEC values (0.8 meq/100g) appear in both the fine (<0.2 μm) and coarse (63 – 250 μm) fractions of M3. This may indicate that NaOCl treatment is more effective for MFT extraction of bitumen. This conjecture was confirmed by the CHNS results, M3 had the lowest carbon content. In the fine fraction (<0.2 and 0.2 – 2 μm size fraction), the CEC values were increased in M3 compared to M2, indicating that bleach treatment will effectively reduce clay-organic matter aggregates, allowing more clays to be sieved into fine fractions.

Conclusion

The three MFT samples contained a variable amount of quartz, clay minerals (kaolinite, illite, illite-smectite, kaolinite-smectite and chlorite), siderite, feldspars, TiO₂ minerals (rutile and anatase) and pyrite. Bitumen removal (Cyclohexane and Bleach) was most effective for the coarser fraction. Bleach treatment can break more clay-bitumen aggregate than cyclohexane. The finest size fractions (<0.2 μm) contained the highest amount of total 2:1 clay mineral (i.e., the sum of illite and mixed-layer clay minerals).

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge financial support from the Slovak Grant Agency (VEGA, projects no. 1/0196/19) and Slovak Research and Development Agency (APVV-20-0175).

References

- [1] Alberta Energy Regulator (AER) (2018) Alberta's Energy Reserves and Supply/Demand Outlook. Calgary, Alberta, Canada, ST98-2018
- [2] Powter C. B., Biggar K. W., Silva M. J., et al. (2011) 14th International Conference on Tailings Mine Waste 2011, Tailings Mine Waste'10, Edmonton, Alberta, Canada, p. 381
- [3] Hooshiar A. (2011) Characterization of Clay Minerals in the Athabasca Oil Sands in

Water Extraction and Nonaqueous Solvent Extraction. (Ph. D thesis) University of Alberta, Canada

- [4] Government of Alberta. Oil Sands: Facts and Stats. [Cited: May 19, 2021]
<<https://www.alberta.ca/oil-sands-facts-and-statistics.aspx>>

Interpretácia teploty morskej vody v plytkovodných prostrediach Viedenskej panvy počas neskorého Bádenu na základe lastúrnikov a dierkavcov

Máriu Bielich¹, Natália Hudáčková¹, Rastislav Milovský²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra geológie a paleontológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

²Ústav vied o Zemi Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Ďumbierska 1, 974 11 Banská Bystrica, Slovenská republika

Abstract

Inferring seawater temperature in shallow-water environments of the Vienna Basin during the Late Badenian on the basis of bivalves and foraminifers

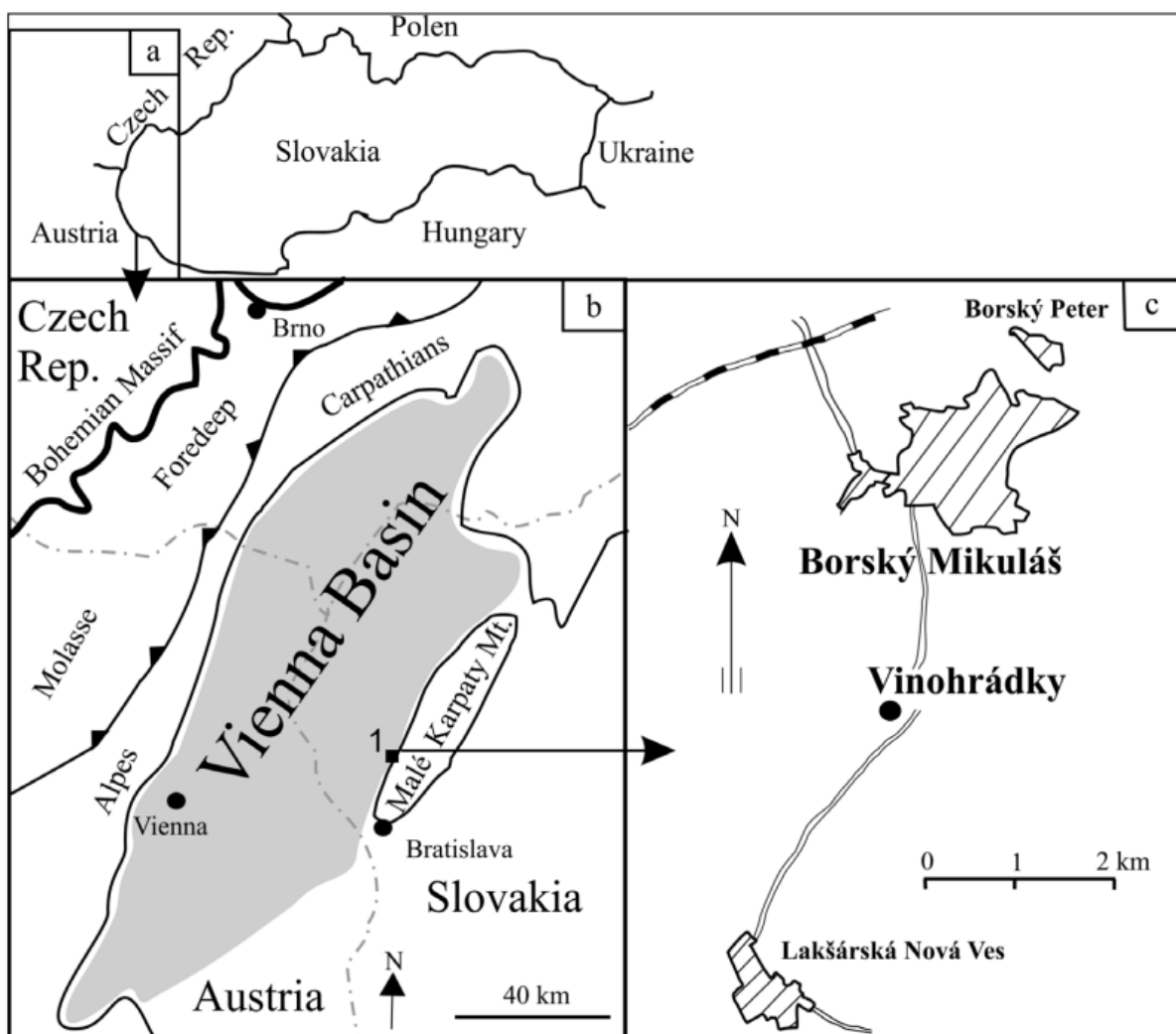
The aim of this work was to determine and interpret the temperature of the shallow-water sea in the area of the Vienna basin during the Late Badenian period on the basis of bivalves and foraminifers. The work is divided into theoretical and practical part. The theoretical part of work describes the geology, biozonation of the investigated environment and the localization of the finding site of the fossilized bivalve shellfish (*Glycymeris pilosa deshayesi*). Temperature changes were described during the Miocene period in the Central Paratethys. Onwards in the theoretical part, the methods are characterized in use to interpretation of sea paleotemperature, as geochemical and sclerochronological methods. The practical part was focused mainly on the application of the above methods and the calculation of temperature and subsequent interpretation of the paleoenvironment of the Borský Mikuláš site.

Keywords: Vienna Basin; Miocene; bivalves; foraminifers; O,C isotopes; water temperature

Úvod a formulácia cieľa

Príspevok predstavuje výsledky geochemických a sklerochronologických analýz fosílií z vrchno bádenských až sarmatských sedimentov získaných z terénneho výskumu vo Viedenskej panve (Obr.1a,b), bližšie z Borského Mikuláša. Skúmaná lokalita sa nachádza v Slovenskej časti Viedenskej panvy. Borský Mikuláš-Vinohrádky sú situované juhozápadne od mesta Borský Mikuláš smerom k obci Lakšárska Nová Ves (Obr.1c). Z geologického hľadiska na lokalite vystupujú sedimenty vrchného Bádenu, zaraďujú sa do Studiečanského súvrstvia [1]. V sedimentoch profilu sa strieda piesok a íl so sporadickými vrstvami drobnozrnného až hrubozrnného štrku.

Cieľ práce je komplexný výskum a paleo-rekonštrukcia vrchno bádenských až spodno sarmatských sedimentov a prostredia v ktorom sedimentovali, za pomoci schránok lastúrnikov (*Glycymeris pilosa deshayesi*). Geochemická analýza založená na izotopoch kyslíka a uhlíka nám poskytla dáta, z ktorých výsledky porovnávame s hodnotami nameranými na fosílnych schránkach dierkavcov. Pričom následne sme vypočítali približnú paleoteplotu prostredia epikontinentálneho plytkého mora Paratethys.



Obr. 1. Geografická lokalizácia profilu Borský Mikuláš-Vinohrádky [2]

Legenda: 1a: Lokalizácia Viedenskej panvy v strednej Európe; 1b: Lokalizácia Viedenskej panvy na území Slovenska a Rakúska; 1c: Lokalizácia profilu vo Viedenskej panve

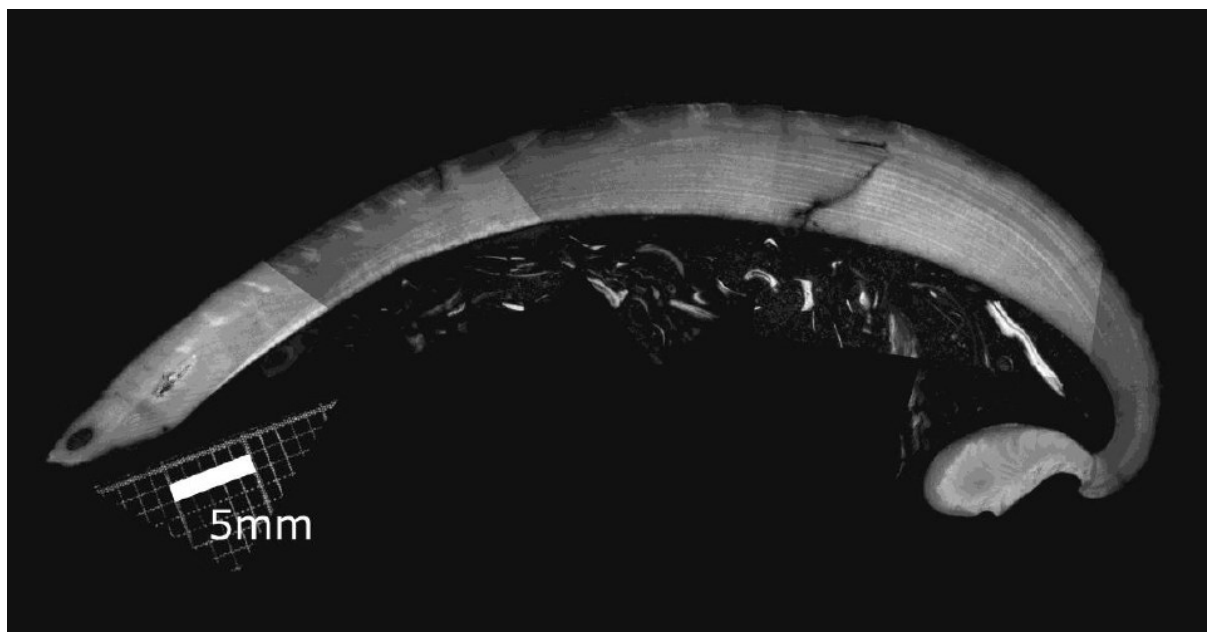
Materiál a metódy

Z danej lokality bola pre našu prácu vybratá jedna vzorka lastúrnika *Glycymeris pilosa deshaysi* (Meyer) o veľkosti 66.1mm po dĺžke (výška lastúry). Lastúra bola vyčistená konvenčným spôsobom a zaliata do epoxidovej živice. Následne bola vzorka prerezaná pozdĺž osi maximálneho rastu od ventrálneho okraju až ku zámku lastúry (Obr.2.). Prierez vzorky bol brúsený brúsnym papierom od zrnitosti 400 po 4000 pre vytvorenie jednotnej hladkej plochy. Z vonkajšej vrstvy schránky bolo odfrézovaných 120 vzoriek aragonitového prášku pozdĺž prírastkových línií o hmotnosti 40-100 mg. Na odfrézovanie materiálu vzoriek bola použitá mikrofréza Micromill (New wave) system s 300 μm vrtákom. Následne bola vzorka podrobená hmotnostnej spektrometrii na prístroji (IRMS) Thermo Finnigan MAT 253 spolu s poloautomatickým zariadením Kiel IV na analýzu uhličitanov. Výsledné hodnoty izotopov

kyslíka a uhlíka boli kalibrované podľa referenčného materiálu NBS18. Odchýlky v meraniach sa pohybovali v rozmedzí 0,02‰ pri uhlíku a 0,04‰ pri kyslíku.

Pre výpočet paleoteploty z výsledných kalibrovaných hodnôt spektrometrie bola použitá rovnica ktorú upravil Dettman [3] pre výpočet teploty z aragonitu.

$$T_{\delta^{18}\text{O}}(^{\circ}\text{C}) = 20.60 - 4.34 * (\delta^{18}\text{O}_{\text{schránka}} - (\delta^{18}\text{O}_{\text{w}} - 0.27)) \quad [\text{I.}]$$



Obr. 2. Fotografia znázorňujúca prierez schránky *Glycymeris pilosa deshaysi* pred odobratím vzoriek, viditeľné poškodenie vnútornej strany schránky

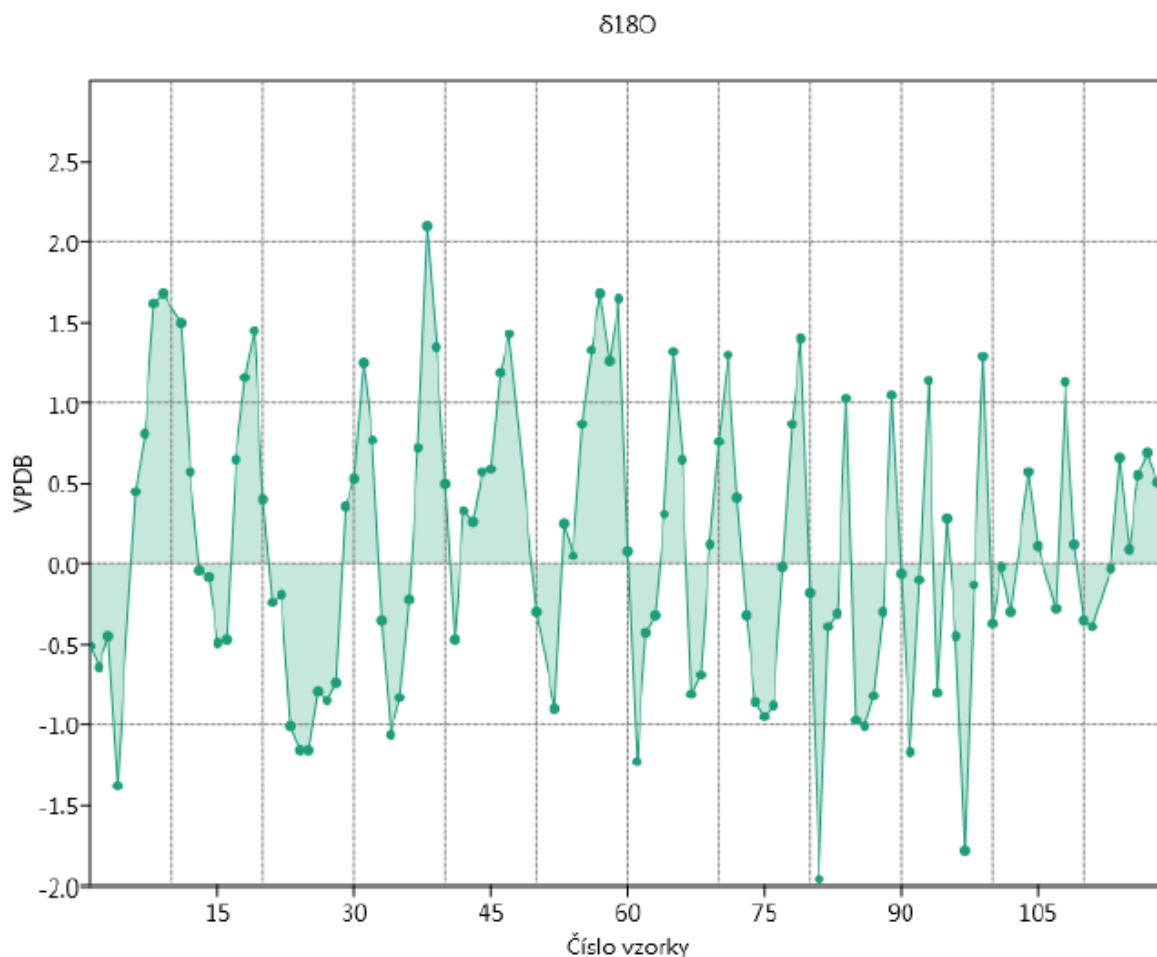
Výsledky a diskusia

Asociácia dierkavcov z lokality obsahovala hlavne zástupcov rodov *Ammonia*, *Biasterigerina* a *Elphidium*. Vek bol určený na základe typickej asociácie pre vrchný bádén a vzácnych planktonických dierkavcov rodu *Globigerina regularis*. Zo vzorky z lokality Borský Mikuláš-Vinohrádky sa podarilo namerať 111 hodnôt z pôvodne 120 odobratých. V nasledujúcej tabuľke sú znázornené vybrané dôležité číselné namerané hodnoty.

Tab. 1. Tabuľka sumarizujúca namerané hodnoty – (Max) maximálna nameraná hodnota, (Min) minimálna nameraná hodnota, (Priemer) priemerná nameraná hodnota, (Medián) stredná hodnota, (Max-Min) rozdiel medzi najvyššou a najnižšou hodnotou

	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	$\delta^{18}\text{O}(\text{‰})$
Max	2,518423	2,098377
Min	0,488898	-1,96231
Priemer	1,239377	0,118839
Medián	1,217951	0,053478
Max-Min	2,0295225	4,060687

Hodnoty $\delta^{18}\text{O}(\text{‰})$ vynesené do grafu ukazujú pravidelné striedanie sa kladných a záporných hodnôt, s veľmi dobre rozlíšiteľnými hodnotami maxima a minima, krivka postupne naberaá hodnotový spád (Obr.3).



Obr. 3. Graf znázorňuje meniace sa hodnoty $\delta^{18}\text{O}(\text{‰})$ získané zo schránky vrchnobádenskej lastúry *Glycymeris pilosa deshayesi*, os X znázorňuje číslo odobratých vzoriek, os Y znázorňuje škálu hodnôt $\delta^{18}\text{O}(\text{‰})$ vo (VPDB).

Pri interpretácii výsledných hodnôt paleoteploty mora sme zvolili dve hodnoty $\delta 18\text{O}_w$ izotopového zloženia vody, ktoré sa vo vrchnom bádene v oblasti Centrálnej Paratetýdy pohybovali od 0(‰) po 1(‰) ako zaznamenal v práci Harzhauser [4]. Dve hodnoty izotopového zloženia vody sme zvolili preto, lebo nevieme s presnosťou určiť vek skúmanej lastúry, ktorej vek bol určený na základe nálezovej lokality na vrchný bádén. Oba výpočty teploty ukazujú výraznú sezónnosť, pričom rozdiel izotopového zloženia vody o jednu hodnotu na škále robí rozdiel teploty 4.34°C.

Asociácia dierkavcov dokumentuje plytkovodné prostredie morských lúk s možnou fluktuáciou salinity a obsahu kyslíka v dnovom sedimente, čo by mohlo podporovať domnienku o sezonalite.

Tab. 2. Tabuľka sumarizujúca výsledné hodnoty teplôt pri oboch izotopových hodnotách okolitej vody – (TTS) teplota teplej sezóny, (TSS) teplota studenej sezóny.

	°C ($\delta 18\text{O}_w = 1$)	°C ($\delta 18\text{O}_w = 0$)
Max	32,2	27,9
Min	14,6	10,3
Priemer	23,2	18,9
Priemer TTS	26,3	22
Priemer TSS	20,1	15,7
Medián	23,5	19,1
Max-Min	17,6	17,6

Záver

Glycymeris pilosa deshayesi bol pomerne dobrou voľbou na rekonštrukciu paleoteploty prostredia v období miocénu ale aj recentných prostredí pomocou príbuzných dodnes prežívajúcich druhov rodu *Glycymerididae*. Tento morský druh lastúrnika obýval plytké príbrežné prostredia, ktoré predstavujú ideálne prostredie spojenia klimatických vplyvov mora a súše. Vďaka vhodnej veľkosti lastúry a zachovania jej aragonitovej schránky sa nám podarilo aplikovať sklerochronologické metódy a odobrať vzorky pre geochemické izotopové merania. Pre dlhovekosť tohto druhu bolo možné pozorovať sezónne zmeny teploty počas pätnástich sezón jeho života a určiť tak priemernú teplotu plytkého vnútrozemského mora, Centrálnej Paratetýdy na jej severovýchodnom okraji Viedenskej panvy s dnom porasteným morskými trávami. Na základe lokality Borský Mikuláš-Vinohrádky sme datovali lastúrnika na vrchný bádén, čo nám potvrdili aj výsledky spoločenstva dierkavcov. Z izotopového záznamu schránky sme vypočítali hodnoty, priemerná teplota dosahovala 18.9°C, priemerná teplota

teplej sezóny 22°C a priemerná teplota chladnej sezóny 15.7°C rozdiel týchto hodnôt nie je veľký a predstavuje 6.3°C no rozdiel teplotného minima a maxima predstavuje až 17.6°C.

PodĎakovanie

Za cenné rady, pripomienky, odbornú pomoc a odovzdané skúsenosti ďakujem Mgr. Adamovi Tomašových, DrSc. A za finančnú podporu grantom APVV-15-0575, VEGA2/0169/19 a VEGA 2/0013/20.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Vass D. (2002) Litostratigrafia Západných Karpát: neogén a budínsky paleogén. Štátny geologický ústav Dionýza Štúra, Bratislava, p. 202
- [2] Brzobohatý R., Zahradníková B., Hudáčková N. (2022) Riv. It. Paleontol. Strat. 128(2), p. 515
- [3] Dettman D. L., Reische A. K., Lohmann K. C. (1999) Geochim. Cosmochim. Acta 63, p. 1049
- [4] Harzhauser M., Piller W. (2007) Palaeogeogr. Palaeocl. 253(1-2), p. 8

Finding of the Miocene turtle shell fragment from the vicinity of Dúbravská hlavica (Bratislava, Slovakia)

Fillip Cesnak, Tália Chabanová, Dominik Kuvik, Petra Astrid Michel, Andrej Ruman

*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Geology and Palaeontology, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak republic;
cesnak11@uniba.sk*

Abstract

The area of Devínska Kobyla hill is well known for its palaeontological localities dated to the Middle Miocene. In this paper, a find of a fragmental?costal in a new site - Meszároš locality is described. The exposed profile consists of marine sandstones dated to Middle Miocene (Badenian, ~13 Ma). The fragment found in the scree of the studied outcrop belongs to superfamily of terrestrial/freshwater turtles ?Testudinoidea. The fragment lacks diagnostic signs, disabling its exact taxonomic determination. From this area, there were already described turtle remains of *Psephophorus* sp., *Trionyx* sp. and *Testudo* sp.. Based on the co-occurrence of strictly marine fossils within respected sediment, we were able to interpret the transitional (shallow marine/terrestrial) palaeoenvironment.

Keywords: Turtle; Miocene; Badenian; Dúbravská hlavica; Central Paratethys

Introduction

In 2022, for the subject “*Methods in Palaeontological research*” (Comenius University) we have visited the “Mezsároš locality” in the vicinity of Dúbravská hlavica (on the southeast slope of the Devínska Kobyla hill (Fig. 1), rich in fossil remains of molluscs, fish, turtle, and ichnofossils. The locality, which consists of the Middle Miocene (Badenian, 13 Ma) sediments was named after Štefan Meszároš, a local palaeontologist and prominent Neogene fossil collector. The Middle Miocene (Neogene) sediments of this site belong to the Studienka Fm.

Fossil turtles of the Central Paratethys are known from several localities generally belonging to marine, land as well as freshwater biotopes [1]. The studied area is situated in the eastern marginal part of the Vienna Basin at the foothills of the Malé Karpaty Mts in the Bratislava urban area (Slovakia) [2]. The locality is one of many sites in the vicinity of Devínska Kobyla hill – a well-known palaeontological area studied since the 19th century [3 – 8].

The goal of this work is to describe the turtle fragment and interpret the palaeoenvironment in which the turtle lived.

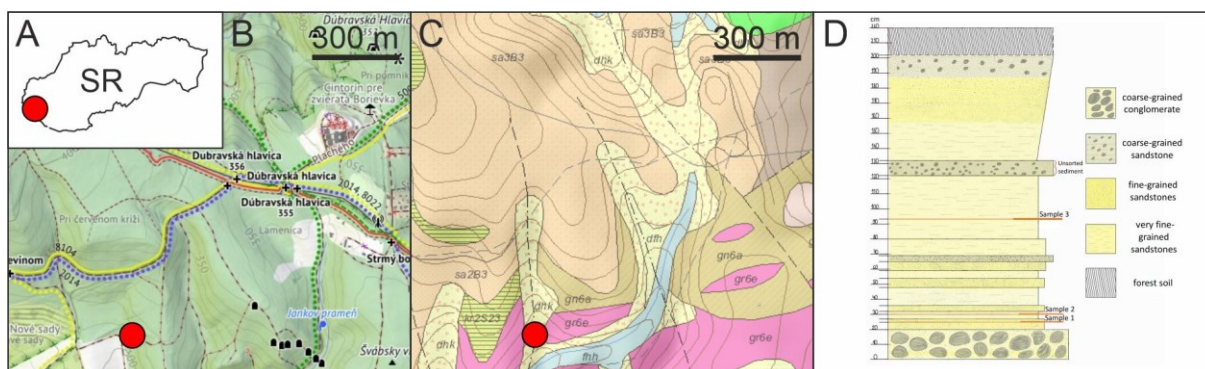


Fig. 10. Localization of the site and profile. A – Map of Slovak republic; B – Basic geographic map adopted from [9]; C – Geological map adopted from [10]; D – Simplified lithological scheme of the studied profile of the Meszároš locality. For explanatory notes to Fig. 1B-D see referenced sources.

Material and methods

Our research consisted of three main realms: fieldwork, laboratory work and actual study and description of the find.

On the field, palaeontological tools, notebooks/scrapbooks, pencils, papers, plastic bags, a tape measure and HCl solution (3%) were used. At first, the outcrop was cleaned with a palaeontological hammer and shovel. To observe sedimentary structures, it was first cleaned with a brush. When the outcrop was clean enough, it was drawn down. For the scale, a tape measure was used. To prove the presence of CaCO_3 in the rocks HCl solution was used. For micropalaeontological research, 200 g samples from three layers were taken. Fossil samples were taken using a palaeontological hammer and were wrapped in paper and put into a plastic bag together with a note with basic information (name of the locality, GPS coordinates, date). The information was duplicated onto the plastic bag.

Later in the laboratory, the fossil turtle fragment was dried and brushed to clean sediment from the surface of the bone. Afterwards, ammonium chloride was applied on the surface to highlight the sculpture for photo-documentation purposes. Subsequently, ammonium chloride was brushed away, and the conservation liquid (paraloid) was applied. Paraloid was used on the fragment also as a glue. Applying it in multiple thin-liquid loads, led to better penetration into the bone and prevented formation of a thick coat on the surface. The fossil was separated from the rock by using a needle. Spare fragments were glued together with dispersion glue. The fossil was stored in a plastic box in the department of Geology and Palaeontology of Comenius University in Bratislava.

To classify the find, the fragment was compared with other fossil turtle remains from the region of Vienna Basin and/or Central Paratethys respectively – kept in repositories of the Slovak National Museum in Bratislava (later SNM), Dúbravské Múzeum in Bratislava (later

DM), and the Natural History Museum in Vienna (later NHM), as well as a consultation with an expert from Comenius University. Related literature was acquired from published open-access sources and from the geological library of the Faculty of Natural Sciences of Comenius University in Bratislava. Morphological characteristics and terminology were adopted mainly from [11], and geological settings from [2, 8]. Photo plates were adjusted by CorelDraw software.

Results and discussion

The locality is situated on the southeast slope of the Devínska Kobyla hill, ca. 700 m southwest of the Dubravská hlavica (48°10'48"N; 17°0'27"E). The locality consists of several outcrops, all of which are in one ditch in the forest. Several outcrops in the ditch consist of coarse to fine-grained, marine, Middle Miocene (Badenian), sediments of the Sudienka Fm. (Fig. 1D). The examined outcrop was ca. 2 m in height starting with the 20 cm thick layer of very coarse-grained conglomerate (cobbles up to 25 cm in diameter). The following interval 20-70 cm is characterized by an alternation of very fine-grained and fine-grained sandstones. Upwards (70-190 cm) follows a very fine-grained sandstone body, which is interrupted by ca. 10 cm coarse-grained sandstone. The upper part of the outcrop is formed by erosion boundary and continued by ca. 10 cm slope debris followed by forest soil. Decalcified moulds of fossil molluscs (e.g., *Thracia* sp.) and shells of pectinid bivalves are common in the outcrop. Besides turtle fragments, a tooth (Sparidae indet.), fish bone and ichnofossils were also found.

By using HCl solution (3%) carbonate content of the sediment grains was proved.

Systematic part

Order TESTUDINES Linnaeus, 1758

Superfamily Testudinoidea Gray, 1825

?Testudinoidea indet.

Locality: Meszároš locality (Dubravská hlavica) – scree.

Material: fragment of a shell (fragment of ?costal) (Fig. 2).

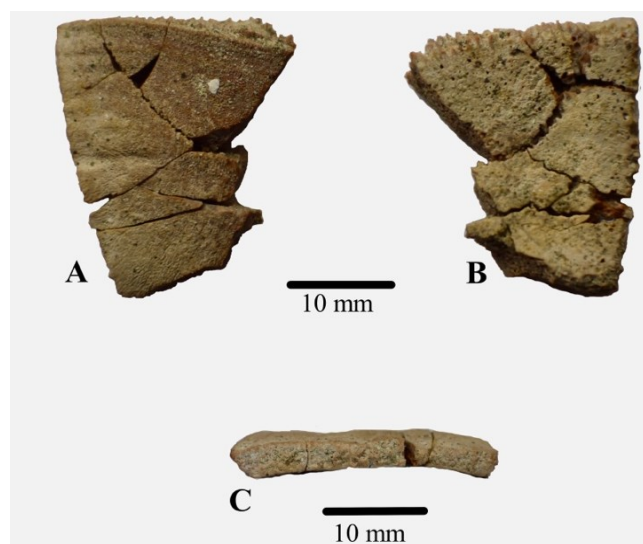


Fig. 2. Fragment of a turtle shell (?Testudinoidea indet.). A - dorsal view; B - ventral view; C - lateral view

Description: From the dorsal view the fragment is longer than wider, it is 27 mm long, 23 mm wide on the posterior edge and 11 mm wide on the anterior edge. There are growth lines running parallel to the medial edge. On the ventral side, the fragment is fairly smooth and on the dorsal side, it is slightly textured. From the lateral view, the fragment is 3 mm thick and is slightly arched/vaulted towards the dorsal side. There are no diagnostic characteristics (dermal grooves, bone sutures) present on the fragment.

Palaeoecology: During the Miocene, the semi-enclosed Paratethys sea was in the area of the Vienna Basin sprinkled by archipelagos/islands which were a part of the Carpathian arc [2]. The area of Devínska Kobyla hill was such a land as it is proved by finds of fossil terrestrial life forms fossils together with marine ones. ?Testudinoidea indet. were terrestrial/ freshwater turtles, and the remains of the turtle were most likely washed into the sea.

Discussion: The fragment was compared with material from the NHM, SNM and DM, based on the fossil turtles found near Meszároš locality (Dúbravská hlavica) and in the Vienna Basin (i.e., genera *Trionyx*, *Psephophorus*, *Testudo* and additionally *Ptychogaster*).

At SNM, the fragment was compared with the genus *Trionyx* (seen in the paleontological exposition) and it was determined that it is not similar based on the ornamentation of the carapace present on *Trionyx* and absent on our fragment. At the DM, a comparison was made with turtles belonging to *Testudo* sp. (Fig. 3) it was determined that they are not similar based on the thickness and a lack of any diagnostic characteristics (bone sutures, dermal grooves) on our fragment. At the NHM, the fragment was compared with the genus

Psephophorus and it was determined that they are not similar based on the fact that *Psephophorus* is a genus of a Dermochelyidae family [12] that don't have a real carapace but their dorsal side is covered by bony plates – ossicles. Another comparison at the NHM was made with the genus *Ptychogaster*, more specifically *Ptychogaster grundensis* (as seen at the palaeontological exposition) [13]. This was the closest comparison mainly based on the thickness of the shell, but due to a lack of diagnostic features (dermal grooves and bone sutures), the assignment to *Ptychogaster* sp. was denied. After consultations with experts regarding fossil turtles, it was suggested that it could be part of the Geoemydidae family, based on the thickness, but as was mentioned previously the lack of characteristic features made it difficult to taxonomically allocate. Therefore, it was assigned as ?Testudinoidea indet.

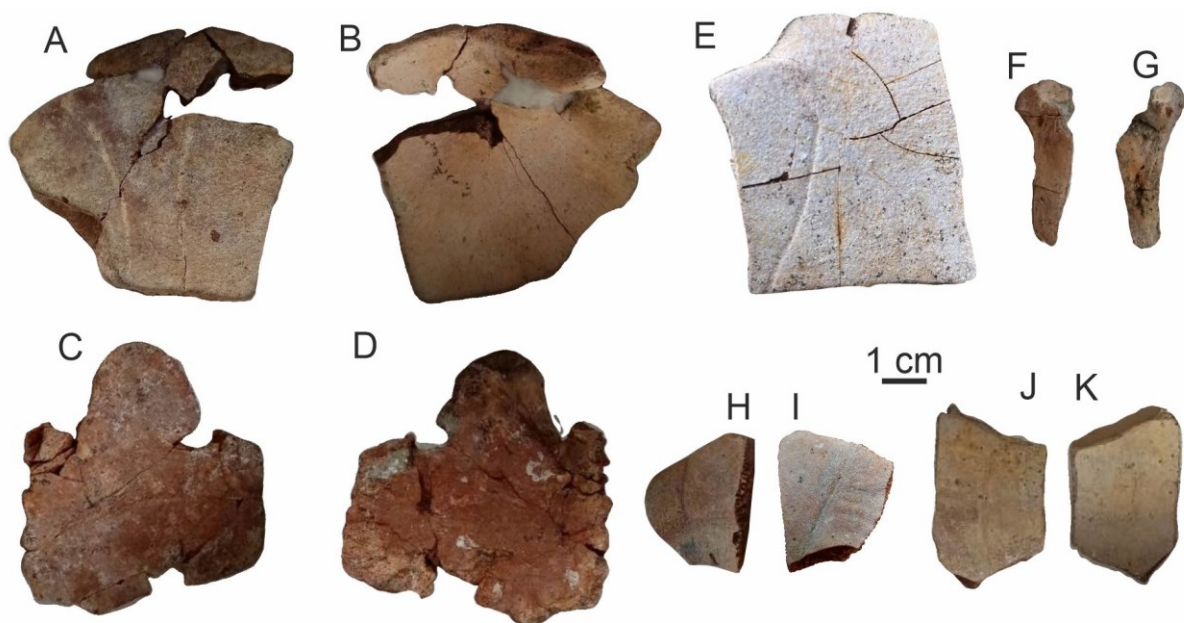


Fig. 3. Turtle remains (*Testudo* sp.) from Dúbravské museum. A, B – ventral and dorsal sides of plastron fragment; C, D – ventral and dorsal sides of plastron fragment; E – ventral side of plastron fragment (dorsal side unsuitable for photodocumentation); F, G – humerus fragment; H, I – ventral and dorsal side of carapace fragment; J, K – ventral and dorsal sides of shell fragment.

Conclusion

The fossil turtle carapace fragment found in the Middle Miocene sediment of the Meszároš locality is hard to systematically classify due to its small size and lack of significant surface structures. The best clue was comparing the found turtle fragment with the remains of other fossil turtles found in the region of the Vienna Basin. Because of a lack of any diagnostic characteristics, the find was assigned to be ?Testudinoidea indet. Testudinoidea is a large group of terrestrial and freshwater turtles. While there is no unequivocal evidence of the environment

where the turtle of the found fragment lived, the marine sediments and marine fossil organisms found in the Meszároš locality, indicate that the find was washed into the sea.

Acknowledgements

We would like to thank taxonomic consultants Dr. A. Čerňanský, Dr. À. H. Luján and Dr. G. Georgalis, to Dr. M. Harzhauser and Dr. U. B. Göhlich from NHM in Vienna for providing access to turtle collections, to Mr. Š. Mezsároš for consultation and access to his fossil collection, to Dr. B. Záhradníková and Dr. A. Ďurišová for access to the turtle fossils in the SNM, and to Dr. K. Šarinová for consultation about sedimentology. We would also like to thank to APVV-20-0079.

References

- [1] Danilov I.G., Čerňanský A., Syromyatnikova E.V., et al. (2012) AMRE 33, p. 423
- [2] Kováč M., Hudáčková N., Halášová E., et al. (2017) AGEOS 9(2), p. 75
- [3] Zapfe H. (1952) Sitzungsberichte Österr. Akad. Wiss. Math. – Naturwiss. Klasse, Wein, Abt. I, 160(5), p. 449
- [4] Cícha J., Fahlbusch V., Fejfar O. (1972) N. Jb. Geol. Paläont. Abh., Stuttgart 140(2), p. 129
- [5] Švagrovský J. (1981) Bratislava, Západné Karpaty, ser. Paleontológia 7, p. 5
- [6] Holec P., Sabol M., (1996) Min. Slovaca. 28(6), p. 519
- [7] Holec P. (2005) Geológia a paleontológia Devínskej kobyly, In: Feráková V. and Kocianová E.(eds.) Flóra, geológia a paleontológia Devínskej Kobyly. Litera, Bratislava, p. 11
- [8] Hyžný M., Hudáčková N., Biskupič R., et al. (2012) AGEOS 4(2), p. 95
- [9] Freemap Slovakia, digitálne mapy [Cited: March 30, 2023] <www.freemap.sk>
- [10] Geologická mapa Slovenska 1:50 000 [Cited: March 30, 2023] ŠGÚDŠ <www.geology.sk>
- [11] Luján À. H., Čerňanský A., Bonilla-Salomón I., et al. (2021) Geodiveritas 43(20), p. 691
- [12] Delfino M., Scheyer T.M., Chesi F., et al. (2013) Geol. Mag. 150(5), p. 767
- [13] Bachmayer F., Schaffer H. (1959) Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien, 63. p. 82

Composition of rutile from the Ochtiná-Rochovce W-Mo porphyry deposit based on LA ICPMS analysis

Diego Delgado Yáñez¹, Peter Koděra¹, Frederik Börner², František Bakos³

¹*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Mineralogy, Petrology and Economic Geology, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak republic, yanez1@uniba.sk*

²*Friedrich-Schiller-Universität, GeoZentrum Nordbayern, Chair of Endogenous Geodynamics, Schlossgarten 5, 910 54 Erlangen, Germany*

³*Green View, s.r.o., Nevädzová 5, 821 04 Bratislava, Slovak republic*

Abstract

Rutile at the porphyry W-Mo deposit Ochtiná-Rochovce is anomalously enriched in W (up to 17 wt. %), which is a particular characteristic of this deposit. No studies have been conducted to analyse a broader spectrum of trace elements in these rutiles nor their origin has been discussed. The present studies recognized high concentrations (above 100 and up to thousands of ppm) of elements such as W, Nb, V, Cr and Sn, based on EMPA-WDS and in-situ LA-ICP-MS results. Those concentrations and the inclusion of rutile in or adjacent to veinlets (e.g. quartz-pyrite-molybdenite, quartz-wolframite-scheelite-pyrite) suggest and hydrothermal origin. No trace element composition in rutiles of another W-Mo porphyries deposits has been found, but Cr+V / Nb+Ta vs REE diagram indicates proximity to the Tuwu Cu porphyry deposit (China). The source of Ti for rutile formation at this deposit is inconclusive, but it is inferred that at least it partially derives from decomposition of Ti-rich phases such as titanite, ilmenite, biotite and amphibole during hydrothermal activity.

Keywords: rutile; W-Mo porphyry deposit Ochtiná-Rochovce; hydrothermal origin

Introduction and Objectives

The W-Mo porphyry deposit Ochtiná-Rochovce corresponds to a small and unique occurrence of its kind in the Western Carpathians, which genesis has been linked to the Early Cretaceous Rochovce intrusion and controlled by the Lubeník-Margecany suture line [1, 2]. Its resources have been estimated in 5.0 Mt W and 2.4 Mt Mo at a grade of 0.2 % for both commodities [1].

This deposit is hosted in a set of metasedimentary rocks and metabasalts from Lower Carboniferous to Permian, belonging to the Ochtiná, Rimava and Slatvina Fms. [3]. The mineralization occurs in two ore bodies, consisting of a lower zone containing molybdenite, and an upper zone with both scheelite and wolframite, accompanied by other ore minerals such as pyrite, chalcopyrite and pyrrhotite [1, 4]. The main ore minerals are mainly hosted in veinlets, such as quartz-pyrite-molybdenite, pyrite±quartz, quartz-wolframite-scheelite and pyrite-scheelite [5]. The hydrothermal alteration at the deposit exhibits a classical concentric pattern of porphyry deposits including K-alteration, silicification, sericitization, chloritization and carbonatization [1, 4, 5].

Several works have shown two peculiar mineralogical characteristics of this work: the presence of Mg-rich wolframite (huanzalaite) and W-rich rutile. Indeed, MgO content in wolframite can reach up to 7 wt. % and it is found restricted to intervals with amphibolite [5, 6]. Microprobe results (EMPA-WDS) on rutile indicate that this mineral can be formed by zones of up to 17 wt. % WO_3 , with typical content between 0.5-1 wt. % WO_3 [7, 8]. A previous study [9] suggests that the formation of W-rich rutile can be derived from Fe-Ti oxides hosted in sedimentary rocks, which can bear W and release it during later hydrothermal events.

The main goal of this work is to establish a link between trace elements analysed in rutile from the Ochtina-Rochovce deposit and the origin of this mineral. For this, petrographical characterization and EMPA-WDS as well as in-situ laser ablation mass spectroscopy (LA-ICP-MS) were used.

Materials and methods

Around 15 thin sections were studied by both reflected and transmitted light to describe the size, texture, and link of rutile to the main ore-bearing veinlets at the deposit.

Composition of rutile in 3 samples was analysed by a JEOL JXA-82000 EMPA at the GeoZentrum Nordbayern (Erlangen, Germany), including Fe, As and V. The same samples were later analysed by LA ICPMS via a Teledyne unit, with a 193 nm laser, spot beam of 35 microns and 20-25 for smaller grains, with NIST SRM 610 and GSE-1g as external standards, while previous EMPA-WDS results on rutile were used as internal standards. The list of trace elements analysed by this method are Na, Si, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Sn, Hf, Ta, W, and REE. Trace elements with >50 % of their values below detection limit (DL) were discarded.

Results and discussion

Rutile was identified as euhedral elongated crystals between 0.1-0.2 mm long following the main foliation of both micaschist and amphibolite (Fig. 1). In the amphibolite, rutile is replacing both ilmenite and titanite, which are decomposition products of rock-forming amphibole. In the same host rock, rutile was observed as exsolutions in magnetite and titanomagnetite. In both micaschist and amphibolite, rutile is commonly close to quartz-pyrite±molybdenite, pyrite-quartz and W-bearing veinlets, spatially related to K halos that include K feldspar and biotite. Rutile was also recognized in quartz-pyrite-wolframite-scheelite and quartz-molybdenite veinlets as small (<50 microns) rounded euhedral crystals. Inside and adjacent to W-bearing veinlets, rutile shows irregular zoning with brighter areas enriched in W.

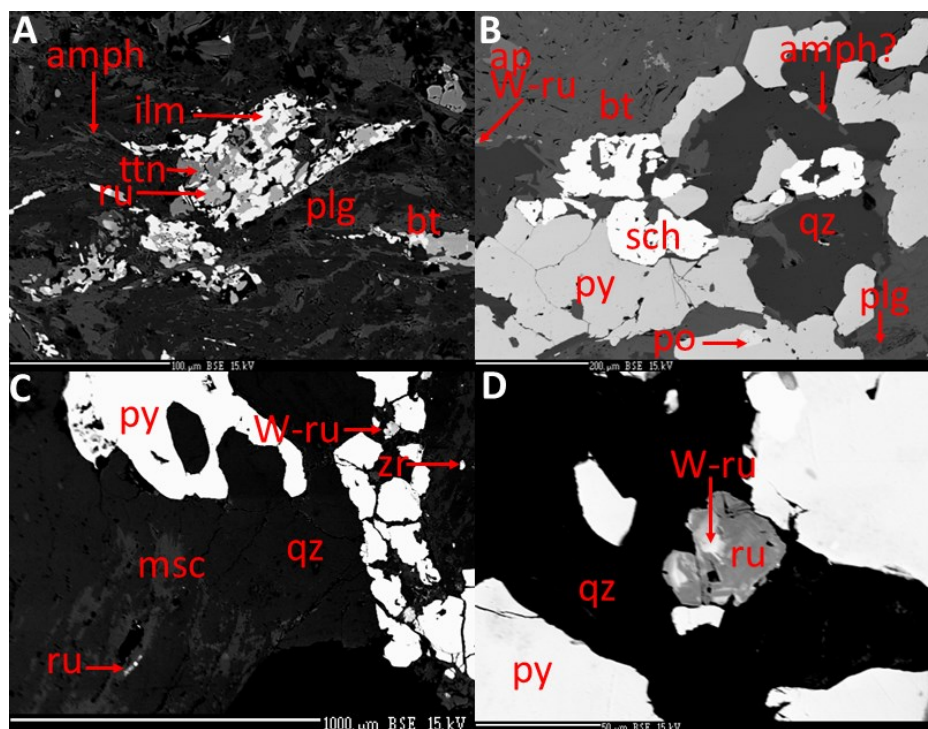


Fig. 1. Back-scattered electron (BSE) images of rutile in amphibolite and micaschist. A) Rutile (ru) replacing ilmenite (ilm) and titanite (ttn) in amphibolite, locally affected by K alteration. This host-rock is mainly composed by amphibole (amph), replaced by biotite (bt) and plagioclase (plg). B) W-enriched rutile (W-ru) in the same sample as A, adjacent to a veinlet dominated by pyrite (py), with pyrrhotite inclusions (po), and also formed by scheelite (sch) and quartz (qz). This veinlet halo is biotitised, also containing apatite (ap). C) Micaschist with foliated muscovite (msc), with rutile accessory zircon (zr). W-rich rutile is also found in a py-qz veinlet. D) Zoom-in of the py-qz veinlet shown in C, with a zoned rounded rutile, which brighter areas have higher W content

EMPA-WDS of rutile analysed in quartz-wolframite-scheelite-pyrite veinlets showed that W, Fe, Al, V, Cr and Nb are the main trace elements. W reaches concentrations up to 2.7 wt. % (average=1.19 wt. %), while Fe ranges from 0.14 to 1.24 wt. % (average 0.63 wt. %) and Al from 0 to 1.18 wt. % (average .11). The sum Cr+V+Nb oscillates between 0.47-1.77 wt. % (average=1.02 wt. %) and it is highly correlated to W (Pearson coefficient $r=0.83$).

In-situ LA-ICP-MS analyses of rutile indicate that the main trace elements are Nb (320 to 411 ppm, $\bar{x}=1504$ ppm), Cr (142 to 4980 ppm, $\bar{x}=1461$), W (288 to 46396 ppm, $\bar{x}=1167$), and Sn 80 to 2219 ppm, $\bar{x}=883$ ppm). Nb ranges between 320-411 ppm Nb ($\bar{x}=1504$ ppm), 142-4980 ppm Cr ($\bar{x}=1461$), 288-46396 ppm W ($\bar{x}=11657$) and 80-2219 ppm Sn ($\bar{x}=883$ ppm). Other trace elements include Zr, Ta, LREE and HREE, all with averages below 200 ppm.

Two analysed spots show anomalously high trace element content compared to the rest of the dataset. Particularly, spot 6 in sample OV7-81.6 contains the highest values of Nb, LREE, Ta and HREE (4111, 2496, 225 and 30 ppm, respectively). The other analysis corresponds to spot 21 in sample OV12-39.1 shows the highest values of W, Cr and Ta (46396,

4980 and 200 ppm respectively). [The complete set of analysis for the most abundant trace elements are shown in Figure 2.

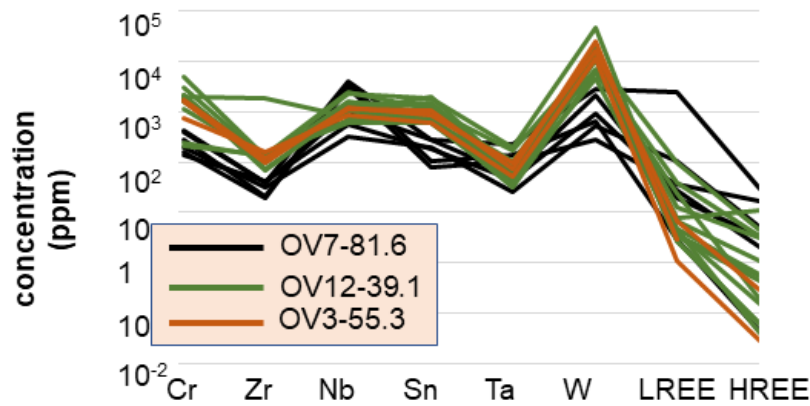


Fig. 2. Multielement diagram of trace elements in rutile in three analysed samples

Pearson coefficients >0.75 allow to establish good direct correlations of the elements Cr-Sn-W, Nb-Ta and LREE-HREE (Figure 2). These subgroups are similar to those proposed in several works [10, 11] to differentiate rutile related to mineralisation from other types such as metamorphic, igneous and detrital, thus the sample diagrams are used in Figure 3.

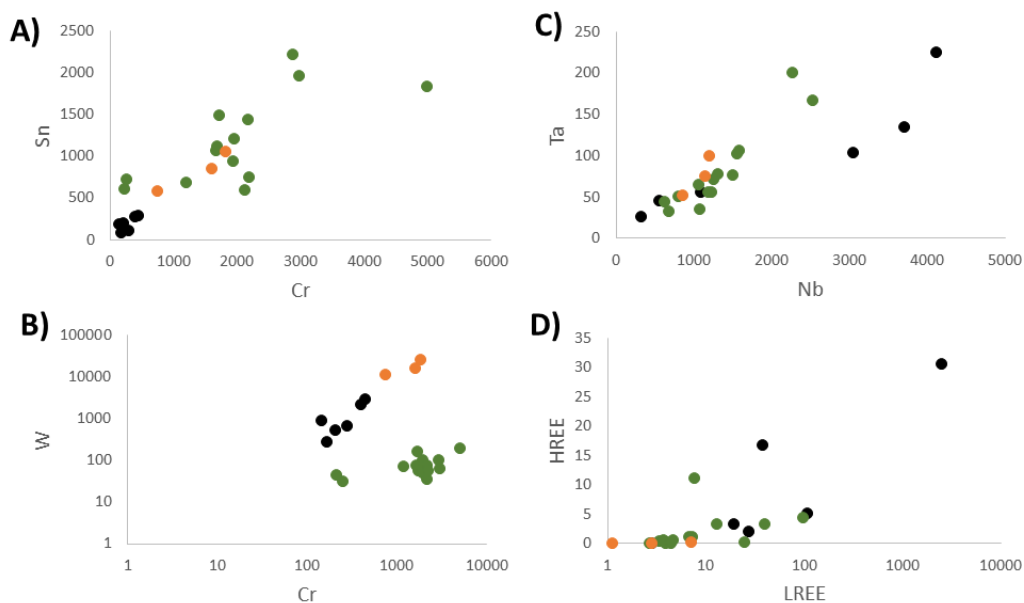


Fig. 2. Correlations among selected trace elements three analysed samples. A) Cr-Sn with $r=0.84$. B) C) $\text{Log}(\text{Cr})\text{-log}(\text{W})$ with $r=0.92$. C) Nb-Ta with $r=0.85$. D) $\text{Log}(\text{LREE})\text{-HREE}$ with $r=0.83$

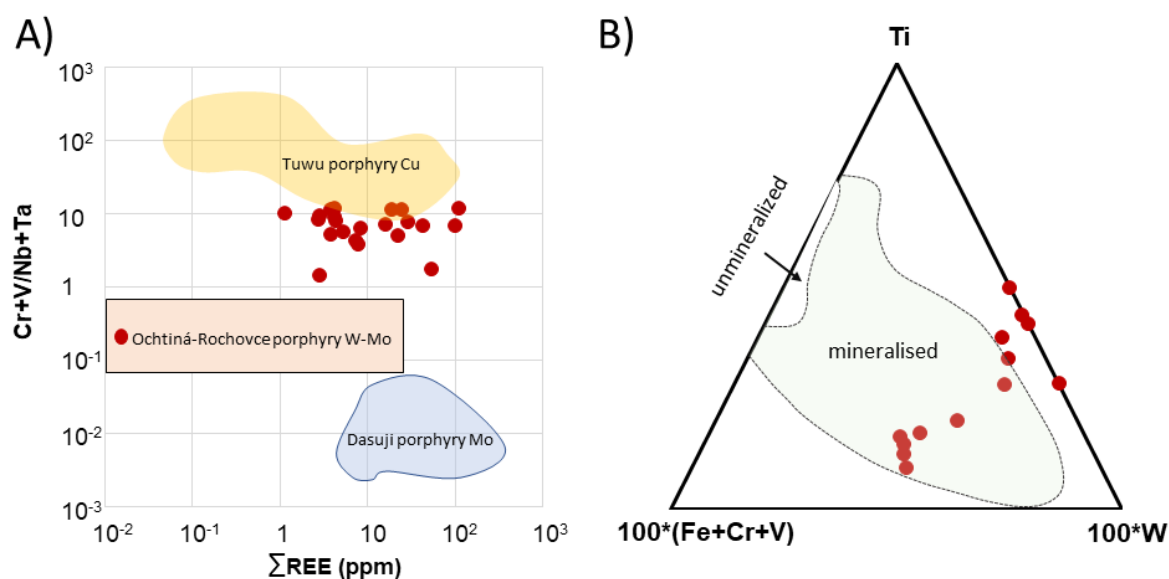


Fig. 3. Diagrams used for rutile of hydrothermal origin– A) Log (Cr+V / Nb+Ta) vs ΣREE , indicating that rutile from Ochtiná-Rochovce are close to the field of rutile composition from the porphyry Cu deposit Tuwu [11]. B) Ternary diagram used in the same work, indicating that most of the rutile from Ochtiná-Rochovce are much enriched in Fe,Cr,V and W than rutile not related to any mineralisation (as metamorphic and intrusive-related rutiles compared in [11])

Conclusion

The high concentration of W, Cr, V, Nb and Sn in rutile adjacent and in the main mineralization-related veinlets at Ochtiná-Rochovce are similar to some porphyry Cu deposits [10,11,12]. For instance, according to $\text{Cr+Nb} / \text{Nb+Ta}$ vs. ΣREE contents the composition of the studied rutile is close to the Tuwu porphyry Cu deposit [11]. Unfortunately, no published data on rutile from porphyry W-Mo deposits is available; thus, it is not possible to relate the present data to this subgroup of porphyry deposits.

Rutile is found precipitating directly in micaschist, but also intergrowing with both titanite and ilmenite in amphibolite, which are products of amphibole and biotite decomposition. Hence, it is unclear if the Ti source is exclusively derived from the breakdown of Ti-bearing minerals, as proposed in [12]. The same study associates this breakdown to K alteration formed between 400-700 °C, but fluid inclusion studies in quartz-related veinlet would be needed to constrain these temperatures at Ochtiná-Rochovce, which can be complemented with Zr-in-rutile geothermometry [13].

Acknowledgement

This work was supported by the Comenius University Grant for Doctoral Students UK/107/2021 and an Erasmus+ short stay scholarship granted by the Comenius University at

GeoZentrum Norbayern Erlangen in Germany. Special thanks to Dr. Helene Brätz for guiding the LA ICPMS work and its data reduction.

References

- [1] Bakos F., Jánošík M., Sýkora M. (2016) Final report with reserves calculations - Ochtiná W, Mo, Re mineralisation. GreenView report, p. 38
- [2] Kohút M., Stein H., Uher P., et al. (2013) *Geol. Carpath.* 64(1), p. 71
- [3] Vozárová A., Vozár J. (1988) Late Paleozoic in West Carpathians. Slovak Geological Survey, Bratislava, p. 140
- [4] Lörincz L., Švantnerová E., Bachňák M. (1993) Final report: Ochtiná-Rochovce Mo, W investigation report: status on 30.9.1993. MS, archív Geofond, Bratislava, 79365, p. 225
- [5] Delgado D., Koděra K., Bakos F. (2021) Advances in lithological, mineralogical, and geochemical characterization of the W-Mo porphyry deposit Ochtiná-Rochovce. *Geochémia, Senec*, p. 131
- [6] Ferenc S., Uher P. (2006) *N. Jb. Miner. Abh.* 183(2), p. 165
- [7] Bendel M. (2017) Mineralogical and technological description of the tungsten ore of Ochtiná, Slovakia (MSc thesis) Friedrich Schiller University Jena, Germany
- [8] Ebel H. (2021) Mineralisation of the Kyslá Au-W and Ochtiná W-Mo deposits, Central Western Carpathians, Slovakia (MSc thesis) Eberhard Karls University Tuebingen, Germany
- [9] Majzlan J., Bolanz R., Göttlicher J., et. al. (2021) *Am. Min.* 106(4), p. 609
- [10] Meinhold G. (2010) *Earth. Sci. Rev.* 102(1-2), p. 1
- [11] Wen X., Zhang F., Wang Y., et al. (2021) *Minerals* 11(9), p. 968
- [12] Rabbia O., Hernández L. (2012) Mineral chemistry and potential applications of natural-multi-doped hydrothermal rutile from porphyry copper deposits. It-Meng (Jim) Low, Nova Science Publishers, Inc., Bentley, Australia, p. 209
- [13] Zack T., Moraes R., Kronz A. (2004) *Contrib. Mineral. Petrol.* 148, p. 471

Dlhodobé sledovanie chemického a izotopového zloženia podzemnej vody vo výukovom vrte v areáli PrF MU

Barbora Daniela Filová

Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav geologických věd, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno, Česká republika; barcafilova@gmail.com

Abstract

Long-term monitoring of the drill hole at the Faculty of Science of MU

The thesis deals with analyses of water from a hydrogeological drill hole, located at the Faculty of Science of Masaryk University. The research focused on seasonal changes of water level, physical properties, and chemical and isotopic composition of the water. The analyzed samples were collected in the span of one year with roughly monthly periodicity. The samples were analyzed and tested in laboratories later on. Measurements of physical properties of the water also took place during every sample collection. The acquired data were statistically evaluated, graphically displayed, and interpreted. The results of physical measurements showed that some parameters were characterized by stable development, which indicates some constant conditions in the well. Other observed physical properties as well as variations in chemical and isotopic composition displayed changes over time, which were partly interpreted as typical seasonal changes and partly as anomalies.

Keywords: *drill hole; hydrogeochemistry; isotopic composition; seasonal changes*

Úvod a formulácia cieľa

Hydrogeologický vrt HV1k sa nachádza v areáli Přírodovědeckej fakulty Masarykovej univerzity a bol vybudovaný v roku 2017. Vrt bol inštalovaný pre potreby výuky, a to najmä pre vykonávanie čerpacích skúšok, realizovanie hydrometrických meraní a pre potreby výuky analytických metód.

Výskumným cieľom práce bolo sledovanie fyzikálnych, chemických a izotopových vlastností podzemnej vody vo vrte počas jedného kalendárneho roka. Získané dáta boli štatisticky a graficky spracované a následne interpretované s ohľadom na preštudovanú literatúru.

Materiál a metódy

Základným pilierom pre všetky analýzy bol pravidelný odber vzoriek podzemnej vody z vrtu HV1k v približne mesačných intervaloch od apríla 2020 do marca 2021. Pred každým odberom bola zmeraná hĺbka vodnej hladiny od pažnice vrtu ručným hladinomerom. Po zmeraní hladiny bola z vrtu odobratá vzorka vody, na ktorej boli zmerané hodnoty teploty podzemnej vody, pH a konduktivity pomocou prístrojov Greisinger G 7500, alebo WTW multi 332. Následne bola meraná hodnota oxidačno-redukčného potenciálu, a to pomocou prístroja WTW pH 330i spolu s elektródou SenTix ORP.

Po odbere bola časť vzorky vody v priehľadnej popísanej plastovej nádobe odovzdaná

na chemickú analýzu do laboratórií Ústavu geologických vied PŕF MU, kde boli stanovené koncentrácie iónov vo vode. Obsahy dusičnanov a chloridov boli stanovované spektrofotometricky, sírany gravimetricky a koncentrácie katiónov (sodíku, draslíku, vápniku a horčíku) boli stanovené metódou atómovej absorpčnej spektrometrie (AAS).

Ďalšia časť vzorky vody bola v priehľadnej popísanej plastovej nádobe zaslaná do externého laboratória ČGS v Prahe pre vykonanie izotopovej analýzy. V laboratóriu ČGS boli obsahy izotopov D a ^{18}O stanovené pomocou prístroja LWIA (Laser water isotope analyser).

Získané dáta boli štatisticky a graficky spracované v programoch MS Excel a Geochemist's Workbench. Všetky namerané dáta boli uvedené s presnosťou na dve smerodajné odchýlky. V programe MS Excel boli štatisticky a graficky vyhodnotené zmeny vo vývoji chemického a izotopového zloženia vody a taktiež vývoj fyzikálnych parametrov vody v čase. Zároveň boli v tomto programe vykonané korelácie rôznych meraných parametrov.

Dáta z chemickej analýzy podzemnej vody boli tiež porovnané s vyhláškou č. 252/2004 Sb., ktorá stanovuje hygienické požiadavky na pitnú a teplú vodu a frekvenciu a rozsah kontroly pitnej vody.

Výsledky a diskusia

Výsledky práce je podľa typu analyzovaných parametrov možné rozdeliť do troch skupín, a to na výsledky merania výšky hladiny a fyzikálnych vlastností vody, výsledky chemickej analýzy a výsledky analýzy izotopového zloženia.

Namerané hodnoty hĺbky hladiny podzemnej vody boli prepočítané na hodnoty výšky hladiny vody vo vrte. Priemerná hodnota výšky vodnej hladiny bola $50,05 \pm 0,32$ m. Variabilita bola stanovená koeficientom variácie na 0,32 %. Pri pozorovaní výšky vodnej hladiny počas roka sa očakávajú dve zvýšenia hladiny podzemnej vody – výraznejšie v jarnom období a menšie v jesennom. Vývoj, ktorý bol pozorovaný u vrtu HV1k nezodpovedá typickému kolísaniu hladiny podzemnej vody počas roka. Najvyššie namerané hodnoty výšky hladiny boli zaznamenané v lete a na jeseň. Je pravdepodobné, že tento netypický vývoj hĺbky vodnej hladiny bol spôsobený nadpriemernou zrážkovou činnosťou v letnom a jesennom období roku 2020 oproti predchádzajúcim rokom [1].

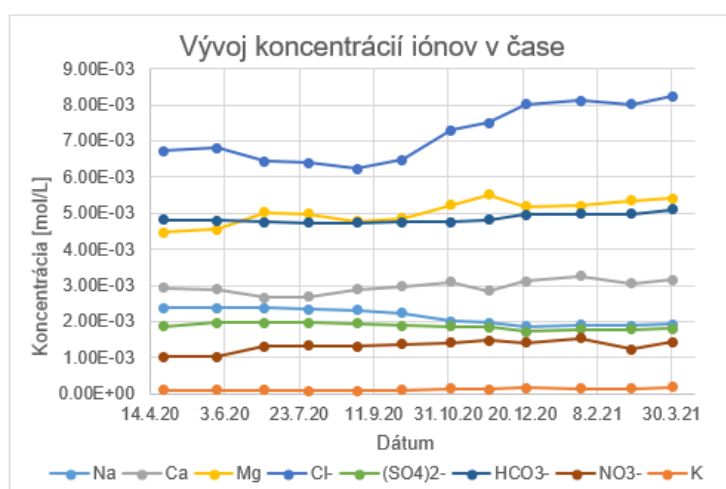
Vývoj teploty podzemnej vody zaznamenáva počas roka pomerne veľké zmeny – rozpätie nameraných teplôt dosiahlo až 10 stupňov, čomu zodpovedá aj pomerne vysoký koeficient variácie s hodnotou 16,85 %. Priemerná nameraná hodnota teploty podzemnej vody bola $14,72 \pm 4,96$ °C. Vo všeobecnosti boli najvyššie teploty podzemnej vody namerané v

teplých letných mesiacoch, odkedy hodnoty klesali na minimum v zimnom období. V marci 2021 teplota podzemnej vody znovu stúpala. Podľa Pittera [2] by sa denné zmeny teploty pod zemou mali prejavovať len do hĺbky cca 0,5 m až 1 m. V hĺbke 20 až 30 m by už mala byť teplota pomerne konštantná a mala by narastať s hĺbkou v závislosti na geotermickom stupni. Väčšie kolísanie teploty teda pravdepodobne svedčí o rýchlom prenikaní povrchových, či atmosférických vôd do podzemia.

Hodnoty pH boli v priebehu roka pomerne stabilné a pohybovali sa v rozmedzí od 7,17 do 7,43. Priemerná hodnota pH bola $7,33 \pm 0,14$. Koeficient variácie zodpovedal stabilite pH – jeho hodnota dosiahla 0,95 %. Vývoj pH nevykazuje sezónne výkyvy, či trendy. Hodnota pH spĺňa limit vyhlášky č. 252/2004 Sb pre pitnú vodu [3].

Namerané hodnoty oxidačno-redukčného potenciálu boli prepočítané na štandardnú vodíkovú elektródu (Eh). Priemerná nameraná hodnota bola $440,80 \pm 28,7$ mV. Variačný koeficient bol pomerne nízky – dosiahol hodnotu 3,26 %, čo poukazuje na to, že prostredie je oxidačné a oxidačno-redukčné podmienky vo zvodni sú pomerne stále. Podobne ako v prípade pH, ani hodnoty Eh nevykazujú výrazné sezónne zmeny ani trendy.

Priemerná nameraná hodnota konduktivity podzemnej vody bola $1642,75 \pm 177,40$ $\mu\text{S/cm}$. Hodnota koeficientu variácie bola 5,40 %. Namerané hodnoty konduktivity presiahli limit daný vyhláškou č. 252/2004 Sb. pre pitnú vodu [3], čo súhlasí aj s celkovým vysokým obsahom rozpustených látok vo vode. Hodnoty konduktivity podzemnej vody vykazujú mierne sezónne výkyvy – v letnom období boli namerané hodnoty nižšie, než v zimnom. Tento vývoj dobre korešponduje aj so zistenou negatívnou koreláciou medzi nameranými hodnotami konduktivity a teploty podzemnej vody, ktorej hodnota bola -0,61.



Obr. 1. Graf vývoja koncentrácií iónov v podzemnej vode čase

Graf na Obr. 1 sleduje vývoj koncentrácií skúmaných iónov v podzemnej vode v čase. U vývoja koncentrácií chloridov je možné pozorovať nárast v zimnom období oproti obdobiu letnému, čo poukazuje na to, že v zimných mesiacoch mohli byť chloridy dopĺňané z dodatočného zdroja. Mohlo by ísť o znečistenie, napríklad z posypovej soli na cestách [4].

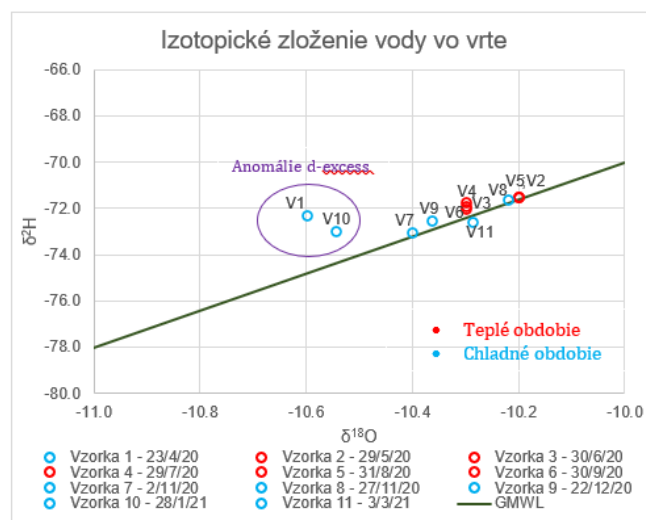
Koncentrácia sodíka v podzemnej vode síce takýto vývoj nevykazuje, na rozdiel od chloridov však sodík nie je konzervatívny prvok a je možné, že sa pri infiltrácii do zvodne môže substituovať s inými prvkami v rámci procesu sorpcie v ílovitom prostredí [5], napríklad s horčíkom, vápnikom, či draslíkom, čo by potvrdzovali aj vysoké negatívne hodnoty korelačných koeficientov týchto prvkov so sodíkom. Naopak pozitívne koreluje vývoj sodíka s vývojom síranov, čo by mohlo poukazovať na nejaký ich ďalší spoločný zdroj.

Zaujímavý je aj inverzný vývoj koncentrácie vápnika a horčíka v podzemnej vode. Hoci oba katióny vykazujú stúpavý trend, je medzi nimi jasne vidieť vzťah, ktorý sa prejavuje ako silná korelácia v odchýlkach o línie trendu – hodnota korelačného koeficientu bola 0,67. Tento vývoj by mohol poukazovať na procesy iónovej výmeny.

Koncentrácie iónov zistených v rámci chemickej analýzy boli porovnané s vyhláškou č. 252/2004 Sb. [3], ktorá stanovuje hygienické požiadavky na pitnú a teplú vodu a frekvencia a rozsah kontroly pitnej vody. Porovnanie ukázalo, že voda z vrtu HV1k prekračuje väčšinu limitných hodnôt daných vyhláškou – konkrétne presahuje limitné hodnoty pre koncentrácie vápniku, horčíku, chloridov a dusičnanov. Naopak v limit splnili koncentrácie sodíku a síranov.

Vysoký obsah dusičnanov je pravdepodobne výsledkom kontaminácie podzemnej vody odpadovými vodami, prípadne môžu dusičnany pochádzať z povrchových splachov, čo podporuje aj najvyššia kladná korelácia s výškou hladiny vody zo všetkých analyzovaných iónov (0,54).

Analýza izotopového zloženia sleduje ochudobnenie vody o ťažké izotopy kyslíku ^{18}O a deutéria oproti štandardu VSMOW. Namerané hodnoty ochudobnenia vody o izotop deutéria sa pohybovali v intervale od -73,0 do -71,5 ‰. Hodnoty ochudobnenia vody o ťažký izotop ^{18}O sa pohybovali v rozmedzí od -10,6 do -10,2 ‰.



Obr. 2. Graf zobrazujúci izotopové zloženie vody vo vrte HV1k

Grafické spracovanie výsledkov (Obr. 2) ukazuje, že rozsah nameraných hodnôt je pomerne malý, čo je spôsobené čiastočne tým, že zrážková voda prechádza pri infiltrácii do zvodne procesom disperzie, ktorý znižuje variabilitu izotopového zloženia podzemnej vody oproti vode atmosférickej. Zároveň by to mohlo byť spôsobené tým, že sledovaná zvodňa môže byť potenciálne súčasťou hlbšieho systému podzemných vôd, kde môže na izotopové zloženie vplývať proces miešania rôzne starých vôd [6]. Napriek nízkej variabilite je však v grafe stále viditeľná sezónnosť, pretože aj po infiltrácii vody do podzemia stále zostáva zachovaný princíp Rayleigha frakcionácie, ktorá zapríčiňuje typické izotopové zloženie zrážkových vôd.

Vzorky z meraní od mája do septembra 2020 vykazujú vo všeobecnosti ťažšie izotopické zloženie, ostatné vzorky reprezentujúce chladné mesiace boli naopak izotopicky ľahšie, teda viac ochudobnené o ťažšie izotopy D a ^{18}O . Takéto rozloženie izotopového zloženia vody v čase zodpovedá štandardnému vývoju izotopového zloženia zrážok počas roka v miernom pásme [6].

Dve anomálie sa objavili u vzoriek z apríla a januára, ktoré vykazujú vyššie hodnoty deuterium – excess. D-excess odráža najmä podmienky, pri ktorých prebiehal primárny výpar vody do atmosféry. Jeho výkyvy môžu poukazovať na iný zdroj zrážkovej vody infiltrovanej do zvodne - môže sa jednať o lokálne zdroje ako povrchové toky, jazerá, či sneh [6].

Záver

Cieľom tejto práce bolo charakterizovať sezónny vývoj vybraných hydrogeochemických parametrov vody vo vrte HV1k, nachádzajúceho sa v areáli Prírodovedeckej fakulty MU v Brne. Tieto parametre zahŕňali hĺbku hladiny, teplotu vody,

hodnoty pH a oxidačno-redukčného potenciálu, konduktivitu, koncentrácie rozpustených látok a izotopické zloženie vody.

Merania fyzikálnych parametrov vykazovali rôzny vývoj – pH a oxidačno-redukčný potenciál vykazovali stabilný vývoj, čo poukazuje na stále podmienky vo vrte, ktoré tieto parametre ovplyvňovali. Naopak výška hladiny, teplota, či konduktivita vykazovali zmeny v čase, ktoré boli čiastočne interpretované ako sezónne zmeny a čiastočne ako anomálie.

Analýza chemického zloženia poukázala na necyklický vývoj koncentrácie viacerých sledovaných iónov v podzemnej vode. Vývoj koncentrácie chloridov, vápnika, horčíka i draslíka v podzemnej vode ukázal počas obdobia merania ich nárast, čo mohlo poukazovať na externé zdroje. Okrem toho boli zaznamenané silné korelácie medzi vývojmí koncentrácie niektorých iónov v podzemnej vode, napríklad medzi vápnikom a horčíkom, ktoré ukazujú, že sa tieto ióny spoločne zúčastňujú na chemických procesoch napríklad pri iónovej výmene.

Izotopová analýza ukázala, že hoci variabilita izotopového zloženia vody počas roka bola pomerne nízka, stále zostal zachovaný princíp sezónnych zmien izotopového zloženia zrážkovej vody počas roka v kontinentálnom prostredí mierneho pásma. Boli zaznamenané aj anomálne merania, ktoré mohli byť spôsobené miešaním atmosférických, či podzemných vôd v sledovanej oblasti.

Práca úspešne zdokumentovala hydrogeochemické vlastnosti vrtu HV1k v sledovanom období. Na výskum by v budúcnosti bolo možné nadviazať ďalšími meraniami pre dlhodobejšie vyhodnotenie vývoja parametrov a lepšie pochopenie zachytených anomálií.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Český hydrometeorologický ústav [Citované: 05. máj 2021]
<<https://www.chmi.cz/historicka-data/pocasi/mesicni-data/mesicni-prehledy-pozorovani#>>
- [2] Pitter P. (2015) Hydrochemie. 5 vydanie. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, p. 37
- [3] Vyhláška č. 252/2004 Sb. Vyhláška, kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody
- [4] Pitter P. (2015) Hydrochemie. 5 vydanie. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, p. 246
- [5] Appelo C. A. J., Postma D. (2005) Geochemistry, groundwater and pollution. A. A. Balkema Publishers, Leiden, p. 241
- [6] Clark I. (2015) Groundwater Geochemistry and Isotopes. CRC Press, Boca Raton, p. 131

Description of a paleoecological environment from the new mollusca rich Middle Miocene locality at Dúbravská Hlavica hill

Theodor Horváth, Nathaniel Abraham, Tália Chabanová, Štefan Mészároš, Andrej Ruman, Natália Hudáčková

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra geológie a paleontológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; horvath223@uniba.sk

Abstract

An unknown species of Pectinidae family molluscs was discovered in a previously unnamed location behind Dúbravská Hlavica, at the foothills of Malé Karpaty mountains, part of the eastern Vienna Basin in the urban area of Bratislava, Slovakia. The findings consist of only a handful of smaller fossils with the distinct shape of a common scallop, belonging to a Bivalvia class of mollusca. The shallow sea environment of sea meadows was documented by findings of shells of normal marine foraminifera.

Keywords: *Pectens; Foraminifera; Badenian; Dúbravská Hlavica; Malé Karpaty Mts.*

Introduction and Objectives

As part of the subject „*Metódy paleontologického výskumu*“, we needed to describe an outcrop with suitable conditions for the remnants of marine life. We have visited a newly opened locality within the woods behind Dúbravská Hlavica and decided to name it Mészároš locality (Coordinates: 48°10'48''N, 17°0'27''E). The locality, as we discovered, contains fossil remains of fish bones, pieces of a turtle shell and near-perfectly preserved pecten scallops. The studied area is situated in the eastern marginal part of the Vienna Basin at the foothills of the Malé Karpaty Mts. in the Bratislava urban area (Slovakia). On Devínska Kobyla hill numerous outcrops with Miocene marine and non-marine sediments are situated (Fig. 1). Localities in the vicinity of Devínska Kobyla are well known, rich in fossils of vertebrates and invertebrates. Historically, fossils were described by [1, 2, 3, 4, 5, 6]. Our goal of this work is to determine and describe the paleoecological environment, based on fossils and sediments within the location in which the mentioned organisms thrived.

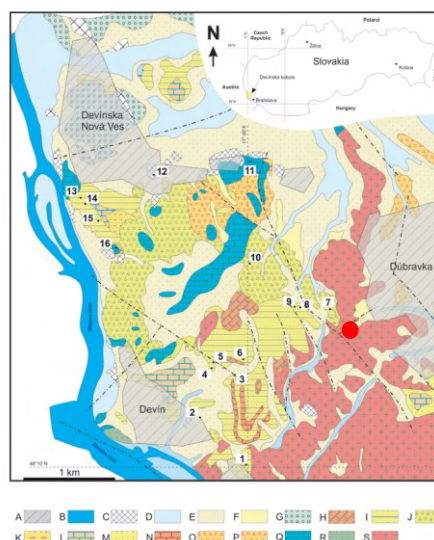


Fig. 1. Location of the locality marked by a red circle, edited according to [6] , Legend: A – urbanized area; B – rivers; C – anthropogeneous deposits and dumps (Holocene); D – fluvial sediments (Holocene); E – deluvial, fluvial and proluvial sediments (Pleistocene–Holocene); F – loess (Upper Pleistocene); G – fluvial sediments (Middle Pleistocene); H – bryozoan-serpulid limestones of the Holíč Fm (Lower Sarmatian); I – sands with sandstone beds of the Sandberg Mb (Upper Badenian); J – breccias and conglomerates of the Sandberg Mb; K – aleurites and clays of the Sandberg Mb; L – corallinacean limestones of the Sandberg Mb; M – conglomerates and gravel of the Sandberg Mb; N – corallinacean limestone of the Jakubov Fm (Middle Badenian); O – breccias and gravel of the Devínska Nová Ves Fm (Middle Badenian); P – breccias of the Špačince Fm (Middle Badenian); Q – carbonates and conglomerates (Mesozoic); R – conglomerates (Palaeozoic); S – granitoids and metamorphites (Palaeozoic).

Material and methods

We used basic excavation tools in the form of paleontological hammers, measuring tape and plastic bags, while using pens/pencils and notebooks to have a better description of the terrain's profile. The pecten fossils were located in the rocks surrounding the hike road at the location. By using the hammer, we had to make sure to carefully remove the fossils from the rocks with minimal damage. We proved the presence of calcereous microfossil shells by using HCl solution (3%). To ensure their safe preservation, we wrapped them in plastic bags. Since the fossils were discovered in a layer of hardened sandstone, each individual weighing approximately 300 – 600 g, we could determine the location was possibly part of a sea coastline. To complete information about paleoecology, we took a microfossil sample. After drying the sample, we macerated it in H₂O₂ (3%), then acquired the microfossils by washing them on a mesh with a 0,071 and 1mm diameter eyes. We used a Zeiss 650SM binocular magnifying glass to observe the microfossils and documented them using an electron microscope QUANTA FEG 250 (Fig. 2 A-F). Molluscs were documented by using a digital photo camera Canon EOS 2000D (Fig. 2 G-K).

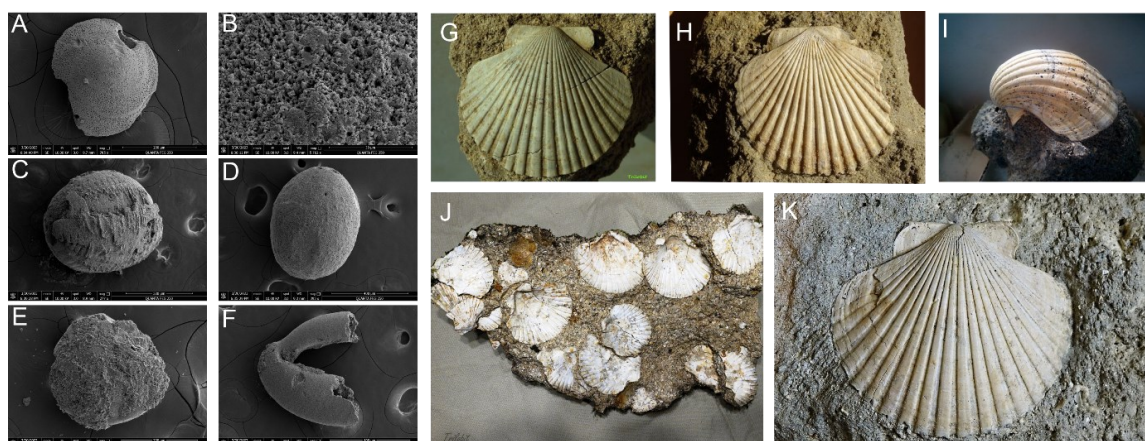


Fig. 2. Foraminifera from the Meszároš locality (A. *Biasterigerinata* sp., B. recrystalization of the test, C. *Borelis* sp., D. *Globulina* sp., E. *Biasterigerina* sp., F. dissolution of test, miliolide species (SEM photo operator Dr. Kostič), G-K Pectenids from the localities original size-G, H, I – ca 6 cm, J - 28 cm in length sample. (photo Meszároš)

Results and discussion

The locality consists of several outcrops, all of which are located in one ditch within the forest.

The richest visited locality is situated on the southeast slope of Devínská Kobyla hill, ca. 700m southwest from the Dubravská hlavica (48°10'48"N; 17°0'27"E). Several outcrops in the ditch consist of coarse to fine-grained, marine, Middle Miocene (Badenian), sediments of the Sudienka Fm. (Fig. 3.). The examined outcrop that was ca. 2 m in height starting with the 20 cm thick layer of very coarse-grained conglomerate (cobbles up to 25 cm). The following interval 20 - 70 cm is characterised by alternation of very fine-grained and fine-grained sandstones. Upwards (70 cm - 190 cm) follows a very fine-grained sandstone body, which is interrupted by ca. 10 cm coarse-grained sandstone. The upper part of the outcrop is formed by a 10 cm slope of debris followed by forest soil.

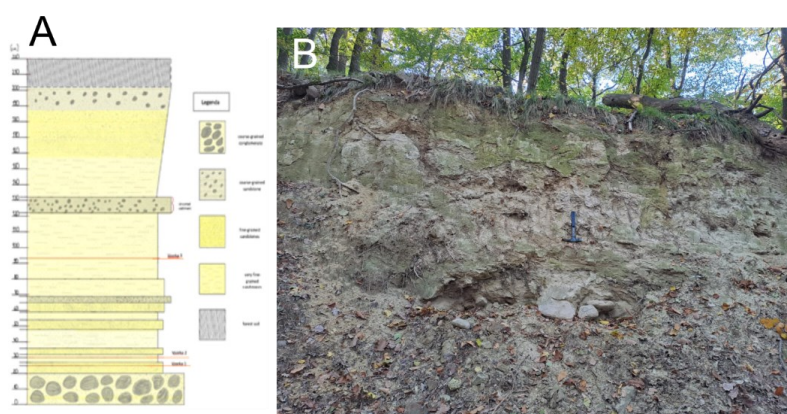


Fig. 3. A. Lithological profile of a studied location (by Chabanová 2023), B. Photo by Abraham (2022).

Most of the obtained fossil samples were acquired from the scree, possibly derived from the lowermost part of the profile or even below - from the layers currently covered by a coat of debris and soil on the bottom of the ditch (below the depicted profile on (Fig.3). Decalcified moulds of fossil molluscs (e.g., *Thracia* sp.) and mollusc shells (*Turritella*, *Anadara*, *Cubitostrea*, *Cardites*, *Linga*) mainly, of pectinid bivalves (*Flabellipecten*) are common in the area. Besides a turtle shell fragment, a tooth (*Sparidae* indet.) a fish bone and ichnofossils were also found. 25 pectenid shell fossils we obtained (Subfamily Chlamydinae von Teppner, 1922) will be described in more detail in a future work.

Pectenids, like many other members of the Bivalvia class, lived mainly with a minimal amount of autonomy, relying on water currents as a form of transportation. Usually found in the depressions of the shallow muddy or sandy gravel seabed [5]. Their stratigraphical relevance was elucidated by many authors [7]. Our association with *Pecten aduncus*, *Flabellipecten besseri*, a species close to *Flabellipecten leythajanus* points out Badenian age of studied sediments.

In the washed residuum the tests of Foraminifera were abundant. Preservation of the test is poor, the signs of dissolution and recrystallization are visible (Fig. 2). Association of foraminifera, like preservation of their shells, is similar to the published ones [7, 8]. In the foraminifera association, the *Biasterigerina*, *Elphidium*, *Borelis* and *Globulina* genera are most prominent (Fig. 2). They live in shallows near the patch reefs and are able to handle changes in salinity. The presence of sea meadow proves high abundance of *Biasterigerina* and *Elphidium* genera in the studied samples.

Our findings confirm that during the Miocene the semi-enclosed Paratethys sea was in the area of the Vienna Basin sprinkled by an archipelago/islands which were a part of the Carpathian arc [9]. The area of Devínska Kobyla hill was an island as proven by finds of fossil terrestrial life forms [3, 4]. Terrestrial organisms were probably living in the shallow sea, and got washed up on the shores after dying, where they fossilized in large amounts. Currents and waves of this shallow sea bay [10] piled up the shells of the dead pectenids after dying, where they fossilized in large amounts, leaving a plentiful amount of fossil scallops to be found and examined. Based on other papers [3, 4] and the findings of our pectenids and foraminifers, we can say that the environment was shallow marine with normal salinity.

Based on the comparisons we made at the Naturhistorisches Museum Vienna, Slovenské Národné museum Bratislava and Dúbravské museum and source literature [2, 7, 8, 11, 12] with the species that were found near Meszároš locality (i.e. *Pecten aduncus*, *Flabellipecten besseri*, *Flabellipecten leythajanus*), we were able to determine similarities with

other shallow ecosystems [7, 8, 11, 12] in the Central Paratethys during the Miocene epoch.

Conclusion

By this discovery, we can determine the Meszároš location was once part of the Badenian shallow subtropical sea, based on the sediment type and composition in which the fossils were found. Both marine vertebrates and invertebrates could thrive in a warm environment.

It's still too soon to determine how many species of pectens coexisted in the Meszároš location only from the shape and size of various scallops. However, similar locations around Europe could lead to a theory of even larger variety than we initially thought.

Acknowledgement

A very special thank you to Dr. Barbara Studencka, who helped with the making of this publication and determined a part of the pectenide material and to Dr. Kostič from Slovak Academy of Sciences for help with SEM images. The authors would express their gratitude for financial support to APVV-20-0079, VEGA 2/0013/20 and 037UK-4/2019 projects.

References

- [1] Zapfe H. (1950) Sitzungsab. Osterr. Akad. Wiss. Math. Naturwiss. Klasse. 159(51-64) p. 109
- [2] Cícha I., Fahlbusch V., Fejfar O. (1972) Neu. Jb. Geol. Paläont. Abh. 140(2) p. 129
- [3] Holec P., Sabol M. (1996) Min. Slovaca 28(6), p. 519
- [4] Holec P. (2005) Geológia a paleontológia Devínskej Kobyly. In: Feráková V. and Kocianová E. (eds.) Flóra, geológia a paleontológia Devínskej Kobyly Bratislava, Litera, p. 11
- [5] The Marine Life Information Network; [Cited: March 25, 2023] <<https://www.marlin.ac.uk/species/detail/1398>>
- [6] Hyžný M., Hudáčková N., Biskupič R., et al. (2012) AGEOS, 4(2), p. 95
- [7] Mandić O. (2004) Geol. Carpathica 55(2), p. 129
- [8] Pivko D., Hudáčková N., Hrabovský J., et al. (2017) Geol. Quart., 61(3), p. 549
- [9] Kováč M., Hudáčková N., Halássová E., et al. (2017) AGEOS, 9(2), p. 75
- [10] Švagrovský J. (1981) Záp. Kar. s. Pal. 7, p. 5
- [11] Studencka B., Jasionowski M. (2011) Acta Geol. Pol. 61(1), p. 79
- [12] Studencka B., Studencki W. (1988) Acta Geol. Pol. 38(1/4), p. 2

Geomagnetická aktivita pozorovaná v Hurbanove magnetometrom PSM-8711 so záznamníkom LB-480

Eduard Koči^{1,2}, Magdaléna Váczyová¹

¹Ústav vied o Zemi Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Komárňanská 108, 947 01 Hurbanovo, Slovenská republika; eduard.koci@suh.sk

²Slovenská ústredná hviezdáreň, Komárňanská 137, 947 01 Hurbanovo, Slovenská republika

Abstract

Geomagnetic activity observed in Hurbanovo with magnetometer PSM-8711 with recorder LB-480

The approaching maximum of the Solar Cycle 25 also brings increased geomagnetic activity, which we recorded using the LB-480 recording device connected to the Bobrov-type magnetometer PMS-8711. We present the record of the most violent variation of the geomagnetic field registered by this set, using it to refine its bases and sensitivities as well as the bases' drift over the year due to temperature changes. We are trying to connect the cause of the detected geomagnetic storm with the observations of the LASCO coronagraph.

Keywords: *geomagnetic observatory; geomagnetic activity; recording device; magnetogram*

Úvod

Jedenásťročný cyklus slnečnej aktivity sa blíži k svojmu vrcholu. Podľa Lu a kol. [1] by maximum 25. slnečného cyklu malo pripadať na koniec roka 2024. To súvisí so zvýšenou geomagnetickou aktivitou [2]. Túto zvýšenú geomagnetickú aktivitu sa nám podarilo zaznamenať aj na geomagnetickom observatóriu v Hurbanove pomocou nového záznamového zariadenia LB-480 napojeného na starší magnetometer PSM-8711 typu Bobrov.

V tomto článku bližšie popíšeme pozorovanie tejto aktivity, konkrétne variácie z 27. februára 2023, teda zatiaľ najväčšej variácie zachytenej našou zostavou a jej využitie pre spracovanie údajov z tejto zostavy, ako sú citlivosti, bázy a posun bázy zostavy vplyvom zmien teploty v priebehu roka. Zaznamenané porušenie geomagnetického poľa sme pokúsili vysvetliť konkrétnymi výronmi koronálnej hmoty pozorovanými koronografom LASCO.

Popis jednotlivých zariadení

Ako záznamové zariadenie sme použili LB-480 poľskej výroby od firmy LAB-EL, ktoré je určené na zaznamenávanie rôznych druhov analógových i digitálnych signálov. Zariadenie sme nastavili na zaznamenávanie napätia v dielikoch (0 V = 0 dielikov, 10 V = 1000 dielikov), využívajúc tak maximálny rozsah (0 – 10 V) a citlivosť zariadenia (0,01 V). Períodu záznamu sme stanovili na 5 s. Do prístroja boli výrobcom vmontované dva moduly, a to GPS aj s anténou, ktorý sme využili na zaznamenávanie časovej značky, a modul s portom RS-485,

pričom je doň možné vložiť celkovo až tri moduly. Zariadenie zaznamenáva aj vlastnú vnútornú teplotu zaokrúhlenú na $0,5^{\circ}\text{C}$. Do zariadenia je možné doplniť napr. aj moduly, ktoré zaznamenávajú presnejšie napätie (LB-499-ADC; $-10,5 - 10,5 \text{ V}$; 6 kanálov; 24 bitov pri perióde záznamu 1 s) [3] či teplotu (LB-499-PT; rozsah: $-200 - 850^{\circ}\text{C}$; 3/6 kanálov; s presnosťou $0,001^{\circ}\text{C}$ pri perióde záznamu 10 s) [4]. LB-480 záznam sa ukladá na kartu SD, prístupujeme k nemu cez vnútornú počítačovú sieť observatória.

Ako meracie zariadenie sme použili torzný fotoelektrický magnetometer Bobrovho typu PSM-8711 [5] umiestnený v tzv. Starom variačnom pavilóne (postavenom v r. 1898). Jeho základom sú magnetky upevnené na kremenných vláknach torziou vyvažujúce moment sily pôsobiaci na magnetky. Zariadenie je určené na meranie troch na seba kolmých zložiek geomagnetického poľa, konkrétne je orientované tak, aby meralo zložky X (severná), Y (východná) a Z (vertikálna). Výstupom je analógový signál – napätie od -10 V do $+10 \text{ V}$, pričom sú nastaviteľné tri stupne výrobcom udávanej citlivosti (2, 20, 200 mV/nT) [6]. Výstupy zariadenia sme nastavili na 20 mV/nT, takže hodnota jedného dielika na LB-480 by mala mať veľkosť 0,5 nT. Rozsah tejto zostavy by v každej zložke mal byť 500 nT.

Keďže na zložke X očakávame okrem náhleho začiatku geomagnetickej búrky (SSC) a tzv. zálivovej poruchy, ktorá je kladná, najmä pokles, nastavili sme PSM-8711 tak, že báza zložky X je približne na 8 V. Bázy Y a Z sú približne v strede meracieho rozsahu LB-480. Zariadenie sme teda nastavili tak, že by pre Hurbanovskú šírku malo byť schopné zaznamenať geomagnetickú aktivitu až do K indexu 7 ($>170 \text{ nT}$), nanajvýš 8 ($>250 \text{ nT}$). Spodná hodnota pre geomagnetickú aktivitu K indexu 9 pre Hurbanovo je variácia o 420 nT [7].

Extrémna búrka podobná tej, ktorá sa vyskytla na konci októbra 2003, počas ktorej bol pokles geomagnetického poľa v Hurbanove o viac ako 600 nT [8], by našu aparatúru pri tomto nastavení priviedla mimo merací rozsah. Ten sme porovnávali s kvázilogaritmickým trojhodinovým indexom K, ktorý ako prvý poskytol objektívne kvantifikovanie porušenia geomagnetického poľa, pričom dodnes je široko používaný. Veľkosť variácie pre jeho hodnoty (0 – 9) sa vypočítavajú pomerne zložitou štatistickou procedúrou [9], pričom závisia najmä od geomagnetickej šírky observatória. Nižšia hodnota indexu K znamená menšie porušenie geomagnetického poľa, vyššia naopak.

Zostava s vyššie opísanými nastaveniami je, s výnimkou niekoľkých výpadkov v dodávke elektrického prúdu v septembri a v októbri 2022, v prevádzke nepretržite od 6. februára 2022.

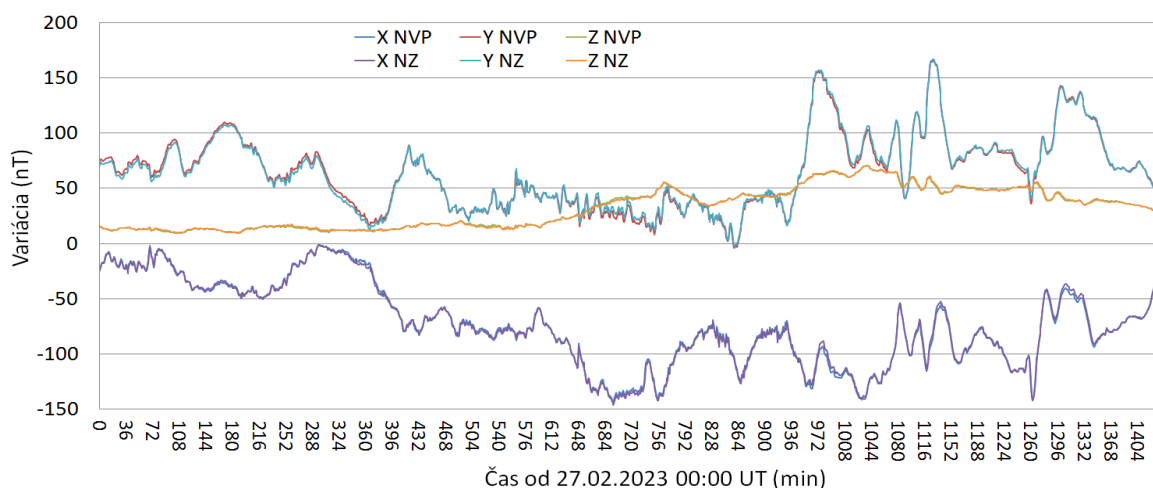
Spracovanie nameraných hodnôt

Údaje zaznamenané LB-480 (napätie v dielikoch a teplotu) sme filtrovali minútovým Gaussovým filtrom s koeficientmi podľa manuálu organizácie INTERMAGNET [10]. Našou úlohou bolo porovnávaním s údajmi variačnej stanice TPM (torzný fotoelektrický magnetometer) umiestnenej v tzv. Novom variačnom pavilóne overiť výrobcom udávané citlivosti a zistiť hodnoty báz zostavy, ako aj zmenu báz vplyvom zmeny teploty v priebehu roka.

Citlivosti zostavy sme sa rozhodli vypočítať z najväčších variácií, ktoré boli touto zostavou zaznamenané. Využili sme teda údaje z 27. februára 2023 ($K_p = 7_-$ až počas trojhodinových úsekov [11]), ktoré sme porovnávali s variáciami zaznamenanými spomínanou stanicou TPM. K porovnaniu sme použili viacero [16, resp. 8 a 11 pre zložku X, resp. Y a Z] vybraných variácií, ktoré boli v zložke X väčšie ako 40 nT, v zložke Y väčšie ako 30 nT a zložke Z, na ktorej bola variácia najmenšia, väčšie ako 10 nT. Okrem toho sme záznamy porovnali aj pomocou metódy najmenších štvorcov (MNS). Zistili sme, že hodnota jedného dielika na zložke X je výrazne nižšia, ako sme predpokladali. Preto aj rozsah na tejto zložke je približne iba 383 nT. Výsledky sú uvedené v tabuľke 1.

Tab. 1. Citlivosti zostavy

	X	Y	Z
Citlivosť z veľkých variácií (nT/dielik)	0,38297	0,49951	0,49557
Štandardná odchýlka (nT/dielik)	0,01352	0,01428	0,01626
Citlivosť vypočítaná pomocou MNS (nT/dielik)	0,38268	0,50116	0,49493
Štandardná odchýlka (nT/dielik)	0,00053	0,00010	0,00050
Korelačný koeficient	0,99725	0,99431	0,99853



Obr. 1. Graf variácií zaznamenaných našou zostavou (NZ) a TPM umiestneným v Novom variačnom pavilóne (NVP) 27. februára 2023

Variácie jednotlivých zložiek zaznamenané 27. februára 2023 našou zostavou (NZ) posunuté kvôli vizuálnemu porovnaniu tak, aby sa priemerné hodnoty kryli s variáciami zaznamenanými na TPM umiestnenom v tzv. Novom variačnom pavilóne (NVP), zobrazuje graf na obrázku 1.

Zmenu báz vplyvom teploty počas roka sme vypočítali porovnaním meraní v konkrétnom čase s absolútnymi meraniami geomagnetického poľa vykonávanými v tzv. Absolútnom pavilóne. Využili sme pritom citlivosti, ktoré sme vypočítali vyššie.

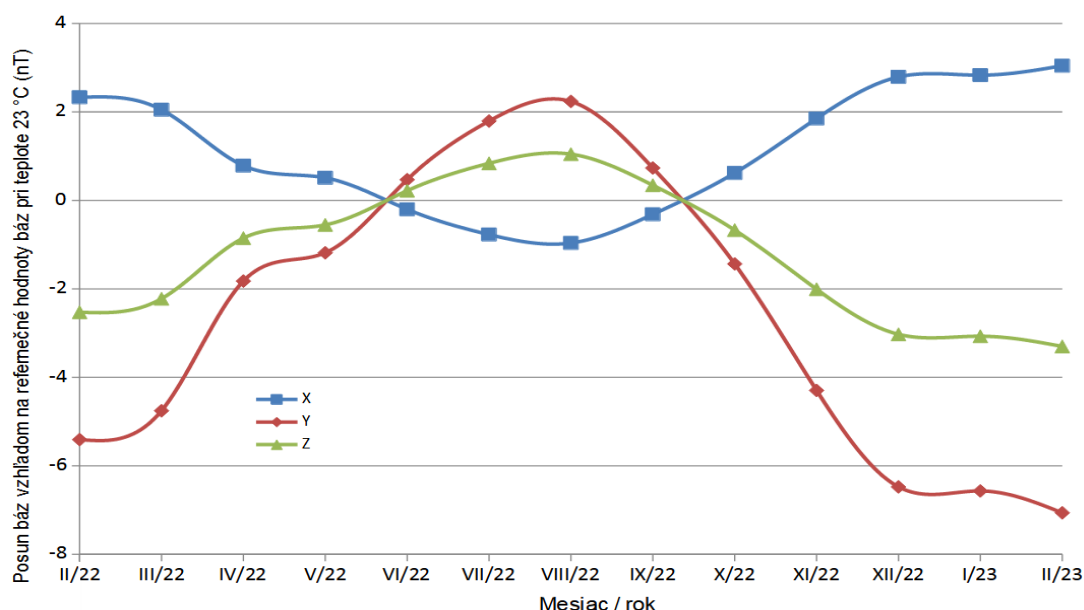
V miestnosti s prístrojom bol v júli umiestnený analógový teplomer, pričom z každého teplomeru v jednotlivých miestnostiach so zariadeniami je pravidelne odčítavaná teplota. Teploty na ňom odčítané boli v rozmedzí 8,2°C (feb. 2023) – 23,6°C (aug. 2022). Tieto sme porovnali so zaznamenávanou vnútornou teplotou zariadenia LBX-480, ktoré zaznamenalo teploty medzi 11,5°C (feb. 2023) a 27°C (aug. 2022). Porovnaním 89 zaznamenaných teplôt v konkrétnych minútach sme vypočítali, že teplota zaznamenaná zariadením je o $(3,31 \pm 0,31)^\circ\text{C}$ vyššia ako teplota zaznamenávaná analógovým teplomerom. Pomocou MNŠ sme vyčíslili, že zmena o 1°C na analógovom teplomere umiestnenom v miestnosti zodpovedá $(1,003 \pm 0,006)^\circ\text{C}$ na zariadení. Zistenie posunu bázy vplyvom teploty sme sa teda rozhodli vypočítavať z teploty zaznamenávanej prístrojom, keďže tie boli kontinuálne zaznamenávané od decembra 2021.

Na výpočet sme použili MNŠ, pomocou ktorej sme porovnali 28 absolútnych meraní zložiek poľa vykonaných v Absolútnom pavilóne s hodnotami zaznamenanými na LBX-480. Výsledky posunu báz jednotlivých zložiek vzhľadom na teplotu sú uvedené v tabuľke 2.

Tab. 2. Posun báz vzhľadom na teplotu a bázy zostavy pri 23°C

	X	Y	Z
Posun na zložke (nT/°C)	-0,293	0,681	0,318
Štandardná odchýlka (nT/°C)	0,077	0,097	0,046
Báza zostavy pri 23°C (nT)	20673,5	1655,3	43976,4
Chyba stanovenia bázy pri 23°C (nT)	1,4	2,2	1,1

Treba vziať do úvahy, že absolútne merania sú zaťažené chybou merania. Z jednotlivých hodnôt, ktoré sme použili pre stanovenie posunu báz, sme odčítali trend a pre stanovenie čo najpresnejších báz zostavy sme vybrali hodnotu, pri ktorej boli rozdiely všetkých troch zložiek oproti ich priemerom menšie ako 1 nT. Bolo to meranie vykonané 21. septembra 2022 o 05:38 UT, keď bola teplota zaznamenaná na LBX-480 23°C. Posun jednotlivých báz zostavy v priebehu roka znázorňuje graf na obrázku 2.



Obr. 2. Graf posunu variácií v priebehu roka vplyvom teploty

Do grafu sú vynesené približné posuny báz v jednotlivých mesiacoch od februára 2022 do februára 2023 vyčíslené ako funkcie priemernej teploty zaznamenatej zariadením v danom mesiaci. Časové značky reprezentujú stred mesiaca. Zobrazené sú krivky vyhladené metódou kubických splajnov.

Diskusia a záver

Geomagnetická aktivita zaznamenaná 27. februára 2023 bola pravdepodobne dôsledkom výronu korónálnej hmoty (CME) registrovaného v katalógu CACTUS (pozorovania koronografom LASCO) 25. februára 2023 so začiatkom o 20:00 UT, ktorého uhlová šírka bola až 352° a medián rýchlosti 919 km/s [12]. Keďže ale v tom čase bolo geomagnetické pole mierne porušené [13] a naše observatórium sa už nachádzalo na nočnej strane, kde je veľkosť tzv. háčika (Sfe; solar flare effect) podľa J. J. Curta [14] odvolávajúci sa na M. Oshia [15] oproti dennej strane približne rovný iba $1/10 - 1/20$, nepodarilo sa nám na našom zariadení Sfe zaznamenať. Nepodarilo sa nám ani jednoznačne náhly začiatok geomagnetickej búrky (SSC; sudden storm commencement) priradiť k tomuto CME, nakoľko o deň skôr (24. februára) boli zaznamenané ďalšie dve CME, uhlových širok 120° a 136° , ktorých rýchlosť bola menšia [16]. Tie tiež mohli byť potenciálnym zdrojom zvýšenej geomagnetickej aktivity 27. februára, pre ktorú bol K index rovný 6 ($>100 \text{ nT}$ pre Hurbanovo), konkrétne na zložke X takmer 150 nT a na zložke Y takmer 170 nT . Najprudšie variácie pritom začali okolo 16:00 UT, čo približne súhlasí s časom určeným z rýchlosti udávanej katalógom.

Treba podotknúť, že nami zistená citlivosť na zložke X je väčšia ako citlivosť udávaná v manuáli PSM-8711, preto bez jej zníženia dokážeme zaznamenať na zložke X pokles iba cca o 300 nT . Pre zväčšenie meracieho rozsahu a zvýšenie citlivosti by bolo najvhodnejšie vybaviť zariadenie LBX-480 analógovo-číslícovým prevodníkom LB-499-ADC, ktorý by pokrýval

celý rozsah výstupu magnetometra PSM-8711. V prípade, že by sme chceli spresniť aj záznam teploty, vhodný by bol modul LB-499-PT s pripojeným externým teplomerom.

PodĎakovanie

Táto práca bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied prostredníctvom grantu VEGA 2/0085/21.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Lu J. Y., Xiong Y. T., Zhao K., et al. (2022) *Astrophys. J.* 924(2), p. 1
- [2] Legrand J. P, Simon P. A. (1989) *Ann. Geophys.* 7, p. 565
- [3] LAB-EL [Citované: 6. marec 2023] <<https://www.label.pl/po/lb499-adc.html>>
- [4] LAB-EL [Citované: 6. marec 2023] <<https://www.label.pl/po/lb499-pt.html>>
- [5] Jankowski J., Marianiuk J., Ruta A., et al. (1984) *Geophys. Surv.* 6, p. 367
- [6] Portable Magnetic Station Type PSM-8711, Torsion Photoelectric Magnetometer, General description and manual instruction, Central Geophysical Observatory, Institute of Geophysics P.A.N., Belsk, [dátum vydania neznámy]
- [7] Valach F., Váczyová M., Revallo M. (2020) *J. Atmos. Sol.-Terr. Phys.* 137, p. 10
- [8] Valach F., Váczyová M. (2018) X. Medzinárodná vedecká konferencia Univerzity J. Selyeho, Komárno, zborník príspevkov, p. 78
- [9] Menvielle M., Berthelier A. (1991) *Rev. Geophys.*, 29(3), p. 415
- [10] St-Louis B. (Ed.) (2020) INTERMAGNET Operations Committee and Executive Council, INTERMAGNET Technical Reference Manual Version 5.0.0.
- [11] Matzka J., Stolle C., Yamazaki Y., et al. (2021) *Space Weather* 19(5), p. 1
- [12] CACTUS [Citované: 8. marec 2023]
<https://www.sidc.be/cactus/catalog/LASCO/2_5_0/qkl/2023/02/CME0176/CME.html>
- [13] Deutsches GeoForschungsZentrum GFZ [Citované: 8. marec 2023]
<https://kp.gfz-potsdam.de/app/files/Kp_ap_Ap_SN_F107_since_1932.txt>
- [14] Curto J. J. (2020) *J. Space Weather. Space Clim.* 10(27), p. 1
- [15] Ohshio M. (1964) *J. Radio Res. Lab.* 11(58), p. 377
- [16] CACTUS [Citované: 8. marec 2023]
<https://www.sidc.be/cactus/catalog/LASCO/2_5_0/qkl/2023/02/latestCMEs.html>

Deformačný záznam a tektonický vývoj v oblasti Nízkych Tatier na styku tatrika a veporika pozdĺž čertovického zlomu (Západné Karpaty)

Katarína Kriváňová, Rastislav Vojtko

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra geológie
a paleontológie, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
katarina.krivanova@gmail.com*

Abstract

Deformation record and revised tectonic evolution of the Nízke Tatry Mts. between the Tatric and Veporic units along the Čertovica Fault (Western Carpathians)

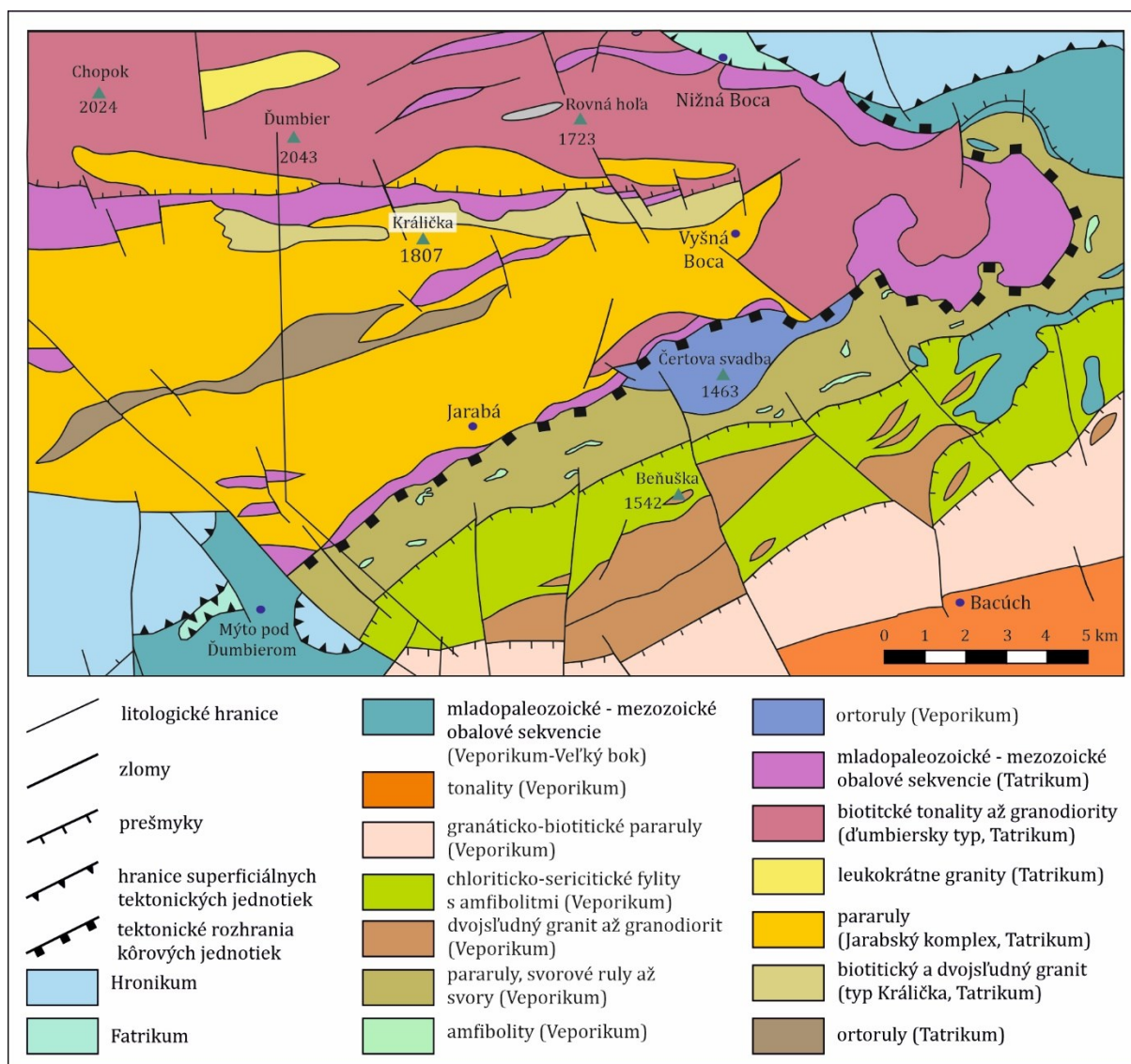
The Nízke Tatry Mts. are a mountain range in the Central part of the Western Carpathians. The studied area is located at the contact of the western Ďumbierske Tatry Mts. and the eastern Kráľovohoľské Tatry Mts. Two types of crystalline basements come into contact here, namely the Tatric and the Veporic tectonic Units. Their contact occurs along the Čertovica shear zone. The structure of crystalline basements was created by multi-stage deformation. Based on the structural analysis, it is possible to distinguish at least two orogenic cycles and deformation events - older Variscan and younger Alpine. The older group of deformations D^V , which were accompanied by the Variscan higher-grade metamorphism, is characterised by penetrative tectonic foliations such as schistosity and gneissic foliation that are closely connected with folds and lineations. The younger group of deformations D^A is featured by deformation structures of low-grade metamorphism, phyllitic foliations, S-C fabric and cataclasis.

Keywords: *Western Carpathians; Nízke Tatry Mts.; Variscan deformation; Alpine deformation*

Úvod a formulácia cieľa

Zaujmová oblasť sa nachádza v pohorí Nízkych Tatier, ktoré z orografického hľadiska začleňujeme do subprovincie vnútorných Západných Karpát. Nízke Tatry sú hlavným celkom, ktorý sa z geomorfologického, ako aj z geologického hľadiska ďalej člení na dva významné podcelky. Ich západná časť je označovaná ako Ďumbierske Tatry. Je tvorená tatrickým typom kryštalinika. Východnú časť označujeme ako Kráľovohoľské Tatry a je tvorená predovšetkým veporským typom kryštalinika [1]. Práve tým je študovaná oblasť tak výnimočná. Dochádza tu ku kontaktu dvoch typov kryštaliník, ktoré je možné pozorovať priamo na povrchu v oblasti medzi Mýtom pod Ďumbierom a Vyšnou Bocou (Obr.1). Geografická hranica, ako aj geologická sa približne zhoduje s čertovickým zlomom. Jedná sa o významnú zlomovú oblasť, ktorá sa sformovala v období strednej kriedy (alb-cenoman) a pozdĺž, ktorej je veporská jednotka bezprostredne nasunutá na tatrikum [2 – 4].

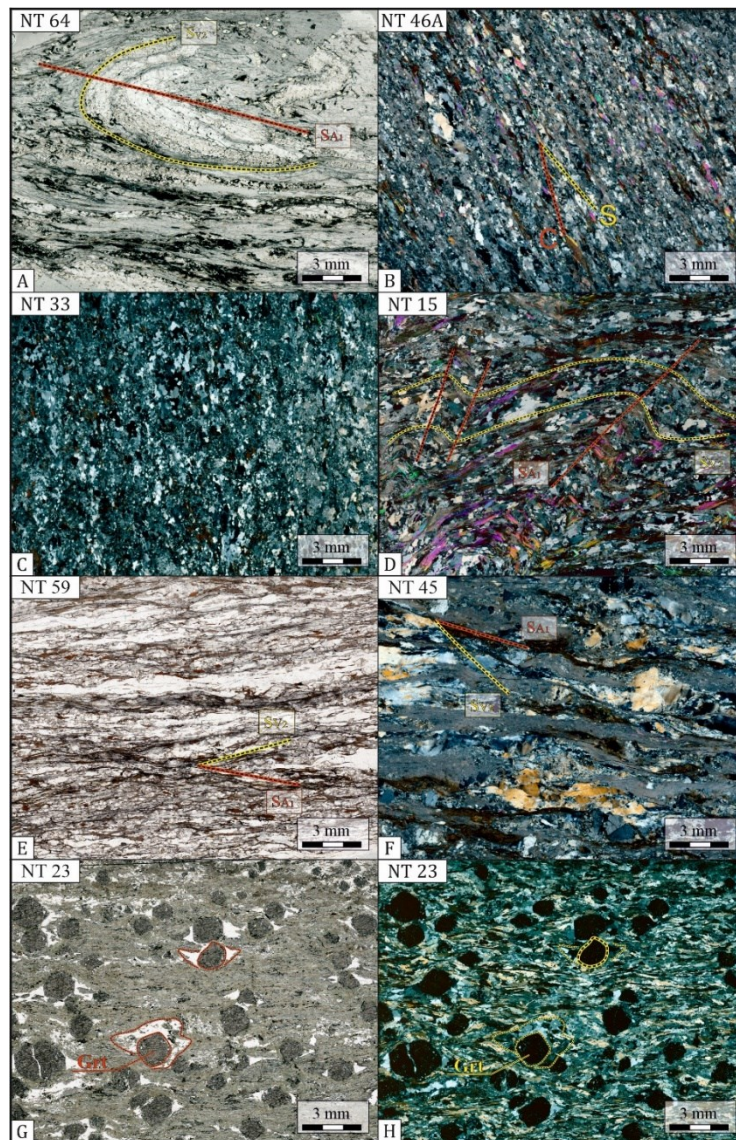
Študované územie má značne komplikovanú geologickú stavbu. Dôvodom sú viaceré orogenetické cykly, ktoré predmetnú oblasť formovali. Hlavným cieľom práce bolo na základe deformačného záznamu objasniť tektonický vývoj v oblasti Nízkych Tatier na styku tatrika a veporika pozdĺž čertovického zlomu.



Obr. 1. Tektonická mapa študovaného územia (vytvoril: K. Kriváňová, 2022; upravené podľa [5])

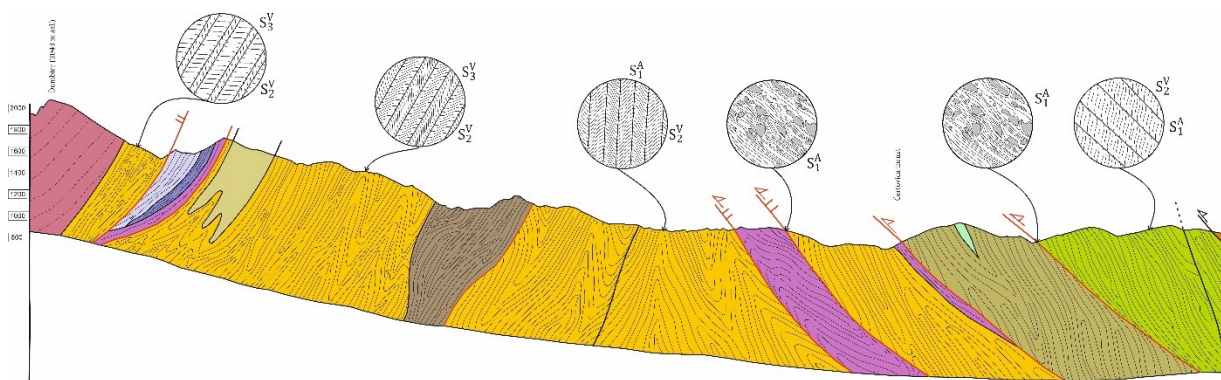
Materiál a metódy

Na základe terénneho výskumu a pozorovaní planárnych (foliácia, bridličnatosť, kliváž, atď.) a lineárnych (lineácie, osi vrás a vrások, atď.) tektonických štruktúr, ich vzťahov a prierezových kritérií bolo možné vyčleniť staršiu variskú a mladšiu alpínsku deformáciu. Na výskum boli využívané klasické metódy štruktúrnej geológie. Tie napomohli identifikovať deformačné udalosti ovplyvňujúce tektonický vývoj oboch celokôrových tektonických jednotiek, tatrika a veporika. V teréne sa odobrali orientované vzorky, z ktorých sa následne vyhotovili výbrusy. Tie slúžili na pozorovania mikroskopických deformačných štruktúr (Obr. 2). Následne sa porovnávali časové a priestorové vzťahy variskej a alpínskej deformácie.



Obr. 2. Mikro-fototabul'a variskej a alpínskej stavby (vytvoril: K. Kriváňová, 2022)

Namerané dáta z terénu (GPS súradnice, planárne a lineárne štruktúry) boli spracované prostredníctvom počítačových programov. Využívané boli najmä GIS systémy (QGIS, GRASSGIS) a programy ako Stereonet, FaultKin, CorelDRAW a Tectonics FP (Obr. 3).



Obr. 3. Geologický prierez tatrickým a veporským kryštálickým komplexom (vytvoril: K. Kriváňová, 2023)

Výsledky a diskusia

Prostredníctvom štruktúrnej analýzy bolo v teréne možné vyčleniť dve hlavné deformačné fázy. Staršia deformačná fáza, označovaná D^V , súvisí s variskou vyššie teplotnou metamorfózou a mladšia deformačná fáza (D^A) je spätá s nízкотeplotnou (retrográdnou) metamorfózou (Tab. 1).

Variskú deformáciu je možné rozdeliť do štyroch priestorovo a časovo nezávislých fáz. Najstaršia deformácia D_1^V je rozpoznateľná v nízko-tlakových doménach len sporadicky, lokálne so zachovanými zovretými, izoklinálnymi a potrhanými (root-less) vrásami (F_2^V) planárnych štruktúr S_1^V . Ramená vrás S_1^V sú konformné s pervazívnou foliáciou S_2^V , čo jasne potvrdzuje ich najstarší vek. Osi vrás F_2^V majú veľkú priestorovú variabilitu, ale vo všeobecnosti sú orientované v smere V–Z. Nie je vylúčené, že deformácia D_1^V by mohla byť aj predvariská.

Deformácia D_2^V bola sprevádzaná progresívnou metamorfózou a granitizáciou a je považovaná za najkomplexnejší a najvýznamnejší proces, pri ktorom vzniká typická pervazívna metamorfná foliáciu (S_2^V) v celej študovanej oblasti. Foliacia (S_2^V) je najčastejšie pozorovateľnou anizotropiou pri väčšine metamorfovaných hornín, ktoré sme v teréne skúmali. Na základe asymetrie ramien vrás vieme, že zmysel pohybu S_2^V bol na juh. Natiahnutie a minerálne lineácie (L_{2t}^V) sú zvyčajne orientované v smere VSV–ZJZ. Sú spájané s deformáciou D_2^V , ale nie sú pervazívne ako foliace (S_2^V).

Foliácia S_2^V je vrásnená nepervazívnymi vrásami (F_2^V) so smerom osi vrás (F_2^V) V–Z. Spomínané planárne a lineárne štruktúry sú na mnohých miestach intenzívne zvrásnené. Nová stavba je reprezentovaná nepervazívnou klivážou S_3^V a intersekčnými a krenulačnými lineáciami (L_{3c}^V). Posledné pozorovania variskej deformácie D_4^V sú sprevádzané aplitmi,

pegmatitmi a kremennými žilami (S_4^V), ktoré sú prevažne orientované v dvoch smeroch – $S_2^V \parallel S_4^V$ a $S_2^V \perp S_4^V$ a lineárnymi štruktúrami, ktoré boli pozorovateľné.

Alpínsku deformáciu (D_1^A) sprevádzala retrográdna metamorfóza a vývoj deformačných štruktúr je výraznejší v strižných zónach, ktorá sa vyvíjala počas kriedovej orogenézy (Eoalpínska deformácia). Teplotno-tlakové podmienky pre metamorfózu boli signifikantne nižšie v prípade deformácie (D_1^A) ako v prípade deformácie (D_2^V). Úplná transpozícia stavby S_2^V na S_1^A vznikala len lokálne. Deformácia (D_1^A) je charakterizovaná vývojom krenulačnej kliváže a S-C stavby, ktorá v strižnej zóne prechádza do mylonitickej foliácie (S_1^A). Foliácia (S_1^A) má SV–JZ priebeh, pričom sa mierne skláňa na JV smer. Deformácia (D_1^A) je sprevádzaná SV–JZ intersekčnými lineáciami (L_{1c}^A) a vrásami (F_1^A), ktoré sú často asymetrické. L_{1c}^A a F_1^A štruktúry sú mladšie a konformne superponované na štruktúry L_{2t}^V a F_2^V . Z týchto pozorovaní môžeme jednoznačne určiť kinematiku alpínskej strižnej deformácie s generálnou orientáciou vrch na SSZ.

Posledné pozorovania alpínskej deformácie (D_2^A) súvisia s extenzným tektonickým režimom, najmä v strižnej zóne čertovického zlomu. Extenzné štruktúry, ako napríklad en-echelon žily (S_2^A) a strečingové lineácie L_{2t}^A , poukazujú na transport vrch na východ s orientáciou hlavnou extenznou osou napätia v smere V–Z. Štruktúry D_2^A nie sú pervazívne a boli pozorované predovšetkým v spodnotriasových metakvarcitoch a v kryštaliniku v okolí strižnej zóny na kontakte medzi tatrikom a veporikom.

Tab. 1. Prehľadná tabuľka deformačných štruktúr (foliácie, lineácie a osi vrás)

Deformácia	Planárne štruktúry	Lineácie T	Lineácie C/vrasy	Tektonický režim	Vek
D_1^V	S_1^V (V–Z)	neznáma	Rôzna orientácia	kompresia	Skorý variský alebo starší
D_2^V	S_2^V (V–Z do ZJZ–VSV)	L_{2t}^V (ZJZ–VSV)	L_{2c}^V (JZ–SV) F_2^V (V–Z do JZ–SV)	kompresia	Variský
D_3^V	S_3^V (V–Z do ZJZ–VSV)		F_3^V (V–Z do ZJZ–VSV)	kompresia	Neskorý variský
D_4^V	S_4^V (V–Z a S–J)			extenzia	Neskorý variský
D_1^A	S_1^A	L_{1t}^A (SSZ–JJV)	L_{1c}^A (ZJZ–VSV) F_1^A (ZJZ–VSV)	kompresia	Eoalpínsky
D_2^A	S_2^A	L_{2t}^A (ZSZ–VJV)	L_{2c}^A (SSV–JJZ)	extenzia	Neoalpínsky

Záver

Predkladaná práca sa zameriava na štruktúrnú analýzu a rekonštrukciu deformačných fáz, ktoré ovplyvňovali pohorie Nízkych Tatier pozdĺž čertovického zlomu. Tie sú výsledkom dlhodobého a viacetapového magmatogénneho, metamorfného a tektonického vývoja čo spôsobuje jeho zložitú geologickú stavbu.

V súčasnosti sa podarilo vytvoriť tektonickú mapu skúmaného územia, profil s vyznačenými deformačnými štruktúrami, dokumentačný denník, kontúrové diagramy nameraných variských a alpínskych foliácií a lineácií, makro-tabuľu zobrazujúcu variskú a alpínsku stavbu a tiež mikro-tabuľu variskej a alpínskej stavby. Do budúcnosti je naplánovaný ďalší terénny výskum zameraný na deformačné štruktúry oboch tektonických jednotiek.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla vďaka finančnej podpore Slovenskej agentúry pre výskum a vývoj Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR (APVV) na základe zmlúv APVV-21-0281 “Alpine geodynamical evolution of the Western Carpathian inner zones” a APVV-17-0170 “Early Alpidic tectonic evolution and palaeogeography of the Western Carpathians” a Vedeckej grantovej agentúry (VEGA) na základe zmluvy č. VEGA 1/0346/20.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Mazúr E., Lukniš M. (1980) Geomorfologické jednotky. In: Mazúr E. (ed.) Atlas Slovenskej socialistickej republiky. Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, Geologický ústav Dionýza Štúra, Bratislava, p. 54
- [2] Mahel' M. (1986) Geologická stavba československých Karpát, Paleoalpínske jednotky 1. Veda, Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, Geologický ústav Dionýza Štúra, Bratislava, p. 503
- [3] Plašienka D. (2018) Tectonics 37(7), p. 2029
- [4] Putiš M. (1992) Geol. Carpath. 43(6), p. 369
- [5] Bezák V., Šefara J., Bielik M., et al. (2004) Tectonophysics 393(1-4), p. 63

Vývoj kontaminace podzemních vod na vybrané lokalitě

Albert Kučera

*Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav geologických věd, oddělení
Aplikovaná a Environmentální geologie, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika;
499568@mail.muni.cz*

Abstract

Time changes in groundwater contaminant concentrations at selected site

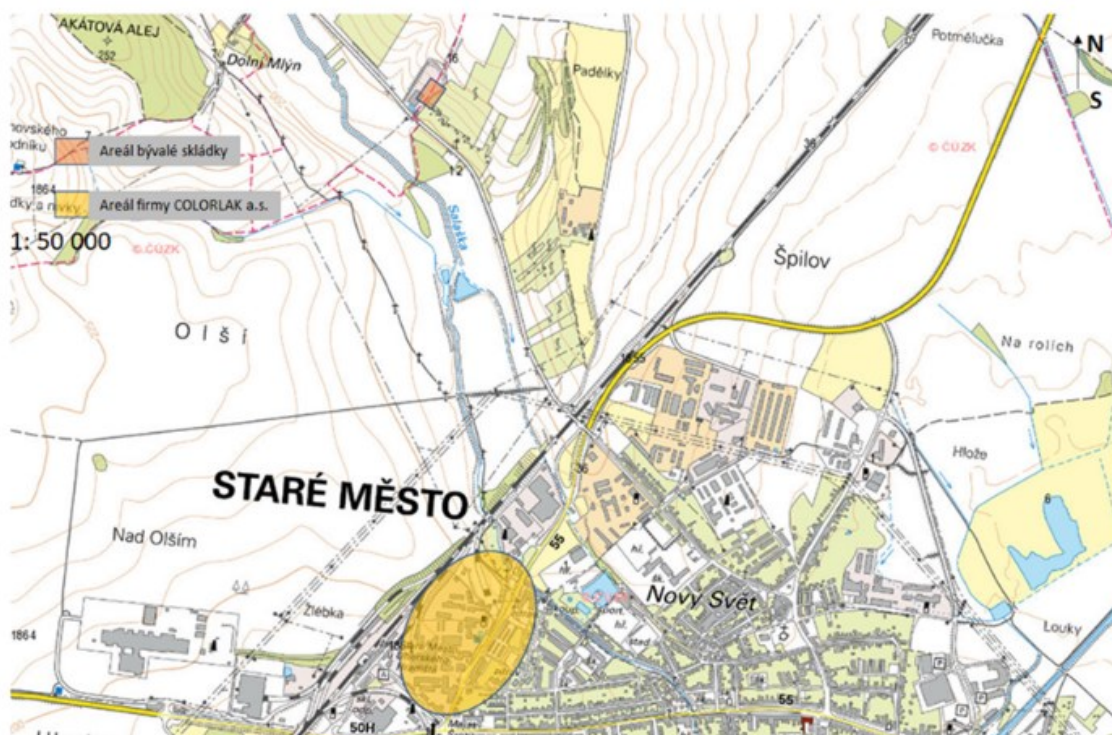
The paper deals with the development of groundwater contamination in the interest area of colorlak a.s. in the Old Town at Uherský Hradiště. The site of the plant, which produced ferret paints, dome varnishes, oil enamels, alcohol, nitrocellulose and synthetic paints and varnishes, later developed a warehouse hall with nitrocellulose and a waste treatment plant and incinerator, was an infested area with high concentrations of BTEX and addressed environmental damage. Remediation work was repeatedly carried out to reduce contamination and improve groundwater quality, and a number of remediation wells were built for groundwater pumping and backwater pumping needs, air rotation or venting. The cargo hold continues to be a source of pollution despite intensive remediation work.

Keywords: *COLORLAK a.s.; groundwater; contamination; remediation wells*

Úvod

Cílem příspěvku je popsat oblast výskytu staré ekologické zátěže firmy COLORLAK, a.s. ve Starém Městě u Uherského Hradiště a na základě získaných podkladů popsat vývoj kontaminace podzemních vod látkami BTEX u sledovaných objektů JT5 a JT6 v letech 2011–2021.

V rámci provozu firmy COLORLAK, a.s. ve Starém Městě bylo a je manipulováno se širokým spektrem chemických látek. Průzkumnými a sanačními pracemi byla prokázána kontaminace prostředí polutanty antropogenního původu, avšak k masivnímu úniku do horninového prostředí většinou nedocházelo a nedochází. Zdroje znečištění v zájmovém území, s ohledem na dlouhou dobu provozu výrobních zařízení a jejich vývoje, byly rozmístěny na mnoha místech zájmového území.



Obr. 1. Situace zájmového území (ČÚZK 2022 upraveno dle ČÚZK)

Materiál a metody

Ze souboru dat jsem vybral data z potřebných vrtů a vytvořil tabulky pro odpovídající hodnoty (viz tab. č.1.) Podkladem k teoretické části práce byli studie a správy z realizovaných sanačních prací [1]. Dokumenty rizikových analýz a doplňkových průzkumů včetně projektové dokumentace AAR, vyhotovené Kovářem M. v roce 2020 [2]. První hydrogeologická studie území byla zpracována Krčmářem Z. v roce 1992 s cílem stanovit hlavní zásady ochrany podzemních vod v areálu závodu a jeho okolí, vzhledem ke kontaminaci horninového prostředí a podzemních vod. V roce 1994 byla provedena společností KAP s.r.o. [1] úvodní analýza rizik areálu, kdy byla zjištěna kontaminace půdního vzduchu ropnými látkami a aromatickými uhlovodíky, méně pak chlorovanými uhlovodíky. V rámci průzkumu, při kterém bylo vyhloubeno 16 mapovacích sond J-127 až J-142 a 11 vystrojených vrtů PJ-7 až PJ-17, byla dále ověřena kontaminace zemin ropnými uhlovodíky, aromatickými uhlovodíky a PCB. V podzemní vodě byla identifikována kontaminace NEL, BTEX, CIU, PCB a těžkými kovy. V průběhu realizace sanačních prací byla vybudována řada sanačních vrtů pro potřeby čerpání podzemních vod a zpětného zásaku, pro airsparging či venting, jejichž dokumentace přispívala k prozkoumanosti území. Po doprůzkumu v roce 2004 a doplňku AAR v roce 2005 bylo sanační čerpání redukováno na ochranné čerpání k omezení migrace znečištění z nákladové plochy Horního závodu do již vysanovaných částí Dolního závodu a prostoru vlečky [3, 4].

Podkladem praktické části práce byly pro vyhodnocení koncentrace kontaminace v letech 2001–2011 použity naměřené hodnoty koncentrace znečišťujících látek v podzemních vodách v rámci sledovaných jímacích trubek JT5 a JT6. Tabulky a následně vytvořené grafy obsahují hodnoty BTEX (těkavých organických sloučenin) - BNZ (benzenu), TLN (toluenu), ETB (ethylbenzenu) a XLN (xylenu). Hodnota BTEX je celkovou hodnotou BNZ + TLN + ETB + XLN. Hodnota xylenu je celkovou hodnotou m+p XL + o XLN. Hodnoty jsou uváděny v µg/l. Pro názornost přikládám tabulku naměřených hodnot v jímacím trubici JT6.

Tab. 1. Naměřené hodnoty koncentrace v letech 2011–2021 v JT6

	Datum	BNZ (µg/l)	TLN (µg/l)	ETB (µg/l)	BTEX (µg/l)	xyleny (µg/l)
JT6	27.06.2011	14 700,00	244 000,00	4 030,00	294 000,00	31 000,00
JT6	20.07.2011	10 200,00	205 000,00	3 760,00	251 000,00	32 100,00
JT6	10.01.2012	3 690,00	62 600,00	757	74 097,00	7 050,00
JT6	21.02.2012	5 210,00	17 000,00	2 110,00	37 929,00	13 600,00
JT6	15.01.2013	2 080,00	32 900,00	267	37 400,00	2 140,00
JT6	24.04.2013	2 180,00	56 900,00	1 720,00	68 838,00	7 990,00
JT6	21.01.2014	1 030,00	27 900,00	263	31 600,00	2 460,00
JT6	23.04.2014	4 190,00	186 000,00	2 880,00	210 000,00	17 100,00
JT6	16.05.2014	504	14 200,00	<0,50	15 900,00	1 190,00
JT6	12.08.2014	1 490,00	109 000,00	1 870,00	124 000,00	11 300,00
JT6	02.05.2016	182	6 350,00	5,2	7 020,00	483
JT6	01.08.2016	1 000,00	27 600,00	790	32 500,00	3 120,00
JT6	07.02.2017	4 710,00	139 000,00	1 760,00	150 000,00	4 570,00
JT6	09.05.2017	2 140,00	74 500,00	1 370,00	81 700,00	3 670,00
JT6	07.08.2017	1 860,00	86 200,00	3 020,00	101 000,00	9 700,00
JT6	09.05.2018	378	26 100,00	526	30 000,00	2 960,00
JT6	07.08.2018	1 510,00	55 100,00	1 760,00	62 700,00	4 300,00
JT6	06.11.2018	2 170,00	167 000,00	2 020,00	177 000,00	5 980,00
JT6	06.02.2019	2 640,00	91 700,00	1 630,00	100 000,00	4 480,00
JT6	25.04.2019	3 410,00	176 000,00	2 720,00	189 000,00	7 270,00
JT6	09.10.2019	296	18 500,00	914	21 800,00	2 120,00
JT6	07.04.2020	606	16 700,00	548	18 800,00	898
JT6	09.08.2020	2 020,00	164 000,00	1 000,00	181 000,00	14 000,00
JT6	12.10.2020	971	18 400,00	562	20 900,00	980
JT6	04.01.2021	685	16 100,00	316	17 800,00	664
JT6	06.04.2021	364	9 260,00	225	10 200,00	344
JT6	15.07.2021	106	443	67,3	743	127

Výsledky a diskuze

Po ochranném sanačním čerpání (od r. 2008 do 18. 7. 2011), po provedení pilotního testu ISCO (04-08/2010) a po poloprovozní zkoušce hydraulického sanačního čerpání byly naměřené hodnoty koncentrace znečišťujících látek u JT 5 BNZ nad hodnotou 10 000 µg/l, hodnoty koncentrace TLN těsně pod hodnotou 200 000 µg/l, hodnoty koncentrace ETB těsně nad hodnotou 3500 µg/l a celková hodnota koncentrace BTEX těsně pod hodnotou 250 000 µg/l [5]. Na jímací trubici JT6 byly naměřené hodnoty koncentrace znečišťujících látek o něco vyšší. Do roku 2013, kdy probíhalo čerpání a zasakování vod v celém systému nových drenážních žeber, kdy jedna polovina žeber byla čerpána a druhá polovina byla využívána pro zasakování přečištěných vod, došlo ke značnému snížení koncentrace kontaminace sledovaných znečišťujících látek. Rok 2014 se jeví jako rok s nejmenšími hodnotami koncentrace kontaminace u obou JT. V letech 2015, 2016 se hodnoty koncentrace pomalu a nevýrazně zvyšují, V následujících letech 2017 a 2018 bylo sanačního čerpání přizpůsobeno aktuálnímu stavu kontaminace i stavu podzemních vod. Pro nedostatek vody v důsledku sucha bylo čerpání provozováno přerušovaně, vždy po nastoupení hladiny podzemní vody. V září 2017 (drenážní žebra DR5 a DR6), dubnu 2018 (drenážní žebra DR5 až DR7) bylo provedeno celkem 5 aplikací ISCO (metoda chemické oxidace in-situ), které byly zaměřeny na přetrvávající dílčí ohniska kontaminace. Pro zvýšení účinnosti sanačního čerpání prováděna aplikace biologicky rozložitelného 10 % roztoku surfaktantu KS-A do drenážních žeber, do kterých byla zasakována voda dekontaminovaná na sanační stanici. Výsledky aplikace jsou viditelné na hodnotách v listopadu 2017 a v květnu 2018. Poté hodnoty koncentrace opětovně dosáhly vyšších hodnot v březnu a červenci roku 2019. Klesající tendenci zaznamenaly hodnoty koncentrace na konci roku 2019 a začátkem r.2020 se hodnoty začaly mírně zvedat. V roce 2021 hodnoty koncentrace klesají, až na nejnižší zaznamenané hodnoty.

Závěr

Z naměřených hodnot koncentrace kontaminace vyplynulo, že metoda „in situ“ chemické oxidace v podmínkách zájmové lokality je použitelná. Lze konstatovat, že v daném úseku bylo po aplikaci činidel dosaženo poměrně výrazného snížení koncentrací BTEX, nicméně po 2 až 4 měsících byl zaznamenán opětovný nárůst koncentrací. V závěrečných fázích sanace podzemních vod bylo provedeno celkem 5 aplikací ISCO, které byly zaměřeny na přetrvávající dílčí ohniska kontaminace v prostoru nákladové plochy, kam patřily i mnou vyhodnocované jímací vrty JT5 a JT6.

Výsledky intenzivních sanačních prací v posledních několika letech poukazují na setrvávající nejméně dvě menší ohniska znečištění, kde je viditelný velmi pomalý pokles znečištění BTEX, a to právě v prostoru nákladové plochy. Ve většině areálu je v současné době dosaženo cílových limitů stanovených rozhodnutím ČIŽP, přesto lze očekávat další změnu rozhodnutí ČIŽP k nápravným opatřením.

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému vedoucímu Mgr. Tomáši Kuchovskému, Ph.D., který mi vždy ochotně vyšel vstříc při řešení problémů, poskytoval mi cenné rady a příkladně tak vedl mou práci. Za poskytnutí potřebných materiálů patří můj dík Ing. Martinu Kovářovi a Ing. Ivo Bětákovi. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Kateřině Povolné za odborné poradenství v dané problematice a při postupu bakalářskou práci. V neposlední řadě děkuji svým rodičům a rodině za podporu a trpělivost, kterou se mnou měli během tvorby této práce.

Použitá literatura

- [1] Handl R, Wichterle M, et al. (1994) ZPRÁVA o přípravných sanačních pracích a rizikové analýze v areálu závodu COLORLAK, a.s. Staré Město, KAP spol. s.r.o., Brno, p. 1
- [2] Kovář M. (2020) Projektová dokumentace AAR
- [3] Ondráček P. (2005) doplněk AAR společnosti ENVI-AQUA s.r.o., p. 1
- [4] Tesařík K. (2004) Zpráva o průzkumu provedeném v rámci realizačního projektu v areálu podniku COLORLAK a.s., KAP, s.r.o., p. 1
- [5] Vlček R. (2010) Havarijní sanace staré ekologické zátěže v areálu COLORLAK, a.s. ve Starém Městě. Závěrečná zpráva pilotního testu chemické oxidace „in situ“ (ISCO), AECOM CZ s.r.o., p. 1

New occurrences and updated fossil record of *Pseudopus pannonicus* (Squamata, Anguidae): taxonomical interests and extended geographic range

Erwan Loréal¹, Elena Syromyatnikova^{2,3}, Igor Danilov³, Andrej Čerňanský¹

¹Department of Ecology, Laboratory of Evolutionary Biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak republic; erwan.loreal.maron@gmail.com

²Borissiak Paleontological Institute, Russian Academy of Sciences, Profsoyuznaya 123, 117997, Moscow, Russia

³Zoological Institute, Russian Academy of Sciences, Universitetskaya Emb. 1, 199034 St. Petersburg, Russia

Abstract

Here, we present a recently published study on newly discovered as well as ancient fossil material of the iconic *Pseudopus pannonicus*, the largest anguine lizard that has ever lived. This extinct species, although known for more than a century and reported across an impressive amount of fossil localities, is still subject to questioning or confusion. This is due to the large overlap of features with other members of the *Pseudopus* lineage, especially its last extent representative: *Pseudopus apodus*. This fossil material comes from localities in Ukraine, Moldova, and the North Caucasus, covering a time interval spanning the late Early Miocene to the Late Pliocene. Interestingly, the most eastward occurrence currently known is documented here, thus significantly extending the geographic range of *P. pannonicus*. The largest anguine maxilla ever found, highlighting its gigantic nature, and the first lacrimal for this species are reported. Several features were discussed. New characters were identified to be taxonomically interesting and the diagnosis of *P. pannonicus* is thus being amended.

Keywords: Anguimorpha; Miocene; osteology; paleobiogeography; paleontology; Pliocene

Introduction and Objectives

The anguine genus *Pseudopus* belongs to the Anguidae clade, a diverse and widely distributed group of reptiles from which the Anguinae clade is the most derived [1]. Among Anguinae, the extinct lizard *Pseudopus pannonicus* (Kormos, 1911) was a common member of the palaeoherpetofaunas from the Late Cenozoic. Besides, the genus *Pseudopus* includes several taxa, mostly fossil, from which only a single representative still exists today: the Sheltopusik *Pseudopus apodus* Pallas, 1775. Since the discovery of *P. pannonicus* in Hungary by Kormos [2], it has then been found in around 30 different localities in Europe. Its geographic range is very impressive as these localities extend as far as Spain and Ukraine, with an important concentration of occurrences in Central Europe. Comparatively impressive, its temporal range is also quite significant. Indeed, uncontested occurrences of this taxon have been recorded as early as the Upper Miocene (MN 9) up until the Lower Pleistocene [3, 4]. In addition to its most impressive geographical and chronological ranges, *P. pannonicus* was also the largest anguine lizard to ever live, with a skull length that has been estimated around 90-

100mm, thus markedly surpassing that of the extant *P. apodus* [3, 4].

Yet, despite being known to palaeontologists for such a long time and by such a large amount of fossil elements, *P. pannonicus* is still at the centre of several interrogations, mainly taxonomical, osteological, and, to a certain extent, phylogenetical. It has been very quickly understood that this fossil species was most similar to the extant *P. apodus*, even indistinguishable, besides its gigantic and more robust aspects, from the latter according to several early authors [e.g., 3 and references therein]. Following the important works of several authors [e.g., 4, 5, 6], several differences between *P. pannonicus* and other *Pseudopus* members, especially *P. apodus*, were identified. Currently, a small set of mainly cranial characters are used to diagnose *P. pannonicus*.

Here, this contribution serves the purpose of 1) highlighting the most important results uncovered by our previous study on *Pseudopus pannonicus* material from Ukraine, Moldova and the North Caucasus [3]; 2) giving few comments on particular specimens from the material of this study; and 3) briefly summarizing the new characters added to the amended diagnosis of *P. pannonicus*.

Materials and methods

The set of fossil specimens that are presented here have been collected throughout various scientific campaigns led by different scientists during the earlier part of the second half of the twentieth century as well as a more recent campaign conducted in 2012.

This material is deposited in the collections of the Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences in Saint-Petersburg, Russia (i.e., the Ukrainian and Moldovan material) or the collections of the Geological Institute of the Russian Academy of Sciences in Moscow, Russia (i.e., the North Caucasus material). It is represented by completely disarticulated specimens of various origins, eight dentaries, five maxillae, 11 parietals, one lacrimal and two braincases for the cranial elements, and 18 vertebrae, 133 osteoderms and one rib for the postcranial elements. Measurements of specimens were either acquired with a digital caliper or the image processing software ImageJ in the case of some feature.

Most specimens of interest were photographed under a Leica M125 binocular microscope with an axially mounted DFC500 camera at the Department of Ecology, Comenius University in Bratislava. In addition, 3D data were acquired for several specimens at the micro-computed tomography (CT) facility of the Slovak Academy of Sciences in Banská Bystrica, using a phoenix v|tomelx L 240 micro-CT. The CT data sets were analyzed using Avizo v.8.1. and VG Studio Max 3.

Results and discussion

Generalities

Overall, these fossil specimens possess the distinguishing osteological features commonly found in *Pseudopus* and more particularly shared by representatives of *Pseudopus pannonicus*, thus making our identifications beyond doubts. As mentioned above, however, *P. pannonicus* and *Pseudopus apodus* share many character states. This makes the distinction between those two taxa difficult, especially when only disarticulated elements are available. Therefore, it needs to be emphasized that some bone elements are not particularly informative when considered individually. All bones described here are assigned to one species on the basis of great similarity with the morphology presented by the taxon *Pseudopus*. Nonetheless, we proposed identifications as *P. pannonicus* because these unremarkable elements (e.g., osteoderms) were found in association with other elements that are confidently attributed to *P. pannonicus* and are comparable in size. In addition, no other anguines besides *P. pannonicus* are known from the localities discussed here (with an exception, see below). This might also support the identification of all of these specimens as belonging to *P. pannonicus*.

There is a single exception to that argument in the case of the Moldovan localities Etulia and Lucheshty from which two species of the anguine *Ophisaurus* were recently documented by one fragmentary parietal each, representing the first occurrence in the Pliocene of this genus in that area [7]. However, the specimens available in our material do not display features suggesting potential *Ophisaurus* affinities. This, coupled to the overall scarcity of *Ophisaurus* material from these localities, led us to maintain our attributions to *P. pannonicus*.

In other words, all specimens can be provisionally considered as pertaining to *P. pannonicus* based on parsimony (i.e., these can be associated with other bones on the basis of their identical ornamentation, e.g., skull roof bones and osteoderms), their comparable size to already known *P. pannonicus* material, and by originating from the same localities.

Remarks

Here are given a few noteworthy points regarding the studied elements. Thanks to the relatively large number of specimens presented here, it was possible to study and document more in-depth the intraspecific variation range of some characters of *Pseudopus pannonicus*. Thus, it completes the frame painted by the ancient pioneer work of Fejérváry-Lágh [5] and the new valuable information following the recent study of Roček [3].

In addition, we also reported the largest anguine maxilla ever known (possibly also the largest anguid maxilla ever documented). It is represented by the nicely preserved specimen

ZIN PH 1/282. Lacrimal is an extremely rare element in the fossil record [8] and only a few specimens are known for the *Pseudopus* lineage. Here, the specimen ZIN PH 2/280 allows us to document a lacrimal bone for *P. pannonicus* for the first time. This first report is noteworthy and allows a comparison with that of *Pseudopus apodus*. Overall, the morphology of the lacrimal is very similar between these two taxa, barring the puzzling small size (which source is currently still unclear) for that of *P. pannonicus* and developed ornamentation (fused osteoscuta) usually observed in older individuals. Included in this material is also the posterior portion of a braincase whose preservation is quite good. Very few such specimens are known for *P. pannonicus* overall, and the study of this specimen highlighted some characters that may prove to be of strong taxonomical importance. However, additional material of equal or better preservation is desired to weigh on this matter.

Finally, pending a revision of the material of the somewhat obscure *Ophisaurus apodus dzhafarovi* [3], the elements reported by us from the North Caucasus localities of Volchaya Balka and Gaverdovsky are currently some of the most, if not the most, easternmost occurrences documented for *P. pannonicus*. Thus, this material is valuable not only because of its taxonomical interest but because of its palaeobiogeographic implications. These patterns of spatial distribution could benefit to be explored in further details in a follow-up work. These could also be tied to the geographic range that is currently occupied by the various populations of the extant *Pseudopus apodus*.

New features & taxonomical implication

The study of this rich material and comparisons with other specimens obtained through loans, visits of collections, and from previously published specimens allowed us to recognize the taxonomical value of a set of character states that allow distinguishing *Pseudopus pannonicus* from other members of *Pseudopus*, especially *Pseudopus apodus*. These are 1) a more developed ornamentation of the nasal process of the maxilla; 2) the exclusion of the coronoid from the anterior inferior alveolar foramen of the dentary by the splenial articulation (as opposed to the character state known in *P. apodus* [9]). This second character state had already been suggested as holding taxonomical importance by Čerňanský et al. [10] but poor preservation and limited material prevented these authors from confidently considering it as being diagnostic of *P. pannonicus*; and 3) stouter, more robust and shorter presacral vertebrae.

Conclusion

New material of the large fossil anguine lizard *Pseudopus pannonicus* is reported from

late Cenozoic localities in Eastern Europe. From that material emerged several noteworthy findings such as the largest maxilla ever found among anguines, the first lacrimal bone found for this species, or a very nicely preserved portion of a braincase, one of the very few currently known for this species. Moreover, the large number of fossil elements allowed us to first study the intraspecific variation range of some features, then provide intrageneric comparisons, and finally highlight three new characters that can be used to distinguish confidently *Pseudopus pannonicus* from its last extant relative *Pseudopus apodus*. These character states are the distinctly ornamented nasal process of the maxilla, the exclusion of the coronoid from the anterior inferior alveolar foramen of the dentary, and the low degree of elongation of the robust presacral vertebrae.

Acknowledgement

This work has been financially supported by the Scientific Grant Agency of the Ministry of Education of the Slovak Republic and the Slovak Academy of Sciences, Grant N° UK/49/2022 and Grant N° 1/0191/21, and by the Zoological Institute, Russian Academy of Sciences (project 122031100282-2, to ES).

References

- [1] Augé M. (2005) Évolution des lézards du Paléogène en Europe. Mémoires du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, France, p. 228
- [2] Kormos T. (1911) Földt. Közl. 41, p.16
- [3] Loréal E., Syromyatnikova E. V., Danilov I. G., et al. (2023) Foss Rec. 26(1), p. 52
- [4] Roček Z. (2019) Comp. Rend. Pal. 18, p. 833
- [5] Fejérváry-Láng A. (1923) Palaeo. Hung. 1, p. 124
- [6] Klembara J. (1986) Geol Zbor Geol Carpath 37, p. 91
- [7] Syromyatnikova E., Klembara J., Redkozubov O. (2022) Palaeobio. Palaeoenv. p. 3
- [8] Villa A., Delfino M. (2019) Zool. J. Linn. Soc. 187(3), p. 831
- [9] Klembara J., Hain M., Dobiašová K. (2014) Anat. Rec. 297, p. 526
- [10] Čerňanský A., Szyndlar Z., Mörs T. (2017) Palaeobio. Palaeoenv. 97, p. 337

Volumetric abundance of microplankton in pelagic deposits across the Upper Jurassic and Lower Cretaceous boundary with the use of the new view on the point-counting method: Some evidence from Brodno

Diana Ölveczká^{1,2}, Adam Tomašových¹

¹*Earth Science Institute of the Slovak Academy of Sciences, v. v. i., Dúbravská Cesta 9, P.O.Box 106, 840 05 Bratislava, Slovak republic; diana.olveczka@savba.sk*

²*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Geology and Paleontology, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak republicmailto:olveczka3@uniba.sk*

Abstract

As the estimation of volumetric abundance of microplankton on the basis of point-counting methods is poorly explored, here we (1) to create and validate a methodological protocol for the investigation of microplankton components in the context of frequency analysis and (2) investigate the distribution of microplankton components at the Tithonian-Berriasian succession at Brodno (Pieniny Klippen Belt, Western Carpathians). This method consists of evaluating a pre-selected number of fields and points needed to estimate diversity and volumetric abundance (percentage) of microfacies components using the JMicroVision software. The estimation of component percentages in five grid cells per thin section, each with 300 counts “five-field” method frequently leads to asymptotic stabilization of percentages. Our preliminary observations indicate that the contribution of calpionellids to the Upper Tithonian and lowermost Berriasian limestones at Brodno typically varies between 2-5%, with maximum of ~10%.

Keywords: *Calpionellids; microplankton; Jurassic; Cretaceous; variability; abundance*

Introduction and Objectives

Calpionellids belong to the group of calcareous planktonic microorganisms with calcitic tests and thus have a good preservation potential in the stratigraphic record. They have a broad biogeographic distribution, achieve high abundance, and exhibit high evolutionary turnover at species level, and thus are useful in biostratigraphic zonation of Upper Jurassic and Lower Cretaceous strata.

Determining volumetric abundance of calpionellids and other taxonomic groups (volumetric contribution of individual components relative to the total sediment volume) is a key step in any sedimentological, paleoecological or taphonomic analyses.

Simple but semiquantitative methods of volumetric abundance estimation use the so-called comparison tables [1]. However, estimates with the help of such tables lack precision and can be biased, e.g., when white larger components are embedded in a black matrix, the total percentage per image can be overestimated by about 10% [1]. Although analyses based on such semi-quantitative estimation can be informative about general stratigraphic trends or major deviations in abundance of individual components, the estimation of abundance requires that more rigorous estimation methods are used on calpionellids. The point-counting approach

counts the number individual points belonging to a given microfacies component over the full frame. This technique counts each grain or matrix that is included inside a standard, two-dimensional grid [1]. The distribution and size of the particles affect how many points are required to produce accurate estimates of component abundances (in percentages). The chosen grid density and the total number of points counted thus affect the accuracy of abundance estimates. At least 300 to 500 points must be tallied in order to reduce sampling mistakes to a minimum; for limestones with irregularly sized and poorly sorted grains, up to 1000 points must be counted [1]. However, the sensitivity of abundance estimates of microplankton from maiolica or biancone facies to varying number of counts was not investigated until now.

Our aim is (1) to create and validate a methodological proposal for the investigation of microplankton components in the context of frequency analysis and (2) to investigate the distribution of microplankton components in the Upper Jurassic-Lower Cretaceous succession at the Brodno section.

Materials and methods

It is necessary to consider the size of components (such as calpionellids, radiolarians, globochaetes or micrite) as well as the chosen confidence interval when determining the minimum number of points in the point-counting approach [1-2]. There are two ways to calculate the abundance of components [2]: A) Grain-bulk, dual point-counting (Fig. 1A) - a point counting approach considers the entire grain (e.g., lorica), including any cavities filled with cement or silt in addition to the shell (grain-bulk measurements). Regardless of how they are filled, all voids are tallied and assigned to the lorica that encloses the void (shown in Fig. 1A by red solid dots). B) Grain-solid method - just the solid portion of the skeletal grain is assigned to the grain (Fig. 1B). The internal intraparticle voids (red empty circles in Fig. 1B) are assigned to the component that fills such void (e.g., micrite, sparite). We use the method A below because even if a hypothetical sediment would be formed solely by densely-packed loricae, the method B would lead to a low estimate of their abundance as most points will still corresponding to pores among or within the loricae.

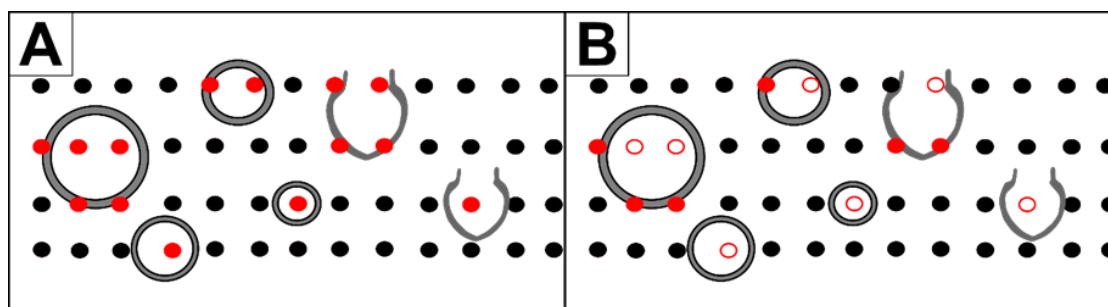


Fig. 1. Methods of counting point. A – Dual point-counting, B – Point-counting of solid parts (according to [1]).

If the lorica contained another organism inside or was crossed by a vein, we counted it as a lorica, since we take the lorica as a whole regardless of the filling. We applied this method to 14 thin-sections from the Brodno section (Pieniny Klippen Belt, Western Carpathians).

We use the JMicroVision software to quantify abundance of individual components on the basis of the point-counting method. For the correct results of the frequency analyses, we had to establish rules in advance which we followed throughout the work:

1. Selecting the size of grid cells and the number of points – here we assessed five grid cells (4 mm^2) and counted 300 points per cell.
2. The counts were estimated for 15 component types that were observed in thin-sections from the Brodno section. They include calpionellids, globochaetes, spicules, foraminifera, matrix, crinoids, dinocysts, radiolarians, filaments, aptychi, ostracodes, echinoids, saccocomas, sponges and other. The number of point counts was converted to relative values (%). We present the results of the relative-frequency analysis in a line bar graph, where the x-axis represents a specific measurement and the y-axis represents the percentage representation (Fig. 4).

Results and discussion

To assess the sufficiency of point-counting and to estimate the number of points that is needed to capture the diversity of components, we selected five grid cells. Based on the dimensions of the thin-section ($4.8 \text{ cm} \times 2.8 \text{ cm}$), a grid was drawn for each thin-section with dimensions of one cell equal to 4 mm^2 . The grid (Fig. 2A, 2B) was divided into sections A to G and 1 to 12 (covering the entire thin-section). To calculate the percentage representation, we chose five cells (blue squares in Fig. 2). If some of these cells were intersected large veins in the given section, we assessed the adjacent cells that met the conditions (C5, F9), marked with an orange cross in Fig. 2A. We refer to this method as the “five-point” method.

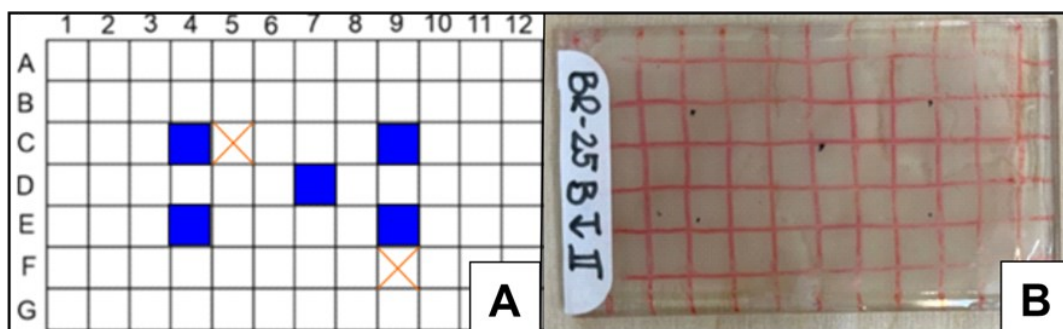


Fig. 2. A - Auxiliary grid with sections A to G and 1 to 12 with marked locations used to calculate the percentage of microplankton; B – a real sample of the thin-section with a grid.

We empirically assessed the count-size dependency. In the first step, we analyzed 100 points. Subsequently, we added another 100 and so on until we observed a stabilization of the percentage value. Our preliminary analyses indicate that 300 points per cell represent a suitable number even for our research. As a result of the measured data, it is possible to statistically evaluate the range (minimum and maximum values), average (mean, median and mode), measures of dispersion (variance standard deviation and coefficient of variations) and the confidence limits for each variable of the point counting group population mean and variance.

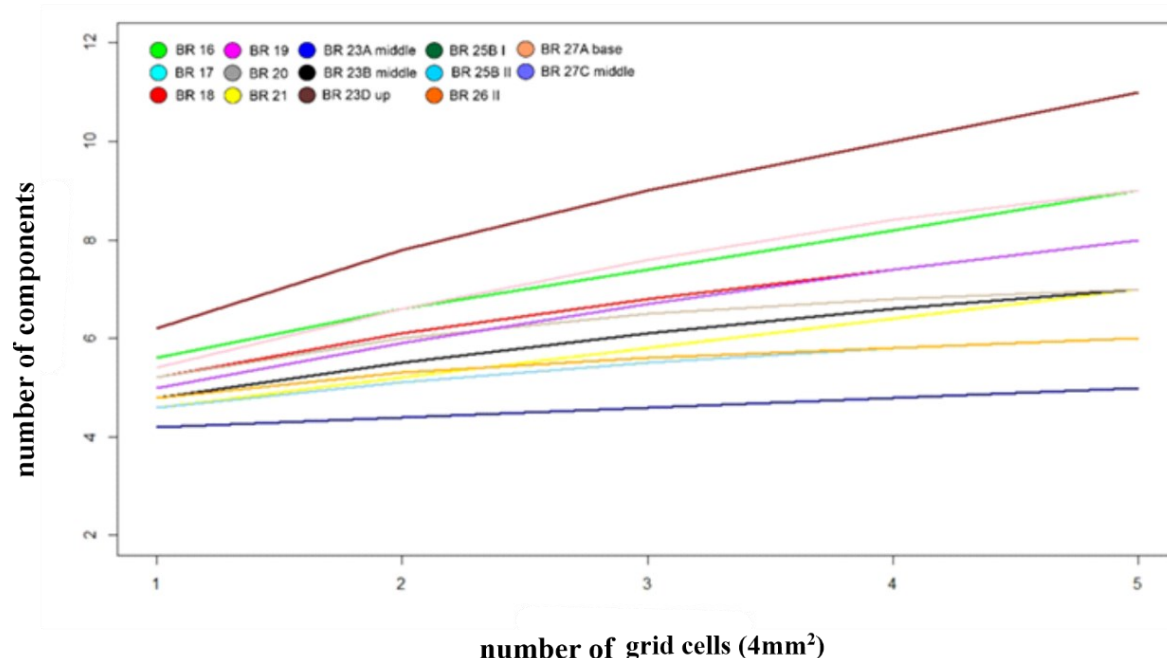


Fig. 3. Variability of in the number of microfacies components detected in individual samples with the number of grid cells (4mm²) increasing from one to five.

The increase in the number of distinct microfacies components (along the y-axis) with number of cells increasing from one to five (along the x-axis, with 300 points per field) in 14

samples from Brodno shows that 4-5 fields (and thus more than 1,000 points) can be necessary to sufficiently capture the composition of microfacies (Fig. 3).

As can be seen, the result is not the same for all samples. For the sample 23A (blue-dark), one frame would be sufficient, while for the sample BR 23D (brown), it can be assumed that five cells with 1500 points in total are sufficient.

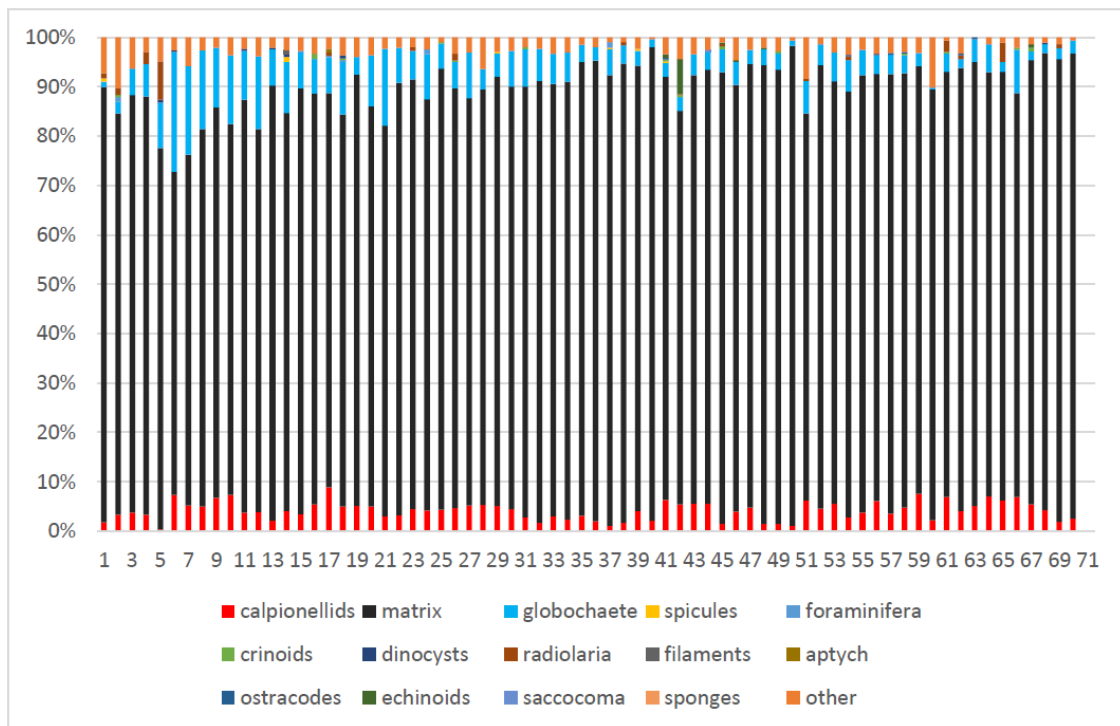


Fig. 4. Bar graph of frequency analysis (from left to right - from the base of the section towards the top).

The proportion of micrite varies between ~70-85%. Variability in abundance of calpionellids can be observed, without any clear trend, fluctuating between 1-5%, with maximum of 9%. Radiolarians tend to be less frequent than calpionellids whereas globochaetes achieve 10-20% in some Tithonian samples.

The preliminary results suggest that the volumetric percent abundance of calpionellids in the Upper Tithonian and lowermost Berriasian maiolica/biancone limestones at the Brodno varies between 2-5%, with maximum of ~10%. Therefore, semi-quantitative analyses based on visual comparisons that indicated that calpionellids contribute with 20% (Brodno) [3] probably overestimated their true contribution to limestones. It can be assumed that 5 cells are sufficient for frequency analyses (Fig. 4.).

Conclusion

The point-count analysis of microplankton helps to determine their percentages in thin-sections and thus is crucial in assessments in the overall contribution of microplankton to carbonate sediment budget. In the context of relative-frequency analysis of components in stratigraphic successions, the distribution and changes in communities of planktonic organisms can be investigated. The point-counting approach based on at least 1,500 points per thin section can generate reliable estimates of microplankton abundance. As part of the methodological procedure, we created a "five-field" method, which we also verified statistically. The preliminary results of the frequency analysis indicate that the contribution of calpionellids to the Upper Tithonian and lowermost Berriasian limestones at Brodno typically varies between 2-5%, with maximum of ~10%, and semi-quantitative analyses that indicated that calpionellids contribute with 20% [3] probably overestimated their true contribution to sediment budget.

Acknowledgement

For the valuable advice and comments, I thank prof. RNDr. Daniele Rehákovéj, CSc. The work output was created on the basis of the financial support in obtaining and laboratory processing of samples of the project VEGA 2/0013/20 and VEGA 2/0169/19.

References

- [1] Flügel E. (2010) *Microfacies of Carbonate Rocks: Analysis, Interpretation and Application*. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 984
- [2] Jaanusson V. (1972) *Lethaia*. 5 (2), p. 217
- [3] Michalík J., Grabowski J., Lintnerová O., et al. (2021) *Creta. Res.* 118, 104659

Review of petrogenetic processes determined in the Dinaridic Ozren-Borja Mahnjača ophiolites in Bosnia and Herzegovina

Samir Ustalić¹, Marián Putiš¹, Elvir Babajić², Ondrej Nemec¹, Peter Ružička¹

¹*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Mineralogy, Petrology and Economic Geology, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak republic; ustalic1@uniba.sk*

²*University of Tuzla, Faculty of Mining, Geology and Civil Engineering, Department of Mineralogy and Petrology, Urfeta Vejzagića 2, 75 000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina*

Abstract

The Ozren ophiolite complex (OOC) and neighbouring Borja and Mahnjača ophiolite complex (BMOC) in Bosnia and Herzegovina are part of Dinaridic Triassic-Jurassic ophiolite belt. The ultrabasic rocks from these complexes provide evidence of the reactive porous flow. This process means gradual olivine-rich mass flow through lherzolites and former harzburgites up to dunites formation. Ultrabasic rocks also provide evidence of the contribution of percolating gabbroic magmas at a higher lithosphere level, crystallizing plagioclase (instead of spinel) and clinopyroxene. A lot of cross-cutting dykes of microgabbros to gabbro-pegmatites in peridotites have been revealed. An exclusive discovery is “troctolitization” of dunite layers in peridotites. Troctolites show interstitial crystallization of plagioclase and clinopyroxene in the olivine matrix, thus providing evidence of the replacive character of impregnating gabbroic (plagioclase-clinopyroxene) melt within the dunite layers.

Keywords: Ozren-Borja-Mahnjača ophiolite complex; reactive porous flow; magma percolation

Introduction and Objectives

The Ozren ophiolite complex (OOC) and neighbouring Borja and Mahnjača ophiolite complex (BMOC) in Bosnia and Herzegovina are part of Dinaridic Triassic-Jurassic ophiolite belt [1-3].

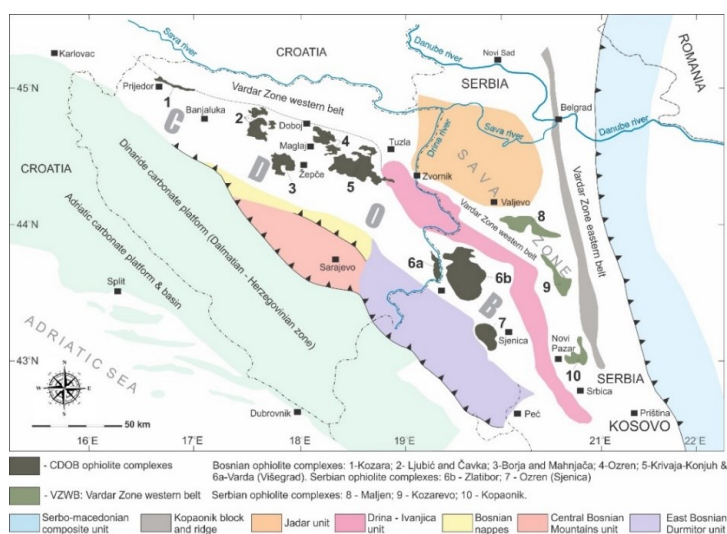


Fig. 1. Borja-Mahnjača Massif (3) and Ozren Massif (4) in Central Dinaridic Ophiolite Belt [1 and references therein]

These two complexes show a polystage mantle evolution and revealed the almost complete ophiolitic cross-section recorded in peridotites, plagioclase (Pl) peridotites, plagiogranites, troctolites and other gabbros, gabbroic, doleritic, and fewer basaltic dykes, and amphibolites in the metamorphic sole. Only sheeted dyke layer is missing. Our contribution includes petrogenetic processes determined in the Ozren-Borja Mahnjača ophiolites in Bosnia and Hercegovina.

Mineral abbreviations in text and figures are from [4]: Ab, albite; Amp, amphibole; An, anorthite; Cpx, clinopyroxene; Ilm, ilmenite; Ol, olivine; Opx, orthopyroxene; Pl, plagioclase; Px, pyroxene; Spl, spinel.

Materials and methods

During the two field work seasons (2021-2022), representative samples were collected from the OOC and BMOC. Samples were taken from 63 locations, including open profiles and borehole cores. Besides collecting a representative set of samples, the field work included a description and taking photographs of outcrops, mesostructural measurements of lithological transections. The field research was focused on finding relatively fresh ophiolite sequences suitable for further laboratory research.

Mineralogical-petrographical description of rocks, with an emphasis on microtextures and modal analyses, was performed by using transmitted and reflected light microscopy from the polished thin sections. The mineral element compositions were measured by electron probe micro-analysis (EPMA) on a Cameca SX-100 electron microprobe at the State Geological Institute of Dionýz Štúr in Bratislava, and by the JEOL Super-probe JXA-8530F at the Earth Science Institute of Slovak Academy of Sciences in Banská Bystrica, Slovakia.

Results and discussion

Reactive porous flow

Evidence of a reactive porous flow is recorded in the OOC and BMOC in large remnants of dunites, which have formed by the inferred reactive porous flow. In this case, it means gradual Ol-rich mass flow through lherzolites and former harzburgites up to dunites formation. The Ol-Opx1-Cpx1-Spl1 boundaries in peridotites of the OOC are infilled with the melt-crystallized undeformed medium-grained Cpx2 (less Opx2) and Spl2 aggregates and fine-grained Cpx3-Spl3 symplectites [1]. All the observable signatures, the HT-deformed Px1 porphyroclasts and Spl1 partial dissolution may have occurred during the final crystallization in subsolidus stage. These porphyroclasts and coarse-grained Spl1 might have reacted with the

pervasive Ol-rich melt by their dissolution. The irregular shape of the deformed Px porphyroclasts and Spl1 is evident, and the grain boundaries are infilled by the late-magmatic Cpx2-Opx2-Spl2 aggregates or locally by the Cpx3-Spl3 symplectites, with the latter indicating a final rapid crystallization stage of the rest melt in the boundaries of older phases (Figs. 2, 3).

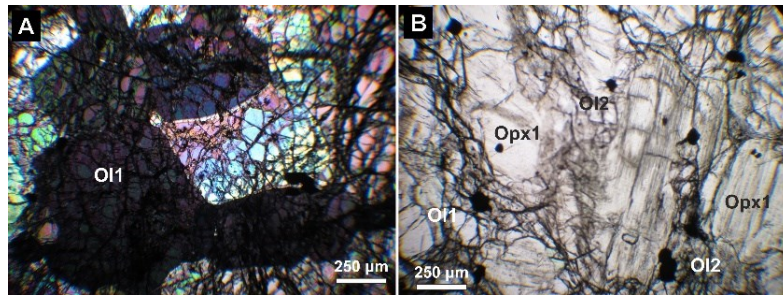


Fig. 2. Microphoto of granular texture of harzburgite (P21). (A) Ol1 texture with grain extinction with a grain size of 1-3 mm. (B) Rim of Ol1 (bottom) and penetrating Ol2 fine-grain aggregates in grain boundaries of Ol1 and Opx1. Picture A at XP, B at // P. [unpublished data]

The mineral chemistry of Ol, Spl, Opx and Cpx suggests abyssal types of peridotites in the OOC (diagrams in [1]), but with a clear indication of reactive porous flow of a percolating melt. Olivine diagram shows an increase of $Mg\# = 90.02-91.02$ in lherzolites to harzburgites, but $90.55-91.74$ in dunites most likely due to Mg-Ol enrichment during dunitization by Ol-rich percolating melt. Spinel diagram shows the Spl1 Cr# in the range of 45–56, typical of abyssal peridotites. Most of the Al from the inferred reactive melt was consumed by Spl3 (with the highest Al content compared to Spl1, 2; Table 2, in [1]) intergrowing with mostly Al-poor Cpx3. The increased Ni content in Spl2 and 3 may suggest vice versa dissolution of Ol in the late magmatic to subsolidus stage or a change from Ol-undersaturated to Ol oversaturated rest melt. Orthopyroxene and Cpx diagrams indicate Al content higher than 2 wt. % characteristic for abyssal peridotites.

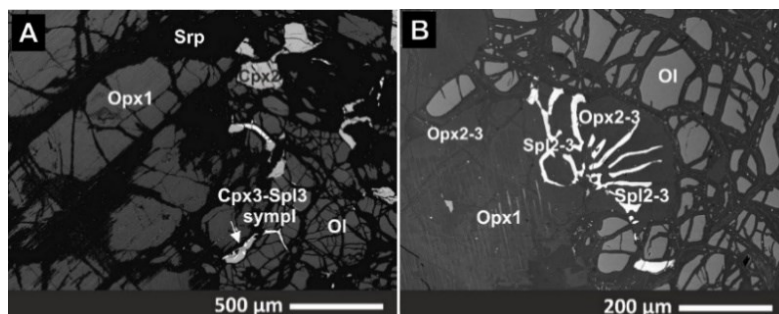


Fig. 3. BSE images. (A) Cpx3-Spl3 symplectites at Ol-Opx1 boundary and in the Ol matrix (P2 – lherzolite). (B) Detailed view on Opx1 rim with Opx2-3–Spl2-3 symplectites (P2-lherzolite). [1]

Melt impregnation of peridotites

The formations of troctolites and Pl peridotites are evidence of the pervasive melt percolation in the OOC. Troctolites (P18A, Figs. 4, 5; and P19A2) in the northern part of the OOC suggest a melt-rock interaction-dominated process, which involved Ol dissolution and crystallization of interstitial Pl and minor Cpx in the Ol matrix and provide evidence of dunite replacement by impregnating Pl-Cpx melt. This stage might have occurred from transitional Spl-Pl stability field according to Spl partial replacement by Pl. During this process, Spl harzburgites might have evolved to impregnated Pl peridotites at estimated depths of ca. 30 to 10 km (~1 to 0.3 GPa) [1].

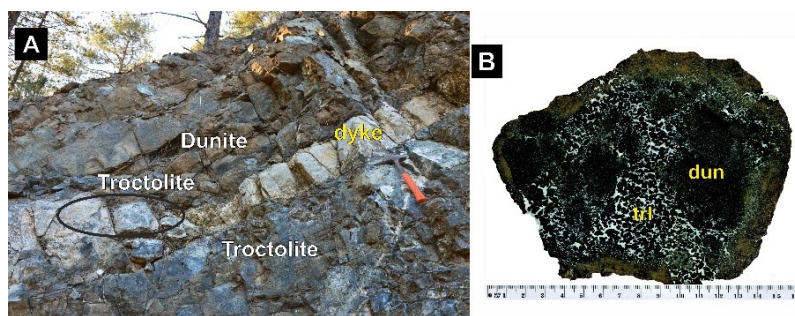


Fig. 4. An outcrop in Donja Paklenica Valley peridotite with a dyke at the dunite-troctolite boundary. (A) Troctolite is crosscut by dolerite dyke (B) Secondary Pl enrichment of Ol-Spl dunite-dun (black parts) and the formation of Ol-Pl($\pm$ Cpx) troctolite-trl. [1]

Cpx-Pl gabbro dykes and Cpx-Pl-Amp dolerite dykes are evidence of the focused melt percolation. Some Cpx-Pl gabbroic dykes (P19A1, P29A1, P29C1; Figs. 6B-D; 7) contain assimilated Ol xenocrysts from hosting harzburgite close to the melt-peridotite interface. Such Ol is enriched in iron due to its proximity to the percolating basaltic/gabbroic melt.

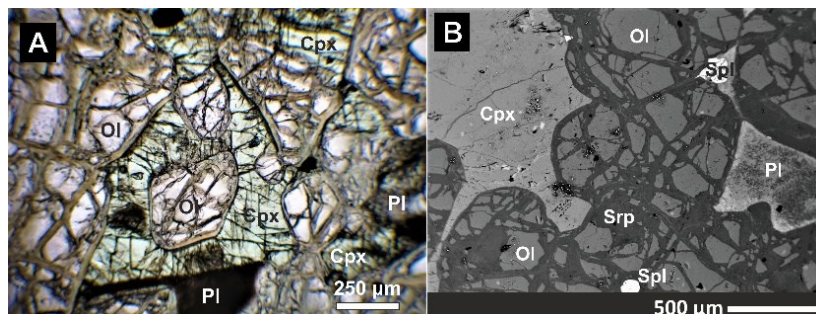


Fig. 5. PL microscopic (A) and BSE (B) images from troctolite (P18A) (A,B) Newly formed Pl and Cpx enclosing Ol and Spl. Picture A at // P. [1]

The change from a pervasive to channel style of the melt-rock interaction indicates

conductive cooling of these peridotites and the emplacement of gabbroic and doleritic dykes into extensional fractures of the less ductile upper part of the thermal lithosphere layer at ca. 15–5 km, before their exposure to the ocean-floor metamorphic alterations.

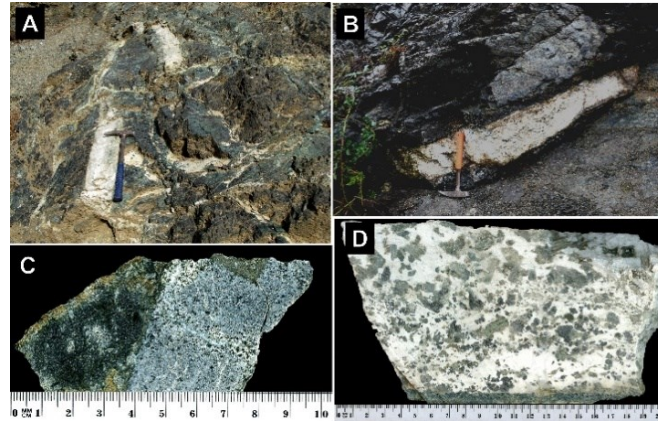


Fig. 6. Gabbro dykes in peridotite. (A) Mylonitized Cpx-Pl gabbro dyke (P23A) in host serpentinized harzburgite. (B) Boudinaged gabbro-pegmatite (P29C1) dyke in harzburgite. (C) Cut surface of micro-gabbro dyke (P29A1) in harzburgite (P29A2) with a cm-size xenolith of the host peridotite (on the top). (D) Cut surface of gabbro-pegmatite (P29C1) shows Cpx and Pl grain-size reduction towards interface with the harzburgite host (P29C2) at the bottom. [1]

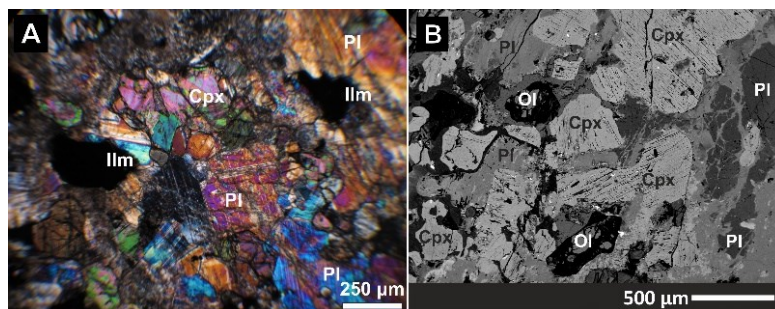


Fig. 7. PL microscopic (A) and BSE (B) images of gabbro dykes. (A) Cpx-Pl-Ilm gabbro (P29A1). (B) The central part of the Cpx-Pl-Ilm dyke (P29A1) contains rare, altered Ol xenocrysts detached from the host peridotite (P29A2). Picture A at X P [1]

Mineral chemistry compositional changes are taken from diagrams in [1]. Olivine FeO content in peridotites is 8–10 wt. %, whereas a higher Ol content up to 16.5 wt. % was found in troctolites and peridotites in interfaces with gabbroic dykes. Olivine in dolerite dyke P9 has the highest FeO content of 31 wt. % [1]. Spinel Cr# of dunites and troctolites are comparable, the Spl TiO₂ and Al₂O₃ are higher in troctolites. Dolerite dyke P9 has much lower Mg#, but much higher TiO₂ compared to ultramafics and troctolites. Orthopyroxene in dolerite dyke P9 has approximately 1 wt. % Al₂O₃. Ultramafics have Opx with a high Mg# of 88–92, whereas the dolerite dyke has much lower Mg# of 72–74. Clinopyroxene in mafics has a more variable

content of Al_2O_3 , ranging from 0.5–6.5 wt. %, and similarly, Mg# of 45–100. The low-Na Cpx-Pl-Ilm $\pm$ Amp gabbroic and less basaltic dykes in peridotites aptly trace the inferred subridge extension and the relative uplift of peridotites due to mantle thinning. Plagioclase of gabbros, dolerites, troctolites, and Pl peridotites has primary higher An content, which is only rarely preserved (e.g., P9). However, reactional and alteration processes decreased An and increased Ab components in Pl.

Conclusion

Mantle peridotites which are determined in the OOC and BMOC are composed of lherzolites, harzburgites, and rare dunites. A part of the dunite layers in peridotites documents transition to troctolites due to secondary Pl and Cpx enrichment from percolating melts. Systematic field research and laboratory analyses revealed three very significant geological processes in the Ozren ophiolite complex (OOC) and Borja-Mahnjača ophiolite complex (BMOC) which indicate melt-rock interaction at the different lithosphere levels: (1) Reactive Spl peridotites, including dunites, formed in the deeper part of the mantle lithosphere. The processes that occurred at the shallower mantle lithosphere due to lithosphere extension and thinning were accompanied by an interaction between peridotites and percolating melts in the Pl stability field; (2) The formation of troctolites within dunite layers; (3) Emplacement of crosscutting gabbroic dykes and veins in peridotites and troctolites. These rocks and processes appear to be indicators of the subduction-unrelated ophiolites and the mechanisms of melt-rock reactions.

Acknowledgement

This work was supported by the Project No. APVV-19-0065 and Grant UK No. UK/37/2022.

References

- [1] Putiš M., Nemec O., Ustalić S., et al. (2022) *Minerals* 12 (9), 1108
- [2] Ustalić S., Putiš M., Nemec O., et al. (2022) 15th Emile Argand Conference on Alpine Geological Studies, Abstract book and fieldtrip guide, Ljubljana, Slovenia, p. 66
- [3] Ustalić S., Putiš M., Babajić E., et al. (2023) 20th PVS SGS - Scientific Conference of the Slovak Geological Society and the Czech Geological Society, Mente et Malleo - Abstracts (20th PVS SGS) of the Scientific Conference, Bratislava, Slovakia, p. 47
- [4] Warr L. (2021) *Mineral. Mag.*, 85(3), p. 291

Quantitative retrospective evaluation of landslide susceptibility maps, case study: Stara Lubovna district

Ema Zvara, Rudolf Tornyai

Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Engineering Geology, Hydrogeology and Applied Geophysics, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak republic; brazdova3@uniba.sk

Abstract

Landslide research has always been one of the main tasks of engineering geologists. In recent years, along with climate change and sudden weather changes, the occurrence of large slope deformations has increasingly come to the attention of both scientists and ordinary people. It is therefore not surprising that the importance of financially and technically inexpensive but accurate prediction of landslide events is required. Among the most useful methods are quantitative statistical analyses and modelling in a GIS environment. Despite the widespread use of these techniques, there is little evidence of the success of such susceptibility maps. Most works validate their success by using a training and test dataset, but such validation gives only information about the success of the prediction model, not about whether the newly occurring landslides really occurred at the predicted locations. The proposed retrospective evaluation works with real data separated by the year 2010, in which the territory of the Slovak Republic was hit by heavy rains.

Keywords: *landslides; susceptibility maps; statistical analyses; Stara Lubovna*

Introduction and Objectives

The global goal in slope deformation research is to create accurate forecasting, which would be able to predict the occurrence of landslide events with a high degree of probability. The usage of Geographic Information Systems (GIS) has proven to be very appropriate for this role. The evaluation of the landslide hazard in a GIS environment is based on 4 basic assumptions [1, 2], which this work also adheres to:

1. Landslides are always highly likely to occur in the same geological, geomorphological, hydrogeological, and climatic conditions as they have occurred in the past.
2. The main causes of landslides are controlled by factors that we can identify.
3. The degree of landslide hazard can be assessed.
4. All types of slope failures can be classified and identified.

In other words, the understanding of the geological structure, hydrogeological conditions, geomorphology, historical information on landslide movements, records of past rainfall, and others allow us to predict when and where new landslides may occur.

Statistical analyses help to extract additional information from GIS data that might not be obvious simply by looking at a map, information such as how attribute values are distributed, whether there are spatial trends in the data, or whether the features form spatial patterns. Statistical methods for prognosing landslide hazard in GIS are based on an exact comparison of the areal distribution of existing landslides in the area with the spatial distribution of various parameters representing independent input variables [3].

The objective of this work is to process the landslide hazard for the Stara Lubovna district in the ArcGIS 10.2. software by quantitative method (multivariate statistical analysis), to create 2 susceptibility maps using two different statistical data classifications (natural breaks and quantile), and to evaluate their susceptibility by quantitative retrospective comparison with newly formed landslides in GIS environment.

Materials and methods

The district of Stara Lubovna was selected because it fulfils the conditions of suitability for the usage of multivariate statistical analysis in GIS:

1. geological hazard is present in the territory to a sufficient extent,
2. the territory is characterized by current anthropogenic activity,
3. sufficient exploration was made in the territory (in terms of the geology, engineering geology, hydrogeology, and morphology) [4].

For this work, which aims to create a general susceptibility maps of landslide hazard for a large area, we selected the input parameters based on the importance of the impact on the occurrence of landslide hazard as well as the efficiency in both the availability of data and the size of the set of the processed data. Primary input vector maps that have entered our statistical modelling were:

- a digital cadastral map of 1:10 000 scale [5],
- a digital geological map of Slovakia in the scale of 1:50 000 [6],
- a basic digital topographic map of Slovakia in the scale of 1:10 000,
- a register of landslides formed until the year 2010 in Slovakia [7].

From the input maps the parametric raster maps (p.m.) entering multivariate statistical analysis in form of unique conditional unit map (UCU map), were created, namely:

- digital elevation model,
- slope gradient p.m.,
- slope orientation p.m.,
- relief curvature p.m.,

- slope lengths p.m.,
- micro-watersheds p.m.,
- lithological units p.m.

The UCU map contains all combinations of all categories in all input maps that are in superposition with each other by a simultaneous combination of the input parametric maps. Combination of the UCU map and the map of registered landslides up to the year 2010 and the following extrapolation produced 2 maps of landslide susceptibility, depending on the use of different statistical data classification method (natural breaks and quantile). These maps were then reclassified into five (1 – very low, 2 – low, 3 – medium, 4 – high, 5 – very high) groups, representing the degree of landslide hazard [8].

To verify the degree of success of constructed susceptibility maps of landslide hazard, a simple but very effective method of verification was chosen. Both susceptibility maps were overlaid with a raster map of registered slope deformations recorded during the period 2010-2014 [7]. The verification compares the area of landslides from the map of registered slope deformations with the area occupied by high and very high landslide hazard category, i.e., class 4 and 5 in the susceptibility maps.

Results and discussion

The GIS have established their position in scientific research and their popularity have increased significantly in recent years. In addition, most susceptibility maps achieve very high validation scores in quantitative validation by Receiver-Operating Characteristics (ROC) and Prediction Rate Curve (PRC), at least 80% [9]. ROC and PRC are graphs showing the performance of a classification model. However, in almost all cases PRC or ROC validation of the susceptibility maps tests only landslides that were used to create the map or landslides that were extracted from the dataset before the processing of the susceptibility map to serve as a test dataset. Therefore, these evaluations may be misleading. They present only the success of the prediction model, and not whether the newly formed landslides have occurred in the predicted areas.

On the other hand, the retrospective evaluation validates the success of susceptibility maps with dataset of newly formed landslides.

For our quantitative retrospective evaluation, we used data on newly formed landslides. The retrospective evaluation of susceptibility map reclassified by natural breaks distribution shows the success rate 33.85% and by quantile distribution 60.54% (Fig. 1). Quantile classification assigns the same number of data values to each class. On the other hand, natural

breaks classification groups similar values together and maximizes the differences between classes. The susceptibility map created with natural break classification shows more optimistic prediction, where classes 4 and 5 occupy smaller area. The susceptibility map created with quantile distribution has significantly better success rate. However, its quantitative success rate reaches only 60%. Although, by simply looking on the quantile susceptibility map, the map seems to be quite accurate. Many newly formed landslides are on the edges of areas with high or very high landslide hazard.

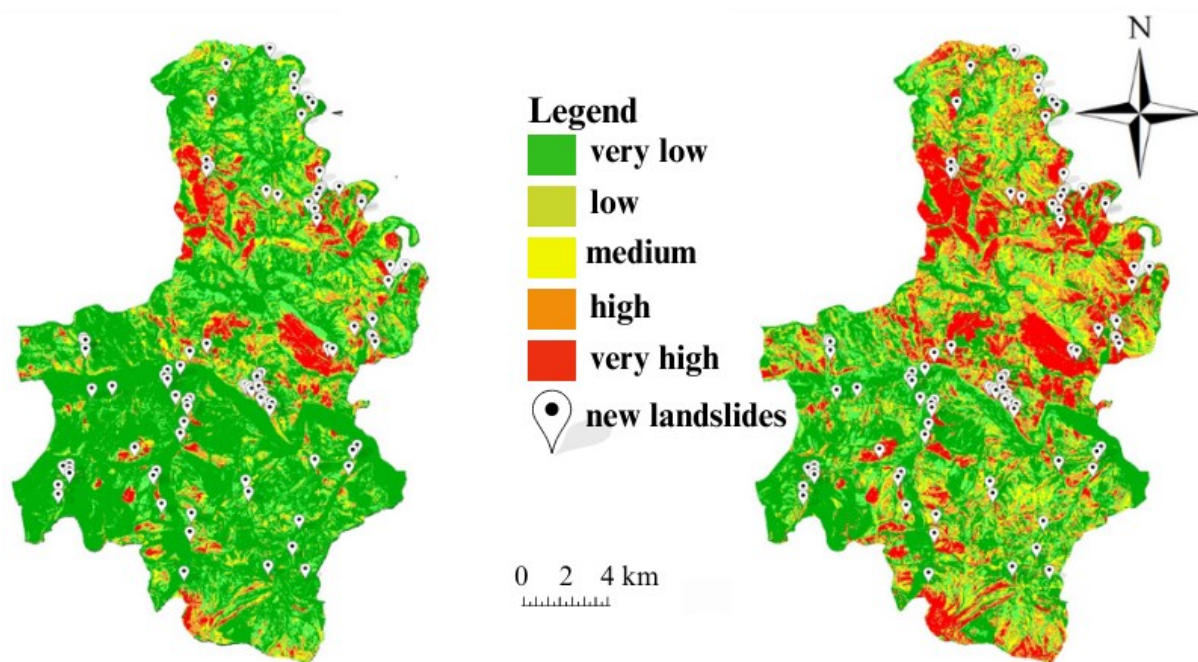


Fig. 1. Susceptibility maps of landslide hazard for Stara Lubovna district
Left map is created with natural breaks distribution and right with quantile distribution.

Conclusion

Landslide hazard susceptibility maps are one of the most frequently used methods for landslide prediction. Despite their great popularity and constant use, their success is evaluated directly during their compilation, thus in the overwhelming majority real data from newly formed landslides are not used for the validation. Using retrospective quantitative evaluation, the success rate of the susceptibility maps is significantly lower than reported success rate in other papers that did not use retrospective evaluation. When evaluating a prediction map, it is good to also include a qualitative knowledge-based approach. In many cases, results of quantitative and qualitative approach can be significantly different, which indicates that the accuracy of input parameters and the data used for validation are key factors in the creation

and validation of susceptibility maps.

Acknowledgement

First author of the article thanks to Mgr. Rudolf Tornyai, PhD. for his time and guidance.

References

- [1] Varnes D. J. (1984) IAEG, Commission on landslide and other mass movement on slopes, Landslide hazard zonation: A review of principles and practice. The UNESCO Press, Paris, p. 63
- [2] Hutchinson J. N. (1995) PROC VI. Proc VII Int. Symp on Landslides, Landslide hazard assessment. Christchurch, NZ, p. 1805
- [3] Tornyai R. (2010) Metódy spracovania zosuvného hazardu. (Bachelor Thesis) Comenius University in Bratislava
- [4] Paudits P. (2005) Hodnotenie náchylnosti územia na zosúvanie s využitím štatistických metód v prostredí GIS. (Dissertation Thesis) Comenius University in Bratislava
- [5] Geodetický a kartografický ústav Bratislava [Cited: March 24, 2023] <https://www.geoportal.sk/files/zbgis/na_stiahnutie/shp/ah_shp_0.zip>
- [6] Káčer Š., Antalík M., Lexa J., et al. (2005) Digitálna geologická mapa Slovenskej republiky 1: 50 000. Ministerstvo životného prostredia Slovenskej Republiky, Štátny geologický ústav Dionýza Štúra, Bratislava
- [7] Štátny geologický ústav Dionýza Štúra Bratislava [Cited: March, 24, 2023] <<https://www.geology.sk/geoinfoportal/mapovy-portal/registre-geofondu/svahove-deformacie/>>
- [8] Bednarik M. (2011) Štatistické metódy pri hodnotení zosuvného rizika a hazardu. (Habilitation Thesis) Comenius University in Bratislava
- [9] Fleuchaus P., Blum P., Wilde M., et al. (2021) Environ Earth Sci 80, p. 485

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA**



**eŠVK
PRIF UK
2023**

GEOGRAFIA

**ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2023
ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV**

Priestorová analýza vakcinácie na Covid-19 na území Slovenska

Perla Dömötörövä

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra regionálnej geografie a rozvoja regiónov, Mlynská Dolina, Ilkovičova 6, 842 15, Bratislava, Slovenská republika; domotorova8@uniba.sk

Abstract

Spatial analysis of vaccination for Covid-19 in Slovakia

In the research we focused on vaccination against Covid-19 in Slovakia. The goal was to determine the spatial spread of the vaccination rate for Covid-19 in municipalities in Slovakia in 2022 using the spatial autocorrelation method. We investigated factors that may have influenced areas with high vaccination rates and areas with low vaccination rates.

Keywords: Covid-19; Slovakia; Spatial autocorrelation; Vaccination

Úvod a formulácia cieľa

Pandémia Covidu-19 ovplyvnila každodenný život obyvateľov mnohých krajín sveta, výnimkou nebolo ani Slovensko. Prejavy pandémie Covid-19 je nevyhnutné skúmať nielen v časových, ale aj v priestorových súvislostiach, čo vytvára silnú pozíciu práve pre geografický prístup riešenia témy.

Od začiatku pandémie na Slovensku zomrelo 25 835 osôb (stav k 22.03.2023) v súvislosti s Covidom-19, pričom počet úmrtí na 100 000 obyvateľov bol najvyšší za posledných 70 rokov [1 - 2]. Celosvetovo sa začali prijímať rôzne opatrenia na zníženie morbidita a mortality akými sú: povinnosť nosenia rúška/respirátora, dodržiavanie odstupov, uzavretie hraníc, obmedzenie mobility a mnoho ďalších. Jednou z najvýznamnejších možností zníženia morbidita a mortality bolo zavedenie vakcinácie na Covid-19. Význam vakcinácie spočíva aj vo významnom znížení ťažkého priebehu a potreby hospitalizácie [2].

Cieľom príspevku je zhodnotenie priestorových aspektov vakcinácie na Covid-19 na území Slovenska na úrovni obcí Slovenska v období rokov 2020–2022 a zhodnotenie faktorov, ktoré mohli mať vplyv na regióny s vysokou mierou vakcinácie a naopak na regióny s veľmi nízkou mierou vakcinácie na Covid-19.

Materiál a metódy

Pri analýze sme pracovali so sekundárnymi dátami [3] o vakcinácii na Covid-19, ktoré nám boli sprostredkované Národným centrom zdravotníckych vecí (NCZI). Hierarchická úroveň dát bola na úrovni obcí. Okrem obligátnych atribútov mali poskytnuté dáta atribúty

o počte podaných dávok, pričom pre potreby analýzy sme brali do úvahy plne zaočkovaných obyvateľov.

Prvým krokom bolo spracovanie a selekcia dát v programe Microsoft Excel pre potreby analýz, keďže poskytnutá databáza databázy obsahovala aj dáta, ktoré neboli vzhľadom na ciele príspevku pre ďalšie spracovanie potrebné.

Druhým krokom výskumu bola analýza dát. V geografii sa často používa špecifický typ korelácie a to priestorová autokorelácia [4]. Priestorová autokorelácia PA vychádza z prvého geografického zákona, ktorý znie: „Všetko so všetkým súvisí, ale blízke veci súvisia viac ako veci vzdialenejšie“ [5]. V PA sa v rámci jedného pozorovania hodnotí vzťah jednej premennej v priestore a čase [6]. Na prvotnú analýzu dát o vakcinácii sme použili program ArcGIS pre globálnu Moranovu I štatistiku.

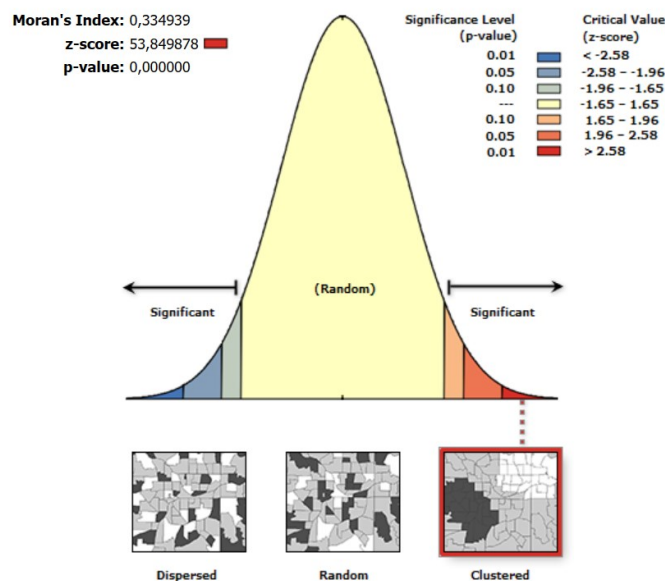
Následná analýza dát využitím PA prebiehala v programe GeoDa, ktorý ponúka viaceré možnosti nastavenia parametrov analýzy ako aj možnosť grafickej a kartografickej vizualizácie.

Dáta sme vizualizovali v programe GeoDa na základe lokálneho indikátora LISA – Local Indicator of Spatial Associations. Pre kartografický výstup sme zvolili metódu kartogramu, ktorý nám znázorňuje jednotlivé zhľuky v priestore alebo ďalšie grafické výstupy.

Interpretácia dát vychádza z dvoch hľadísk. Prvým hľadiskom je interpretácia nameraných hodnôt štatistických ukazovateľov. Ich správne zhodnotenie je esenciálne pre interpretáciu dát. Druhé hľadisko interpretácie dát je priestorovo orientovaná empiria. Kartograficky vizualizované dáta nám môžu poskytnúť priestorové vzorce zhľukovania, ktoré na základe skúseností poznania priestoru možno subjektívne interpretovať a naznačiť možné príčiny výskytu daného javu.

Výsledky a diskusia

Výsledky globálnej Moranovej I štatistiky naznačujú silnú PA, z-skóre >50 . Zároveň možno identifikovať závislosť medzi analyzovanými priestorovými jednotkami ($p < 0,000$); (pozri obr. 1) [6].



Obr. 1. Moranova I štatistika pre podiel vakcinácie obyvateľov obcí SR

Zdroje: NCZI, spracované autorkou

Využitím lokálneho indikátora LISA sme dospeli k týmto 5 prípadom [7] miery vakcinácie obyvateľov na Covid-19 jednotlivých obcí SR:

- High – High (HH) – Obce s vysokou mierou vakcinácie lokalizované v blízkosti iných obcí s vysokou mierou vakcinácie (pozitívna autokorelácia).
- Low – Low (LL) – Obce s nízkou mierou vakcinácie lokalizované v blízkosti iných obcí s nízkou mierou vakcinácie (pozitívna autokorelácia).
- Low – High (LH) – Obce s nízkou mierou vakcinácie lokalizované v blízkosti obcí s vysokou mierou vakcinácie (negatívna autokorelácia).
- High – Low (HL) – Obce s vysokou mierou vakcinácie lokalizované v blízkosti obcí s nízkou mierou vakcinácie (negatívna autokorelácia).
- Not Significant – Obce v danom jave bez štatistického významu.

Najväčšie zhľukovanie obcí s vysokou mierou vakcinácie na Covid-19 môžeme pozorovať v blízkosti hlavného mesta (pozri obr. 2) a vo väčšine obcí západného Slovenska. Vysoké hodnoty miery vakcinácie nadobudli aj krajské mestá: Trnava, Nitra Trenčín, Banská Bystrica, Žilina, Košice, Prešov a okolité obce, kde môžeme pozorovať väčšie zhľukovanie (HH). Domnievame sa, že jedným z dôvodov vyššej miery vakcinácie vyššie uvedených miest môže byť priaznivejšia dostupnosť vakcinačných centier, ktoré sa v prevažnej miere nachádzali v nemocniciach, ktoré sú koncentrované v ľudnatejších mestách. Množstvo vakcinačných centier sa nachádzalo aj v nákupných centrách, ktoré sú príznačné práve pre krajské mestá.

Možno konštatovať, že vakcinačné centrum (vakcína) si našlo ľudí, často si obyvatelia jednou cestou vybavili okrem nákupu aj vakcináciu.

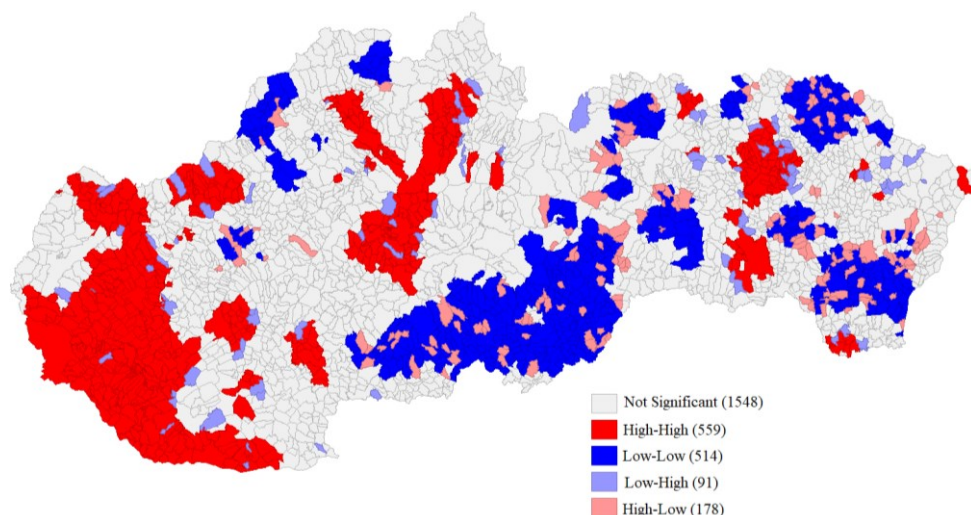
Na mieru vakcinácie, či už vysokú alebo nízku mohlo mať vplyv aj dosiahnuté vzdelanie obyvateľov. Je známe, že na Slovensku sú obyvatelia s vysokoškolským vzdelaním viac koncentrovaní v mestách ako vo vidieckych obciach aj vzhľadom na možnosti zamestnania vzdelanejších obyvateľov. Práve v mestách s vyššou mierou vakcinácie sa nachádza aj pomerne vysoký podiel vysokoškolsky vzdelaných obyvateľov. Vysoký podiel vysokoškolsky vzdelaných obyvateľov dosahujú aj obce okresov Senec, Pezinok a Malacky nachádzajúcich sa v suburbánnej zóne Bratislavy [8]. Domnievame sa, že obyvatelia s vyšším dosiahnutým vzdelaním mali aj väčší záujem o vakcináciu.

Domnievame sa, že jedným z dôvodov vyššej miery vakcinácie Bratislavy a jej okolia v porovnaní s celoslovenským priemerom 50,7 % (pozri obr. 3), môže byť aj zvýšená mobilita jej obyvateľov a tým aj väčší záujem o vakcináciu. V meste sa nachádza množstvo medzinárodných firiem, ktorých zamestnanci sa zúčastňovali na služobných cestách v zahraničí, pričom do viacerých zahraničných destinácií bolo nutnosťou byť zaočkovaným. V Bratislave sa nachádza najväčšie medzinárodné letisko na Slovensku, ktoré má viacero pravidelných liniek do zahraničia, čo môže mať za následok zvýšenú mobilitu obyvateľov Bratislavy a okolia.

Naopak najväčšie zhlukovanie obcí s nízkou mierou vakcinácie na Covid-19 môžeme pozorovať v južných regiónoch stredného Slovenska. Nízkou mierou vakcinácie mohol ovplyvniť vyššie spomínaný faktor – dosiahnuté vzdelanie. Táto oblasť je tvorená okresmi: Krupina, Veľký Krtíš, Lučenec, Poltár, Rimavská Sobota a Revúca, ktoré v porovnaní s inými okresmi Slovenska dosahujú jedny z najnižších podielov vysokoškolsky vzdelaných obyvateľov a je tu vyššie zastúpenie obyvateľov so základným vzdelaním alebo obyvateľov bez vzdelania [8]. Čím môžeme konštatovať, že ľudia s nižším vzdelaním nemali až taký záujem o vakcináciu.

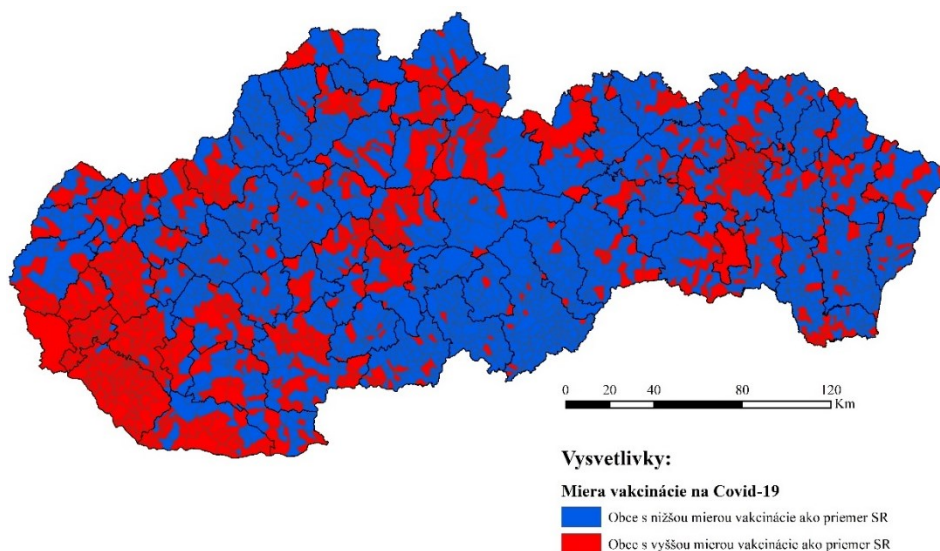
Množstvo obcí s nízkou mierou vakcinácie môžeme pozorovať vo viacerých regiónoch východného Slovenska. Predpokladáme, že to môže byť spôsobené konzervatívnejším životným štýlom prikláňajúcim sa k tradičným hodnotám.

Ďalším faktorom vplývajúcim na mieru vakcinácie mohli mať politické preferencie voličov jednotlivých politických strán na Slovensku a ich priestorová diferenciácia [9].



Obr. 2. Priestorová autokorelácia podielu vakcinácie pre obce SR v roku 2022

Zdroje: NCZI, spracované autorkou



Obr. 3. Miera vakcinácie na Covid-19 v obciach SR v roku 2022

Zdroje: NCZI, spracované autorkou

Záver

Jedným z najvýznamnejších opatrení pre zmiernenie negatívnych vplyvov pandémie bolo zavedenie vakcinácie na Covid-19. Priestorové rozšírenie miery vakcinácie sa v jednotlivých regiónoch Slovenska výrazne líšilo. Najväčšie rozdiely boli medzi obcami západného Slovenska, ktoré v prevažnej väčšine dosahovali nadpriemerné hodnoty a obcami južných regiónov stredného Slovenska, v ktorých boli zaznamenané podpriemerné hodnoty miery vakcinácie. Vysoké hodnoty zaznamenali tiež krajské mestá a okolité obce.

Pozorované rozdiely v miere vakcinácie medzi regiónmi Slovenska môžu byť ovplyvnené viacerými faktormi. Medzi významné faktory vplývajúce na mieru vakcinácie patrí

vzdelanostná štruktúra obyvateľov, životný štýl a politické preferencie obyvateľov. Pri deskripcii vplyvu vzdelanostnej štruktúry obyvateľov na mieru vakcinácie možno konštatovať, že regióny s nižším podielom vysokoškolsky vzdelaných obyvateľov dosahujú nižšiu mieru vakcinácie a naopak regióny s vyšším podielom vysokoškolsky vzdelaných obyvateľov dosahujú vyššie miery vakcinácie ako je priemer Slovenska.

Územie Slovenska sa vyznačuje výraznými regionálnymi disparitami, ktoré boli identifikované na základe mnohých sociálno-ekonomických ukazovateľov a diskutované v mnohých geografických štúdiách. Konštatujeme, že regionálne členenie Slovenska na dva makroregióny: západ a severozápad vs. východ a juhovýchod sa prejavilo aj v prípade vakcinácie na Covid-19 obyvateľov Slovenska.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Covid-19 Report [Citované 22. marec 2023] <<https://covid-19.nczisk.sk/sk>>
- [2] Slovenská angiologická spoločnosť [Citované 22. marec 2023] <<https://www.angiology.sk/wp-content/uploads/2022/01/ockovanie-proti-covid-19-aktualny-prehľad-prinosu-a-rizika.pdf>>
- [3] Rochovská, A., Káčerová, M., Ondoš, S. (2014). Výskumné metódy v humánnej geografii a ich aplikácie. Univerzita Komenského, Bratislava, p.11
- [4] Viliňová, K., Repaská, G., Vojtek, M., et al. (2017) Eur. Spat. Res. Policy. 24(2), p.167
- [5] Tobler, W. R. (1970). A computer movie simulating urban growth in the Detroit region. Economic Geography, 46, p. 234
- [6] Scott L. M., Janikas M. V. (2009) Spatial Statistics in ArcGIS, In: Fischer M. M., Getis A. (ed.) Handbook of applied spatial analysis: Software tools, methods and applications. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, p. 27
- [7] Kusendová, D., Solčianska, J. (2007) Konferencie GIS, Testovanie priestorovej autokorelácie nezamestnanosti absolventov vysokých škôl okresov Slovenska, Ostrava, CZ
- [8] Sčítanie obyvateľov, domov a bytov 2021 [Citované 22. marec 2023] <<https://www.scitanie.sk/obyvatelia/zakladne-vysledky/struktura-obyvatelstva-podla-vzdelania/SR/SK0/SR>>
- [9] Plešivčák, M., Klobučník, M., Buček, J., et al. (2022) Sociológia 54(3), p. 217

Hodnotenie dynamiky liahnísk komárov v povodí riek Morava a Dunaj

Samuel Ferencei, Adam Rusinko

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyzickej geografie a geoinformatiky, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; ferencei2@uniba.sk

Abstract

Evaluation of the dynamics of mosquito breeding sites in the Morava and Danube River basins

Mosquito flood species are linked to regular floods, which periodically occur in the Morava and Danube River basins. Mosquito breeding sites are mainly formed in abandoned arms (channels) and other terrain depressions created by the river in the past. By regular monitoring of these breeding sites, we can prepare against calamities of mosquito population. The aim of the paper is to evaluate one mosquito monitoring season based on regular monitoring activities conducted on individual breeding sites. We used a statistical method built on point rating of each breeding site. With this method we were able to geographically identify problematic locations where we could aim our focus in future monitoring and abatements against mosquito calamities.

Keywords: *LiDAR; mosquito breeding sites; Morava River; Danube River; Slovakia*

Úvod a formulácia cieľa

Na nivách (nížinatých) riek možno nájsť najväčšie druhové zloženie komárov na Slovensku. Medzi tieto rieky patrí aj rieka Morava a Dunaj [1], v blízkosti ktorých je sústredené veľké množstvo obyvateľstva. Pravidelný výskyt záplav vedie k premnoženiu niektorých druhov tzv. kalamitných komárov. Larvám komárov sa najviac darí v relatívne plytkých a netečúcich vodách bez veľkého zastúpenia iných organizmov, ktoré sú potenciálnym predátorom lariev. Pri veľkých záplavách sa vodou vyplnia aj malé terénne depresie v dosahu povodňovej vlny. Automaticky sa tak stávajú potenciálnym liahniskom komárov. Okrem toho môžu byť liahniská aktivované aj iným spôsobom, ako napr. dažďovou vodou, alebo zvýšenou hladinou podzemnej vody. Základom úspešnej regulácie komárej populácie je preto dobrá identifikácia potenciálnych liahnísk, čiže miest ktoré treba pravidelne kontrolovať, monitorovať, prípadne proti množiacim sa komárom zasahovať.

V predchádzajúcej fáze výskumu bolo v sledovanom území na podrobnej úrovni vyčlenených 4787 potenciálnych liahnísk komárov [2]. Na identifikáciu sme v prvotnej fáze využili výškový model DMR 5.0 s rozlíšením bunky jeden meter [3]. Následne boli liahniská verifikované v teréne. V poslednej fáze mapovania liahnísk boli tieto rozdelené do skupín podľa možnosti zásahu (obmedzenia najmä v súvislosti s ochranou prírody), možnosti pravidelného monitoringu, či podľa spôsobu aktivácie (povodňová voda, dažďová voda). Takto vyčlenený súbor liahnísk predstavoval základnú bázu údajov pre pravidelný monitoring

komárej populácie v povodí riek Morava a Dunaj (Tab. 1).

Hlavným cieľom pravidelného monitoringu je identifikácia kalamít a najproblematickejších oblastí z hľadiska rozmnožovania komáríh druhov. Tieto oblasti označujeme aj ako najdynamickejšie, pretože ich stav a fáza v rámci monitoringu sa dynamicky mení s nárastom/poklesom hladiny, a teda aj zvýšeným či zníženým výskytom lariev. Za účelom hodnotenia sezóny sme vyvinuli vlastný bodovací systém, ktorý jednotlivým liahniskám pridáva body na základe zvýšenej aktivity. Zhluky (alebo klastre) najaktívnejších oblastí potom patria do vysoko-prioritných oblastí, na ktorých sa vykonáva spravidla najviac kontrol aj najviac zásahov proti kalamitám komárov.

Tab. 1. Početnosť potenciálnych liahnisk komárov podľa katastrálnych území s možnosťou monitoringu

Mestská časť	Počet liahnisk	Územie BSK	Počet liahnisk
Bratislava-Čunovo	114	Borinka	5
Bratislava-Devín	39	Gajary	262
Bratislava-Devínska Nová Ves	180	Jakubov	6
Bratislava-Dúbravka	23	Láb	2
Bratislava-Jarovce	46	Malé Leváre	207
Bratislava-Karlova Ves	45	Stupava	77
Bratislava-Lamač	22	Suchohrad	111
Bratislava-Nové Mesto	41	Svätý Jur	1
Bratislava-Petržalka	205	Veľké Leváre	36
Bratislava-Podunajské Biskupice	306	Vysoká pri Morave	408
Bratislava-Rača	61	Záhorská Ves	140
Bratislava-Rusovce	110	Závod	1
Bratislava-Ružinov	87	Zohor	46
Bratislava-Staré Mesto	20	Územie TTSK	
Bratislava-Vajnory	42	Moravský Svätý Ján	454
Bratislava-Vrakuňa	6	Sekule	162
Bratislava-Záhorská Bystrica	21	Všetky liahniská spolu	2986

Materiál a metódy

Vzhľadom k vysokej časovej náročnosti terénnych prác a pravidelného monitorovania, boli rutinné kontroly liahnisk komárov v roku 2022 vykonávané najmä na území Bratislavy. Pre potreby výstupov monitorovania a hodnotenia sme zároveň vybrali tri modelové lokality: A, pod hradom Devín; B, Rusovce; C, pod prístavným mostom (Obr. 1). Po vyhodnotení sezóny a overení funkčnosti hodnotiacich postupov pri monitorovaní liahnisk bude možné nastavené procesy rozšíriť na celé záujmové územie.



Obr. 1. Vybrané lokality liahnísk komárov v Bratislave.
A, pod hradom Devín; B, Rusovce; C, pod prístavným mostom.

V rámci rutinných kontrol sú monitorované tieto hlavné atribúty: prítomnosť vody v liahnisku (tzv. suché a mokré kontroly) a prítomnosť lariev v liahnisku (ich počet). Nadväzne na to potom prebiehajú zásahy s látkou Bti proti kalamitnému premnoženiu komárov a následná kontrola účinnosti zásahu.

Na základe uvedených sledovaných úkonov súvisiacich s monitoringom komárov sme vytvorili bodovací systém (Tab. 2,) tzv. dynamiky liahnísk, ktorý je založený na pridelení bodových hodnôt bežným monitorovacím úkonom. Čím dosiahlo liahnisko vyššiu bodovú hodnotu, tým viac možno naň upriamiť pozornosť pri kalamitných situáciách a ďalších rutinných kontrolách. Rovnako táto analýza pomôže pri plánovaní ďalších monitorovacích sezón, čo pomáha zefektívniť časovú náročnosť monitoringu a finančné náklady.

Tab. 2. Bodové hodnotenie jednotlivých monitorovacích úkonov kalibrované na sezónu 2022

Monitorovací úkon	Bodové hodnotenie
suchá kontrola	0
mokrú kontrolu	1
kalamitná kontrola (nadlimitný počet lariev na kontrolu)	3
zásah látkou Bti	5

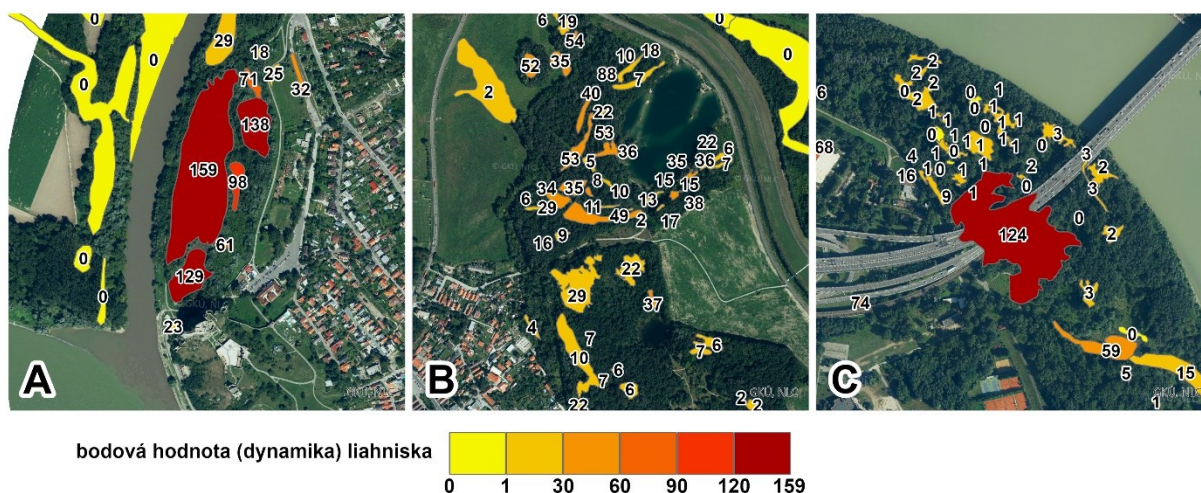
Výsledky a diskusia

V sezóne 2022 bolo na území Bratislavy vykonaných spolu skoro 7000 kontrol liahnísk komárov (Tab. 3). Zvýšenú aktivitu kalamít (a teda aj kontrol) pozorujeme pri rieke Morava v mestskej časti Devínska Nová Ves a Devín (lokalita A) a pri rieke Dunaj prakticky vo všetkých obciach v bezprostrednej blízkosti, najmä Rusovce (lokalita B), Jarovce, Petržalka (lokalita C).

Tab. 3. Rutinné kontroly liahnísk komárov na území mesta Bratislava v sezóne 2022.

Mestská časť	suché kontroly	mokrú kontroly	kontroly spolu	počet kalamít
Bratislava-Čunovo	201	235	436	16
Bratislava-Devín	322	154	476	49
Bratislava-Devínska Nová Ves	796	225	1022	33
Bratislava-Dúbravka	221	79	300	23
Bratislava-Jarovce	102	187	289	70
Bratislava-Karlova Ves	124	197	321	51
Bratislava-Lamač	44	65	109	14
Bratislava-Nové Mesto	82	65	147	11
Bratislava-Petržalka	475	237	712	70
Bratislava-Podunajské Biskupice	586	229	816	40
Bratislava-Rača	146	180	326	41
Bratislava-Rusovce	394	562	956	85
Bratislava-Ružinov	211	264	475	46
Bratislava-Staré Mesto	76	89	165	23
Bratislava-Vajnory	110	178	288	31
Bratislava-Vrakuňa	3	6	9	1
Bratislava-Záhorská Bystrica	35	53	88	6
spolu	3928	3005	6935	610

Bodové hodnotenie liahnísk dosahovalo hodnoty od 0 – 159 (Obr. 2). Liahniská s nulovou hodnotou boli prevažne tie, na ktorých sa počas celej sezóny nevykonala kontrola, ktorá by odhalila prítomnosť vody. Takýmto spôsobom sme sa snažili zbytočne nevytvárať falošné „heat spots“. Mokré kontroly však už v rámci hodnotenia boli brané do úvahy.



Obr. 2. Bodová hodnota vybraných liahnísk komárov v Bratislave.

A, pod hradom Devín; B, Rusovce; C, pod prístavným mostom.

Z vybraných lokalít, ktoré sme vybrali ako ukážku vieme popísať 3 rôzne typy výsledkov, na základe ktorých môžeme zhodnotiť dynamiku klastra liahnísk počas

monitorovacej sezóny 2022. Prvá lokalita A pod hradom Devín indikuje vysokú dynamickosť, kde hodnoty naberajú maximum. Tu môžeme hovoriť o vysokom riziku kalamity a zvýšenej potrebe monitoringu, keďže okrem iného ide aj o turisticky exponované miesto. Lokalita B v okolí Rusovského jazera vykazuje hodnoty maximálne pod mediánom, pričom zvyšné plochy oscilujú v nižších hodnotách, ktoré ale nemôžeme považovať za bezvýznamné. Môžeme len hypotetizovať, že miestne liahniská sú pod silným vplyvom úrovne hladiny podzemnej vody a preto v rámci tohto územia môžeme pozorovať vyššiu variabilitu hodnôt. V tomto prípade je na relevantné zhodnotenie lokality potrebná bližšia analýza zozbieraných dát. Pod prístavným mostom na Petržalskej strane Dunaja v lokalite C môžeme pozorovať centrálné liahnisko s vysokými maximálnymi hodnotami s okolitými, ktoré nadobúdajú zanedbateľné hodnoty. Pri tomto území stojí za zváženie, či centrálné liahnisko netreba nejako prekresliť, pretože je relatívne veľké a s najväčšou pravdepodobnosťou nebude aktívne na celej ploche pri každej kalamite. Takéto úpravy sa však vždy verifikujú v teréne.

Bodovací systém bol pri vyhodnotení sezóny 2022 použitý prvýkrát vôbec, preto má svoje limitácie a treba ho chápať ako akýsi indikačný index. Na jednej strane nám pomáha s identifikáciou najdynamickejších liahnísk, čiže z pomerne veľkého súboru potenciálnych liahnísk sa dokážeme sústrediť na tie rizikové z pohľadu tvorby kalamity. Súčasný systém však vysoko boduje najmä frekvenciu počtu mokrých kontrol a vôbec nezohľadňuje veľkosť liahniska, ani počet lariev pri kontrolách. Teoreticky teda môže nastať situácia, že existujú rozlohou veľké liahniská, ktoré sú väčšinu sezóny vyschnuté, pretože sú napr. v dosahu len naozaj veľkých záplav (s ročnou a nižšou frekvenciou). Keď však táto povodňová situácia nastane a obrovská plocha liahniska sa zaleje vodou, okamžite sa vytvoria vhodné podmienky pre rýchle množenie komárov. Vzhľadom k tomu, že monitorovanie komárov v blízkosti Moravy a Dunaja neprebíha dostatočne dlhú dobu, v tejto chvíli tieto kritické miesta nie sú identifikované a ani systém bodovania ich vďaka prevahe suchých kontrol nevyhodnocuje (resp. podhodnocuje) ako mimoriadne rizikové. Preto je dôležité pokračovať v monitoringu komárov a ďalšom vyhodnocovaní jeho výsledkov.

Záver

V minulosti sa práce zameriavali najmä na zisťovanie priestorového rozloženia druhov [1,4], pričom priestorové rozloženie liahnísk sme podrobne riešili v predošlom príspevku [2]. Pri tejto práci sa však využili dáta z pravidelného monitoringu zmapovaných liahnísk pri tvorbe bodovania, ktoré poskytuje určité indikačné hodnoty z kvalitatívneho hľadiska chápania dynamiky tohto biotopu. Takýmto spracovaním dát sme docielili indikačné zhodnotenie liahnísk

komárov, ktoré vypovedá o ich dynamike počas monitorovacej sezóny 2022. Tieto výsledky vieme využiť na zefektívnenie monitoringu pre ďalšie sezóny, čo zahŕňa lepšie personálne rozdelenie do oblastí, či presnejšia príprava materiálu potrebného na zásahy.

Regulácia kalamít komáríh populácií v oblastiach v blízkosti osídlenia je dôležitá z hľadiska kvality života, ale aj z hľadiska medicínskeho. V súčasnosti už bol zaznamenaný výskyt problematického druhu *Aedes japonicus*, ktorý by mohol byť potenciálnym vektorom rôznych závažných chorôb [5]. Kvôli klimatickej zmene a vysokej frekvencií dopravy medzi kontinentami šíreniu takýchto druhov nevieme zabrániť, ale plošnou reguláciou populácie ho môžeme aspoň čiastočne obmedziť.

PodĎakovanie

Ďakujeme Magistrátu Hlavného mesta Slovenskej republiky Bratislava (Sekcia životného prostredia) za poskytnutie dát z monitorovacej sezóny 2022.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Strelková L. (2012) Spoločenstvá komárov (Diptera, Culicidae) v povodí riek Morava a Dunaj. (Dizertačná práca) Univerzita Komenského v Bratislave
- [2] Ferencei S., Rusinko A. (2022). Študentská vedecká konferencia PriF UK 2022, Zborník recenzovaných príspevkov, Bratislava, SR, p. 1026
- [3] Geoportál [Citované: 20. november 2021] <<https://www.geoportal.sk/sk/zbgis/lis-dmr/>>
- [4] Jalili N., Halgoš J. (2004) J. Eu Mosquito Contr. 18, p. 30
- [5] Čabanová V., Boršová K., Svitok M., et al. (2021) Parasites & Vectors 14(1) a. 572

Dostupnosť MHD v Bratislave s využitím dát GTFS

Richard Hluško

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra ekonomickej a sociálnej geografie, demografie a územného rozvoja, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; hlusko1@uniba.sk

Abstract

Using GTFS data as a tool of public city transport accessibility in Bratislava city

Paper deals with the public city transport system in Bratislava city based on GTFS data. We try to demonstrate the results of using obtained GTFS data through GIS software. The results of paper point out the spatial heterogeneity of Bratislava city in terms of the offer of public city transport services as well as the walking accessibility to public city transport.

Keywords: *accessibility; public city transport; GTFS data; GIS*

Úvod a formulácia cieľov

Mestská hromadná doprava (MHD) je považovaná za pomerne zložitý dynamický systém, ktorý sa nachádza pod vplyvom časových, ale aj priestorových zmien. V mestskom prostredí má efektívnosť dopravy vplyv nielen na miestnu a regionálnu produktivitu, ale má vplyv aj na kvalitu života obyvateľov [1]. Sledovať stav, prípadne zmeny infraštruktúry, frekvencie spojení alebo ďalšie ukazovatele MHD najmä vzhľadom k obyvateľstvu považujeme za dôležité.

V posledných rokoch sa dáta o doprave stávajú čoraz dostupnejšími, čo platí aj v prípade MHD Bratislava. Dopravné podniky v európskom, ale aj celosvetovom priestore v súčasnosti už zverejňujú svoje údaje o dopravnom systéme vo formáte GTFS (General Transit Feed Specification), kedy existuje možnosť spájať ich s priestorovými a časovými charakteristikami [2]. Na Slovensku však tento formát dát dopravného systému využívaný príliš nie je. Využívané dáta v príspevku vo formáte GTFS boli v literatúre opísané už niekoľkokrát [3]. V princípe sa jedná o textové súbory s relačným vzťahom, reprezentujúce niekoľko častí dopravného systému MHD (zastávky, linky, časy odchodov a príchodov, frekvencia spojení a ďalšie). V súčasnosti sa využívajú na logistiku, optimalizáciu dopravnej trasy, maximalizáciu kapacity a rôzne analýzy dopravných podnikov [2], tiež pre implementáciu do Google Maps, kedy dáta MHD môže verejnosť efektívnou cestou využiť v rámci navigácie k cieľu prepravy [2, 4]. Rovnako tiež existuje veľké množstvo ďalších možností ich vizualizácie [5, 6].

Hlavným cieľom príspevku je poukázať na príklade analýzy dostupnosti MHD v Bratislave na niektoré možnosti využitia dát vo formáte GTFS v rámci prostredia ArcGIS Pro.

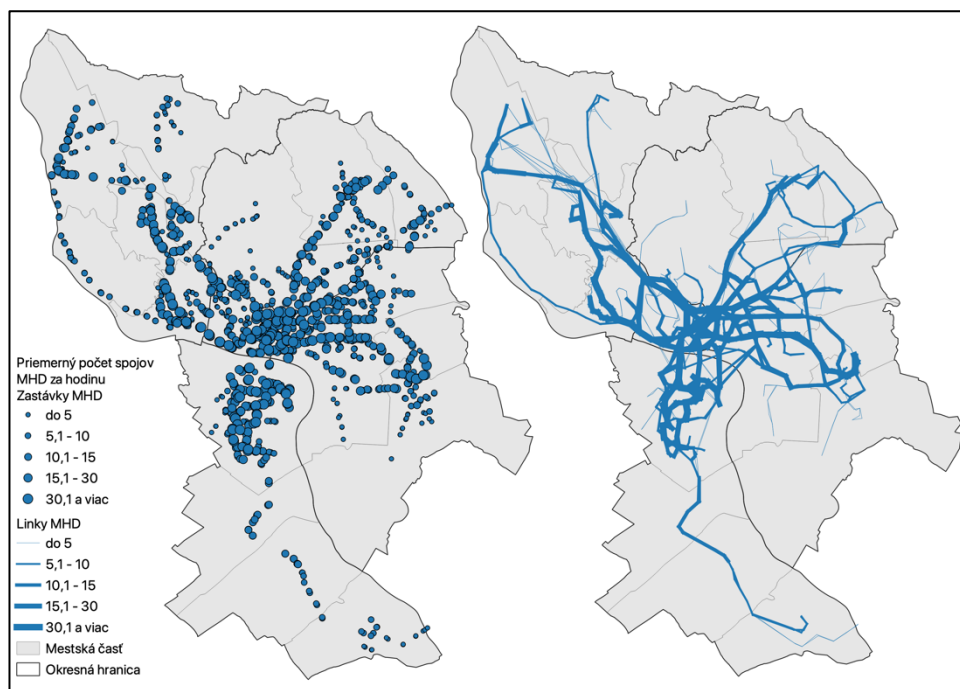
Materiál a metódy

Kľúčovým základom analýzy dostupnosti MHD je dátový model verejnej osobnej dopravy (Public Transit Data Model), vytvorený prostredníctvom nástrojov pre verejnú osobnú dopravu v prostredí ArcGIS Pro, ktorý vychádza práve z dát vo formáte GTFS pre bratislavskú MHD [7]. Bola tak vytvorená kompletná sieť dopravného systému MHD reprezentovaná bodmi (zastávkami MHD) a líniami (linky MHD). V rámci ArcGIS Pro nástrojov pre verejnú osobnú dopravu je okrem samotnej tvorby dátového modelu možné vypočítať frekvenciu dopravných spojení vzhľadom k zastávkam, linkám MHD alebo aj k zóne pešej alebo inej dostupnosti (tzv. Service area) a rovnako tiež v rôznych časových rezoch, či dátumoch. V rámci analýzy pešej dostupnosti k zastávkam MHD bola využitá sieť pozostávajúca z ciest a chodníkov, v ktorej neboli nastavené žiadne obmedzenia [8]. Pre výpočet podielu obyvateľstva v zónach pešej dostupnosti sme postupovali vytvorením samostatných tzv. Service Area v nástrojoch Network Analysis, kedy bola využitá rovnaká sieť. Dôvodom, prečo sme využili aj tento postup je, že práve nástroj pre verejnú osobnú dopravu vytvára zóny dostupnosti prostredníctvom „rastrových“, resp. obdĺžnikových polygónov, ktoré pre výpočty podielov obyvateľstva v dostupných zónach k MHD sú príliš agregujúce. Podiely obyvateľstva v jednotlivých zónach dostupnosti k MHD boli vypočítané na základe dezagregácie obyvateľstva do obytných budov (rodinné domy, bytové domy a polyfunkčné budovy - kombinácia bytového domu a služieb, obchodu) podľa metodiky autorov Kusendová, Ďurček (2019) a následného priradenia k zóne, v ktorej sa nachádza (ak existoval prekryv k dvom zónam, využila sa funkcia priradenia k zóne dostupnosti podľa veľkosti plochy budovy, ktorú pokrýva) [9]. Treba dodať, že GTFS sú pomerne aktuálne a údaje sú analyzované ku dňu 15.2.2023.

Výsledky a diskusia

Za základný výstup môžeme okrem samotného vykreslenia dopravného systému MHD Bratislavy považovať frekvenciu dopravných spojení, v tomto prípade priemerne za 24 hodín (Obr. 1.). Z priestorového hľadiska a hustoty zastávok s vysokou frekvenciou veľmi evidentne dominuje mestská časť Staré Mesto. Pomerne výrazne slabšie zastúpenie dopravných spojení v priebehu dňa majú mestské časti Jarovce, Rusovce, Čunovo, Devín, Podunajské Biskupice alebo aj severná časť mestskej časti Nové Mesto. Je to pozorovateľné okrem jednotlivých

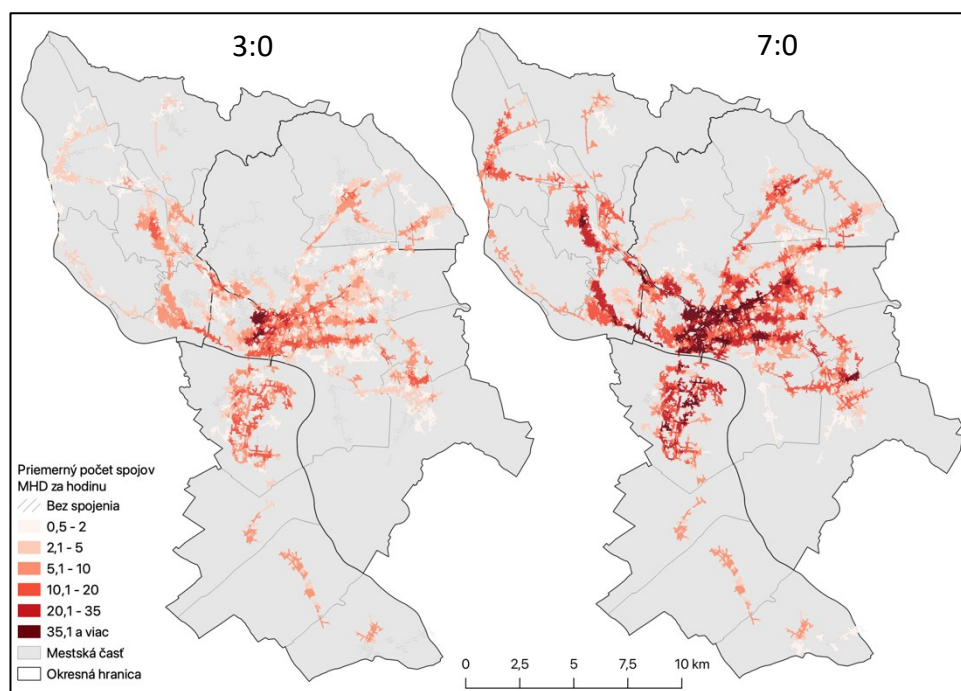
zastávok MHD aj v rámci reprezentácie liniek MHD, kedy je skutočne intenzita prepravy nižšia oproti centrálnejším mestským častiam. Intenzívne priestorové väzby v rámci MHD môžeme sledovať medzi mestskými časťami Petržalka, Staré Mesto a Ružinov, zatiaľ čo ostatné sú mestskými časťami, cez ktoré prechádza dominantná dopravná radiála (Karlova Ves, Dúbravka a Devínska Nová Ves na jednej strane a na druhej Nové Mesto a Rača). Vyplýva to najmä z charakteru výstavby jednotlivých mestských častí.



Obr. 1. Priemerný počet spojov MHD Bratislava za 24 hodín
(databáza GTFS, Dopravný podnik Bratislava; GKÚ)

Jednou z možností ako demonštrovať dostupnosť MHD okrem ponuky spojov je prostredníctvom jej kombinácie so zónami pešej dostupnosti (bola zvolená hranica 400 metrov, ktorá zodpovedá približne 5 minútam chôdze). Treba poznamenať, že okrem sledovania verejnej osobnej dopravy v statickom stave počas jedného dňa je dôležité sledovať MHD aj v rôznych časových rezoch, nakoľko percepcie obyvateľov sa v priebehu dňa menia [10]. Keďže túto možnosť nástroje ArcGIS Pro ponúkajú, pre výrazný kontrast frekvencie spojov MHD sme si vybrali časové okno o 3:00 hodine ráno reprezentujúce nočné spoje a o 7:00 hodine, ktorý reprezentuje čas odchodu obyvateľov do zamestnania alebo škôl. Počet spojov bol sledovaný priemerne za dve hodiny. Výrazný rozdiel v počte spojov je signifikantný najmä v okrajových mestských častiach, v niektorých miestach (okolie závodu Slovnaft, časť územia Podunajských Biskupíc, Čunova, Nového Mesta a Záhorskej Bystrice) dokonca nočné spoje

oproti dennej dobe nepremávajú, čím sa obsluhované územie pomerne výrazne znižuje. Nočné spoje vykazujú najvyššiu intenzitu v centre mesta, konkrétne v okolí Hlavnej stanice a zastávok Kollárovo námestie a Zochova, ktoré patria medzi významné dopravné body. Naopak, vyššia intenzita spojení MHD je podobne ako bolo popísané vyššie v centrálnej časti mesta, mestskej časti Petržalka a Ružinov. Okrajové časti majú v priebehu dňa výrazne vyššiu intenzitu spojení ako napr. Devínska Nová Ves.

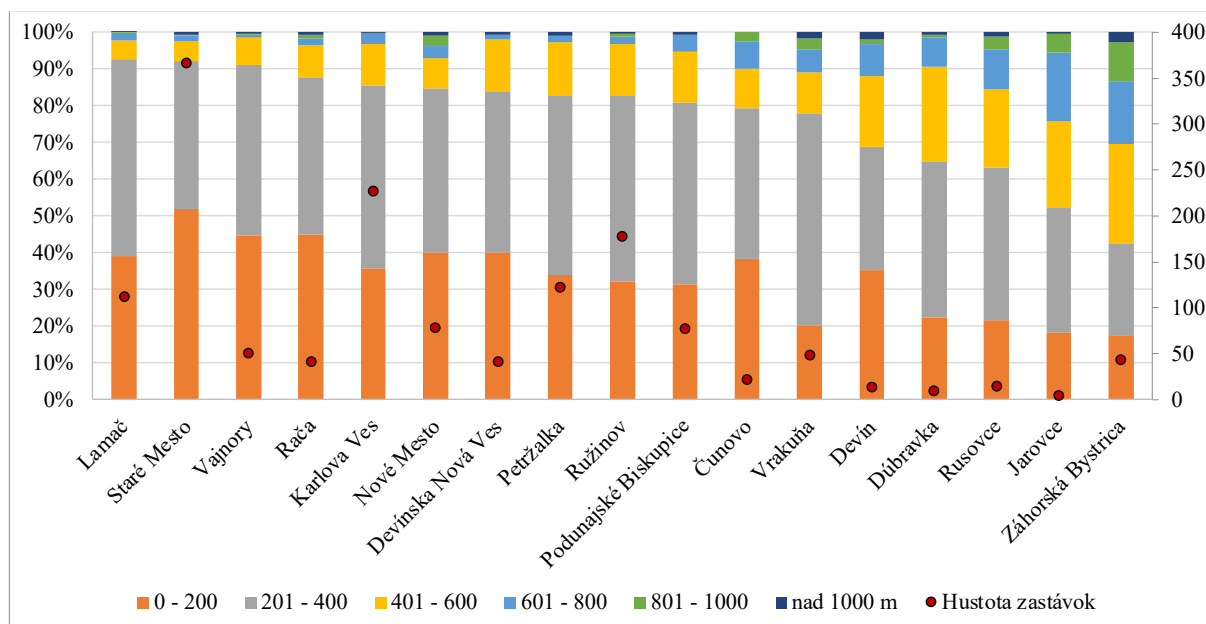


Obr. 2. Priemerný počet spojov MHD Bratislava dvoch časových rezov v zóne pešej dostupnosti zastávok MHD do 400m

(databáza GTFS, Dopravný podnik Bratislava; GKÚ)

Doteraz uvedené výsledky skôr ukazovali výsledky vychádzajúce z databázy GTFS pomocou vytvorenia modelu MHD v prostredí ArcGIS Pro a jeho funkčných nástrojov. Pri Obr. 3., sledujúc podiel obyvateľov v zónach pešej dostupnosti MHD, však využívame jemne odlišný prístup, vid'. druhý postup v metódach výskumu. Vzhľadom k použitiu dezagregácie obyvateľstva môžeme hovoriť o približnej hodnote v rámci dostupnosti obyvateľov v jednotlivých zónach od zastávok MHD. Napriek tomu, je zjavné, že mestské časti Lamač, Staré Mesto a Vajnory majú podiel obyvateľov v dostupnosti do 400 metrov od zastávky nad 90%, čo značí skutočne dobrú dostupnosť k MHD. Staré Mesto a Karlova Ves sa okrem relatívne dobrej dostupnosti k MHD vyznačujú vysokou hustotou zastávok (v Obr. 3. hustota zastávok vyjadrená ako vzťah počtu zastávok a podielu obytnej plochy z celkovej plochy

mestskej časti) MHD. Naopak, už spomínané mestské časti Devín, Rusovce, Jarovce majú podiel obyvateľov v tejto vzdialenostnej zóne pod 70%. Špecifickou mestskou časťou sa javí Záhorská Bystrica, ktorá má do 400 metrov od zastávky MHD len niečo cez 40% obyvateľov a zároveň je najvýraznejšie zastúpená v hodnotách nad 600 metrov, resp. nad 800 metrov, čo môžeme považovať za mestskú časť s najhoršou dostupnosťou k MHD. Dôvodom však je skôr charakter zástavby, kedy sa jedná o mestskú časť s vysokým zastúpením rodinných domov, čo značí do istej miery nižšie zastúpenie obyvateľstva v jednotlivých zónach, ale rovnako tiež aj výrazne väčšiu priestorovú heterogénnosť. V porovnaní s mestskou časťou Vajnory však má približne rovnakú hustotu zastávok, čo do dôsledku značí, že Záhorská Bystrica má v rámci obce výrazne horšiu priestorovú diferenciáciu zastávok vo vzťahu k obyvateľom.



Obr. 3. Podiel obyvateľov v zónach pešej dostupnosti zastávok MHD Bratislava

(zoradené podľa podielu obyvateľov v zónach do 400m; databáza GTFS, Dopravný podnik Bratislava; GKÚ)

Záver

Alternatívnych analýz dostupnosti MHD v prostredí mesta Bratislavy môže byť skutočne viacero. V príspevku boli načrtnuté základné možnosti práce s dátami dopravného systému MHD vo formáte GTFS na príklade mestských častí Bratislavy. Výsledky poukazujú na niektoré priestorové rozdielnosti sledovaného regiónu, najmä vzhľadom na dostupnosť obyvateľov k infraštruktúre MHD. Centrum mesta Bratislavy je charakteristické dobrou dostupnosťou MHD z viacerých dôvodov - lokalizácia vysokého podielu zamestnanosti,

cestovný ruch alebo rôzne ďalšie. Okrajové časti sa naopak vyznačujú slabšou frekvenciou počtu spojov a tiež horšou dostupnosťou k zastávkam MHD. Rovnako príspevok poukázal na časové rozdielnosti v ponuke dopravných spojení MHD v priebehu dvoch vybraných časových rezov. Evaluácia mestských častí vzhľadom na dostupnosť MHD však môže v budúcnosti prebehnúť na základe kombinácie predstavených (a ďalších) ukazovateľov, čím sa dosiahne komplexnejšia predstava o dostupnosti MHD v Bratislave.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Albalade D., Bel G. (2010) Transportation Research Part E: Logistics and Transportation Review, 46(5), p. 775
- [2] Chondrodima E., Georgiou H., Pelekis N., et al. (2022) International Journal of Information Management Data Insights. 2(2), p. 100086
- [3] Google - GTFS - Static Transit – Reference. [Citované: 1. marec 2023] <<https://developers.google.com/transit/gtfs/reference>>
- [4] Velasquez Ortiz R. A., Álvarez Rodríguez F. J., Vargas Martin M., et al. (2020) Advances in Emerging Trends and Technologies. 1. p. 177
- [5] Prommaharaj P., Phithakkitnukoon S., Demissie M. G., et al.(2020) Heliyon, 6(4), p. e03729
- [6] Kunama N., Worapan M., Phithakkitnukoon S., et al. (2017) Proceedings of the 2017 ACM International Joint Conference on Pervasive and Ubiquitous Computing and Proceedings of the 2017 ACM International Symposium on Wearable Computers. p. 388
- [7] Open Data Bratislava - Cestovné poriadky bratislavskej mestskej hromadnej dopravy od roku 2020 - 20230227 [Citované: 1. marec 2023] <<https://opendata.bratislava.sk/dataset/show/cestovny-poriadok-20230227>>
- [8] GKÚ (2016) Mapový klient ZBGIS®. 2017. <<https://zbgis.skgeodesy.sk/tkgis/default.aspx>>
- [9] Kusendová D., Ďurček P. (2019) Demografie. 61(3), p. 222
- [10] Horák J., Ivan I., Fojtík D. (2015) Time of Day Dependency of Public Transport Accessibility in the Czech Republic. In: Ivan, I. et al., Geoinformatics for Intelligent Transportation, Springer International Publishing, p. 93

Modelovanie a predikcia zmien krajinnej pokrývky, prípadová štúdia: okres Piešťany

Marcel Hudcovič

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyzickej geografie
a geoinformatiky, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
hudcovic3@uniba.sk*

Abstract

Modeling and prediction of land cover changes, case study: Piestany district

The paper deals with the issue of predicting changes in land cover based on changes in the past from different time periods in the district of Piestany. The prediction of land cover changes and its realization is based on existing CORINE Land Cover data of the third hierarchical level, which were reclassified into categories according to the IPCC - AFOLU methodology. The results of the work include an analysis of changes in the past, the results of modeling transition potentials and the prediction of changes in land cover, which in one case is supplemented by validation.

Keywords: *land cover; land cover changes; prediction of changes; CORINE Land Cover*

Úvod a formulácia cieľa

Výsledky ľudskej činnosti a klimatických zmien neboli v krajine nikdy tak viditeľné a vnímateľné, ako je tomu teraz. Súčasný rozvoj diaľkového prieskumu a technológií GIS nám dovoľuje tieto zmeny vnímať nielen na lokálnej, ale aj globálnej úrovni. Krajinná pokrývka sa stala, najmä vďaka rozvoju a dostupnosti projektov ako CORINE Land Cover, jednou z najdôležitejších informačných zdrojov o stave krajiny. Zmeny krajinnej pokrývky a ich monitorovanie vedú k pochopeniu stavu krajiny a lepšiemu rozhodovaniu v krajinnom plánovaní. Predikcia týchto zmien nám dáva možnosť ich mapovať do budúcnosti, a tak pomôcť predísť prípadnému zlému manažmentu krajiny [1].

Cieľom príspevku je modelovanie a predikcia zmien krajinnej pokrývky z rôznych časových období na území okresu Piešťany. Ako zdroj údajov o krajinnej pokrývke budú použité existujúce údaje CLC tretej hierarchickej úrovne reklasifikované podľa metodiky IPCC – AFOLU. Predikcia zmien krajinnej pokrývky bude v prvom prípade realizovaná pre rok 2018, na základe zmien v období 1990 až 2006, pričom táto predpovedaná krajinná pokrývka bude porovnávaná s reálnou krajinnou pokrývkou v roku 2018. V druhom prípade bude krajinná pokrývka predpovedaná v roku 2046 pre zistenie možných zmien, ktoré môžu nastať v budúcnosti [1].

Materiál a metódy

Hodnoteniu zmien krajinnej pokrývky je vo svete aj na Slovensku venovaná dostatočne veľká pozornosť, zatiaľ, čo samotná predikcia týchto zmien je rozšírená len vo svete [2][3]. Väčšina autorov používa tretiu hierarchickú úroveň CLC, v tomto príspevku sa viacej osvedčila kategorizácia podľa metodiky IPCC – AFOLU, najmä pre jej environmentálne ciele a menší počet kategórií krajinnej pokrývky [1]. Kategorizácii tried krajinnej pokrývky v zmysle IPCC – AFOLU z tried tretej hierarchickej úrovne CLC sa venuje vo svojej práci Guľanová (2020) [4].

Pri realizovaní prípadovej štúdie príspevku boli využité technologické prostredia softvérov ArcGIS Pro a TerrSet, v rámci ktorého sa používal vertikálne integrovaný softvér Land Change Modeler (ďalej ako LCM).

Analýza zmien je prvý krok v procese modelovania predikcie zmien v LCM. V tomto kroku je zmena analyzovaná na základe dvoch máp krajinnej pokrývky z dvoch rôznych časových období. V tomto kroku je dôležité najmä identifikovať si submodely, čo sú dominantné zmeny, ktoré môžu byť zoskupené a modelované. Každý submodel môže byť modelovaný samostatne, no všetky submodely budú skombinované v konečnej predikcii zmien [5].

Tab. 1. Zmeny medzi vrstvami krajinnej pokrývky z roku 1990 a 2006 a ich priradenie k submodelu
Zdroj: [1]

Zmena		Názov submodelu
Z	Na	
Lesné porasty	Orná pôda	Intenzifikácia poľnohospodárstva
Trávnaté porasty	Lesné porasty	Zalesňovanie
Orná pôda	Lesné porasty	Zalesňovanie
Orná pôda	Sídlna zástavba	Urbanizácia

Druhým krokom je modelovanie potenciálov prechodu, ktoré nám určuje potenciál územia k jeho budúcej zmene. Zmeny by mali byť zoskupené v jednom submodele iba vtedy, keď k ich zmene prispievajú rovnaké hnacie sily. Pre každý submodel sú definované jeho hnacie sily vysvetľujúcimi premennými. Tieto premenné môžu byť buď statické alebo dynamické. Statické premenné sa nám nemenia v čase, zatiaľ čo dynamické sú časovo závislé a sú prehodnocované v procese predikcie. Určené vysvetľujúce premenné boli inšpirované autorkami [4]. Na modelovanie potenciálov prechodu bola použitá metodika MLP [5], ktorá

môže modelovať viacero zmien naraz. Na začiatku MLP začne trénovať na vzorke získanej z pixelov, na ktorých zmena buď prebehla alebo neprebehla. Na základe tohto MLP vstúpi do automatického módu, kedy sám rozhodne o parametroch vhodných pre najlepšie modelovanie [5].

Tab. 2. Vysvetľujúce premenné použité pre submodely na modelovanie potenciálov prechodu pre predikciu 2018

Zdroj: [1]

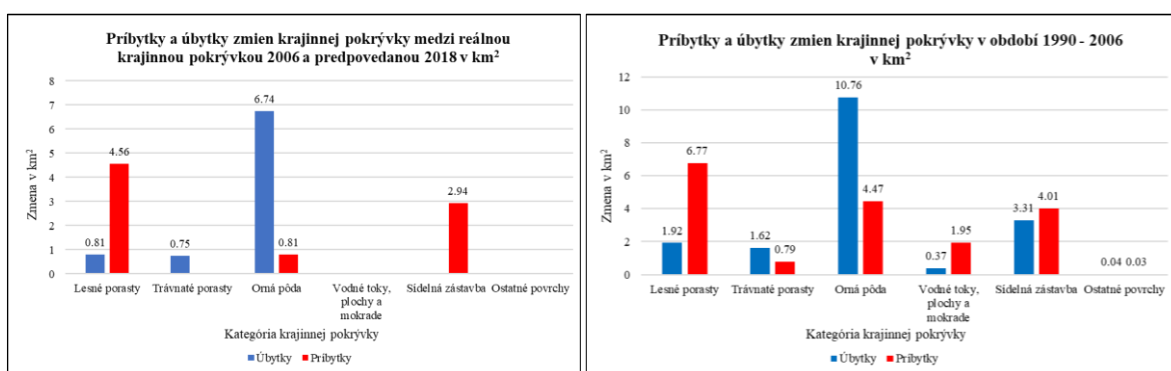
Submodely	Zalesňovanie	Intenzifikácia poľnohospodárstva	Urbanizácia
Označenie premennej	Vysvetľujúce premenné		
1	nadmorská výška		
2	sklon reliéfu		
3	vzdialenosť od ciest		
4	vzdialenosť od vodných tokov		
5	vzdialenosť od miest		
6	vzdialenosť od miest, kde nastalo zalesňovanie v období 1990-2006	vzdialenosť od miest, kde nastala intenzifikácia poľnohospodárstva v období 1990-2006	vzdialenosť od miest, kde nastala urbanizácia v období 1990-2006
7	vzdialenosť od lesných porastov v roku 1990	vzdialenosť od ornej pôdy v roku 1990	vzdialenosť od sídelnej zástavby v roku 1990

Posledný krok je samotná predikcia zmien krajiny pokrývky. LCM vie predpovedať zmeny pre špecifický dátum v budúcnosti na základe predchádzajúcich veľkostí zmien a modelu potencionálneho prechodu. Model určí, ako veľmi premenné ovplyvnia zmenu v budúcnosti, aká veľká zmena sa udiala v predchádzajúcich rokoch a nakoniec vypočíta relatívnu veľkosť zmien do budúcnosti. Markov reťazec [5] je základná procedúra pre určovanie množstva zmeny, ktorá nastane niekedy v budúcnosti. Markov proces znamená, že stav systému môže byť určený na základe poznania jeho predošlého stavu a pravdepodobnosti zmeny z jedného stavu na iný stav. LCM nám dáva možnosť modelovať dve možnosti predikcie zmien: tvrdú a mäkkú predikciu. Tvrdá predikcia je výsledkom modulu vo forme mapy krajiny pokrývky. Mäkká predikcia v podstate mapuje náchylnosť k zmene. Neukazuje nám, čo presne sa zmení, ale stupeň, či majú územia vhodné podmienky na zmenu. Validácia nám ukáže kvalitu predpovedaných zmien v porovnaní s realitou. Výsledky sú prezentované pomocou troch modelov: Hits (predpovedaná zmena prebehla aj v realite), Misses (zmena prebehla v realite, ale nebola predpovedaná), False Alarms (zmena bola predpovedaná, ale

neprebehla v realite) [5].

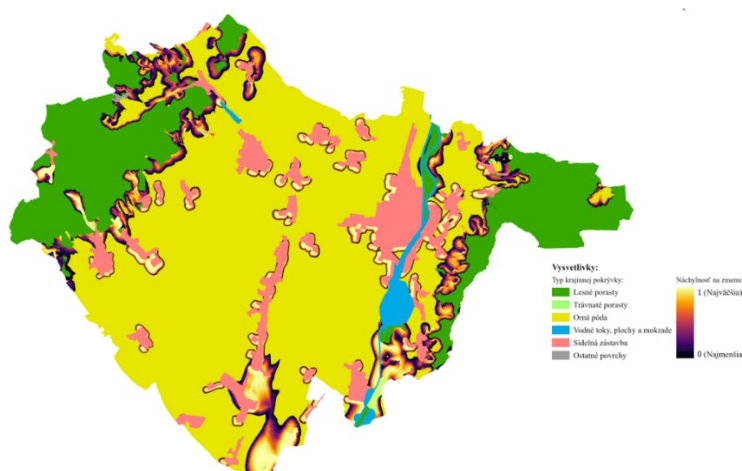
Výsledky a diskusia

Predikcia krajinej pokrývky v roku 2018 bola modelovaná pomocou údajových sád krajinej pokrývky z roku 1990 a 2006. Prírbytky a úbytky zmien v tomto období sú znázornené na Obrázku č. 1. Najvyššiu presnosť modelu MLP malo modelovanie submodelu Urbanizácia, zatiaľ čo najmenšiu presnosť mal submodel Zalesňovanie. Vo všetkých troch modelovaniach boli najvplyvnejšie premenné tie, ktoré mali súvis s krajinou pokrývkou alebo jej zmenou. Vrstva mäkkkej predikcie nám poslúžila na vytvorenie mapy náchylnosti na zmenu, ktorú môžeme nájsť na Obrázku č.2. Samotná predpovedaná krajinná pokrývka bola obsiahnutá vo vrstve tvrdej predikcie. Zmeny, ktoré nastali medzi reálnou krajinou pokrývkou v roku 2006 a predpovedanou krajinou pokrývkou v roku 2018, sú zobrazené na Obrázku č.1 [1].



Obr. 1. Prírbytky a úbytky zmien krajinej pokrývky v období 1990 - 2006 v km² a medzi reálnou krajinou pokrývkou 2006 a predpovedanou 2018 v km²

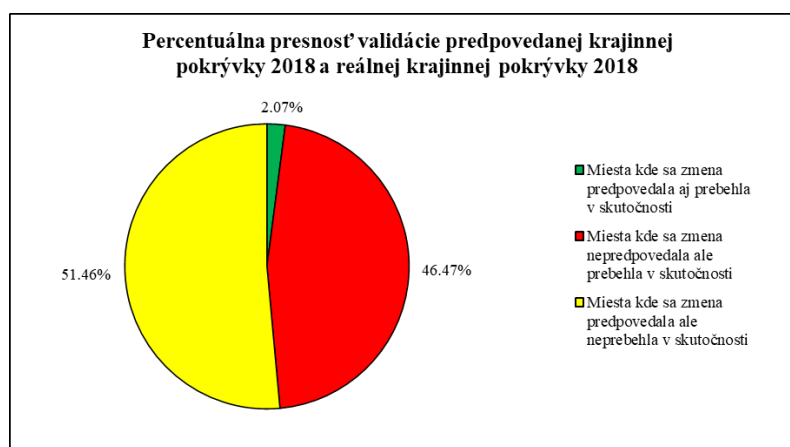
Zdroj: [1]



Obr. 2. : Mapa náchylnosti na zmenu v období 2006-2018 (mäkkká predikcia)

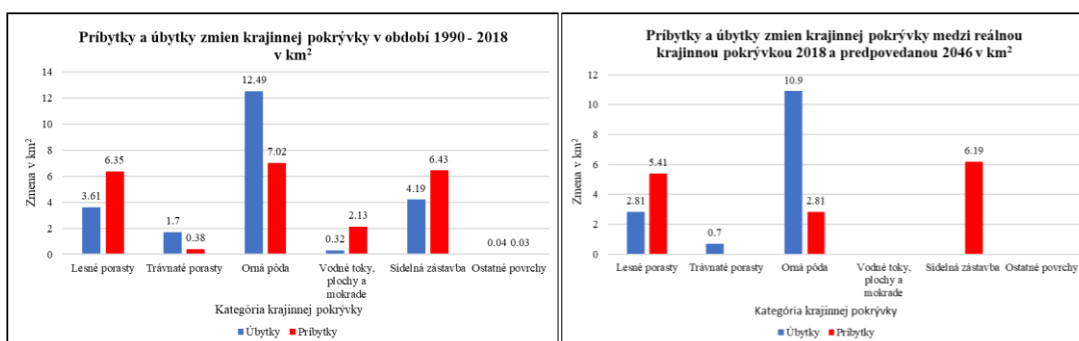
Zdroj: [1]

Po predikcii krajinej pokrývky v roku 2018 sa vykonala validácia s reálnou krajinnou pokrývkou v roku 2018. Výsledky tejto validácie nám ukazuje Obrázok č. 3 [1].



Obr. 3. Percentuálna presnosť validácie predpovedanej krajinej pokrývky 2018 a reálnej krajinej pokrývky 2018
Zdroj: [3]

Proces predikcie krajinej pokrývky v roku 2046 je skoro identický, ako proces predikcie krajinej pokrývky v roku 2018. Výsledky analýzy zmien, ako aj veľkosti území jednotlivých kategórií, nám ukazuje Obrázok č.4. Presnosť modelu sa od predchádzajúceho merania výrazne nelíši. Pri všetkých troch submodeloch sa ako najvplyvnejšia premenná preukázala vzdialenosť od miest, kde prebehla zmena. Po vymodelovaní potenciálov prechodu sa znova mohla modelovať predikcia krajinej pokrývky. Zmeny, ktoré prebehli medzi reálnou krajinnou pokrývkou v roku 2018 a predpovedanou krajinnou pokrývkou v roku 2046, nám graficky znázorňuje Obrázok č. 4 [1].



Obr. 4. Prírbytky a úbytky zmien krajinej pokrývky v období 1990 - 2018 v km² a medzi reálnou krajinnou pokrývkou 2006 a predpovedanou 2018 v km²
Zdroj: [1]

Záver

Význam potreby poznania a skúmania krajiny je v súčasnej dobe veľmi dôležitý. Krajinná pokrývka odzrkadľuje stav krajiny a pomáha nám pochopiť prebiehajúce procesy, ovplyvňujúce trend vývoja krajiny. Hlavným cieľom práce bolo priblížiť problematiku a metodiku predikcie zmien krajinnej pokrývky. Výsledky validácie iba potvrdili slabú presnosť tejto metódy. Aj napriek tomu, že najväčší vplyv pri modelovaní zmien do budúcnosti mali práve zmeny v minulosti a vzdialenosť od nich, sa očakávanie, že budúce zmeny sa budú vyvíjať na základe zmien, ktoré nastali v minulosti, sa nepotvrdil, k tomu aby sme dosiahli lepšie výsledky, buď by nesmeli v sledovanom období dôjsť k zmene trendu, alebo by bolo nutné použiť detailné prídavné informácie, ktoré mnohokrát nie sú k dispozícii [6]. Vďaka výsledkom je možné povedať, že proces predikcie krajinnej pokrývky je vhodný používať len na hypotetické predpovedanie budúcnosti. Budúcim vývojom môže táto problematika získať omnoho väčší význam, aký má v súčasnosti a prinášať aj iné výsledky ako hypotetické [1].

PodĎakovanie

PodĎakovanie patrí Mgr. Filipovi Moravčíkovi za usmerňovanie pri bakalárskej práci ktorá je námetom pre tento príspevok.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Hudcovič M. (2022) Modelovanie a predikcia zmien krajinnej pokrývky, prípadová štúdia: okres Piešťany. (Bakalárska práca) Univerzita Komenského v Bratislave
- [2] Corner R. J., Dewan A. M., Chakma S. (2014) Monitoring and Prediction of Land-Use and Land-Cover (LULC) Change. In: Dewan, A., Corner, R. (eds) Dhaka Megacity. Springer Geography. Springer, Dordrecht.
- [3] Leta M. K., Demissie T. A., Träncker J. (2021) Modeling and Prediction of Land Use Land Cover Change Dynamics Based on Land Change Modeler (LCM) in Nashe Watershed, Upper Blue Nile Basin, Ethiopia. Sustainability 2021, 13, 3740.
- [4] Guťanová A. (2020) Hodnotenie zmien krajinnej pokrývky podľa metodiky IPCC, prípadová štúdia: Bratislavský samosprávny kraj. (Bakalárska práca) Univerzita Komenského v Bratislave
- [5] Eastman J. R. (2015) TerrSet manual, 18, p. 390
- [6] Stanková H., Šošovičková L. (2012) Modelovanie a predikcia zmien krajiny s využitím údajov CORINE Land Cover na príklade územia zo severovýchodného Slovenska. Kartografické listy, 21, p. 47

Analýza návštevnosti zápasov futbalových klubov najvyššej futbalovej ligy na Slovensku

Jakub Chrenko

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra ekonomickej a sociálnej geografie, demografie a územného rozvoja, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15, Bratislava, Slovenská republika; chrenko11@uniba.sk

Abstract

Analysis of attendance at matches of football clubs of the highest football league in Slovakia

The aim of the post is to briefly analyze the attendance of the highest Slovak football league before covid and after covid. With this contribution, we want to find out to what extent COVID-19 has affected the attendance of football matches of selected football clubs of the highest Slovak football league. We monitor the attendance of football matches from the 2015/2016 season to the 2021/2022 season.

Keywords: *attendance; football clubs; Covid-19; Slovakia*

Úvod a formulácia cieľa

V príspevku sme sa zamerali na analýzu návštevnosti najvyššej futbalovej ligy na Slovensku v sledovanom období od sezóny 2015/2016 po sezónu 2021/2022. Vo výskume analyzujeme 9 futbalových klubov, ktoré v období 2015/2016 až 2021/2022 hrali najvyššiu futbalovú ligu na Slovensku. Dôraz dávame na pandémiu COVID-19, ktorá úplne zmenila športový život. Podľa [1] COVID-19 výrazne vplýval na návštevnosť futbalových zápasov. Fanúšikovia reagovali na zmeny obmedzení počas pandémie Covid-19. Aj [2] poukazujú na to, že dopyt po návšteve futbalových zápasoch klesol aj v Bielorusku, kde neboli zavedené žiadne obmedzenia. Dopyt najviac klesol na začiatku pandémie, ale postupne sa pomaly dostával na predpandemickú úroveň.

Týmto výskumom chceme zistiť, do akej miery ovplyvnila pandémia COVID-19 futbalové kluby z hľadiska návštevnosti a či pandémia COVID-19 urobila veľký prepád v návštevnosti najvyššej futbalovej ligy na Slovensku.

Materiál a metódy

Na analýzu návštevnosti zápasov futbalových klubov najvyššej futbalovej ligy na Slovensku sme potrebovali vytvoriť databázu, ktorú sme museli manuálne spracovať. Údaje do databázy sme čerpali z webovej stránky futbalnet.sk. Celá databáza je tvorená 7 sezónami a to od sezóny 2015/2016 po sezónu 2021/2022, v ktorých sa celkovo odohralo 1332 zápasov. Pri každom zápase je uvedené domáce, hosťujúce mužstvo, počet divákov, odohraté kolo, typ

zápasu, celkové umiestnenie domáceho mužstva v sezóne a nakoniec aj kapacita štadióna. Na danej webovej stránke sme si museli nájsť každú sezónu a rozkliknúť každý zápas sezóny, aby sme zistili počet divákov na jednotlivých zápasoch.

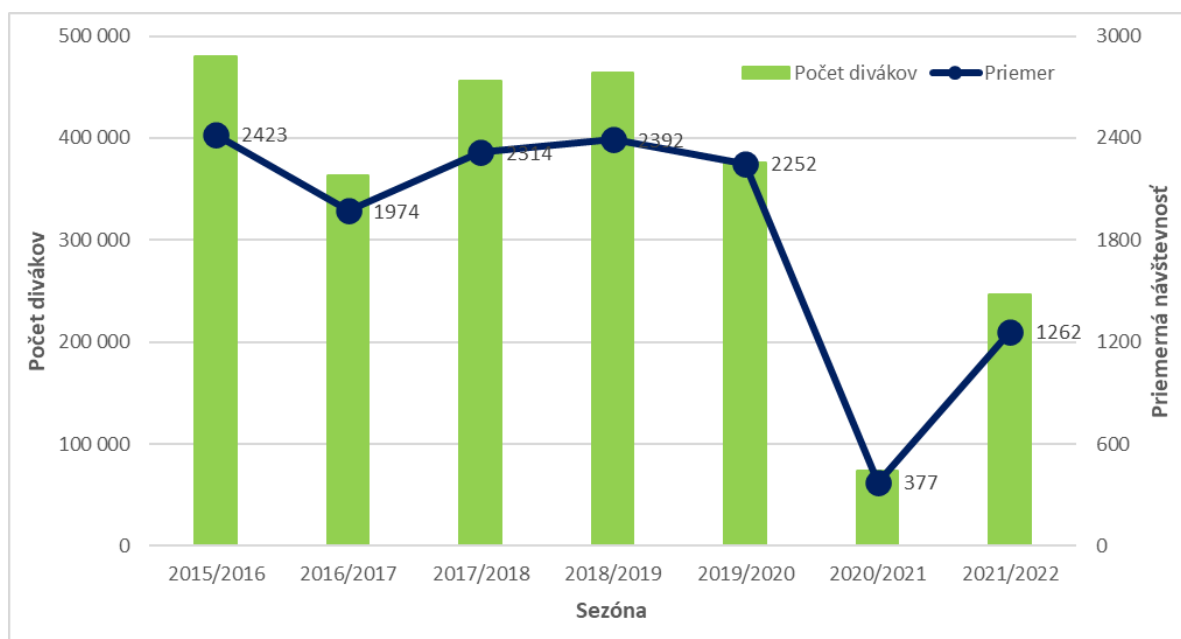
Keď sme si databázu naplnili všetkými údajmi, tak sme prostredníctvom kontingenčnej tabuľky uskutočnili viaceré výpočty napr. sme zistili celkovú a priemernú návštevnosť všetkých klubov za jednotlivé sezóny. Výstupy z databázy sú v podobe grafov a máp. Mapy zobrazujú návštevnosť vybraných futbalových klubov v období pred covidom a po cove. V kartodiagrame sme zobrazili celkovú návštevnosť jednotlivých deviatich klubov.

Výsledky a diskusia

Keď si zhodnotíme celkovú návštevnosť najvyššej slovenskej futbalovej ligy v sledovanom období 2015/2016 až 2021/2022, tak zisťujeme, že pred poklesom v sezóne 2020/2021 na najvyššiu futbalovú ligu na Slovensku chodilo približne 400 000 divákov za sezónu (Obr. 1). Ale v sezóne 2020/2021 nastal rapídny pokles návštevnosti. Tento ročník navštívilo futbalové zápasy dokopy len 74 210 divákov, čo činí priemerne 377 divákov na jeden zápas. S určitosťou vieme povedať, že tento pokles je spôsobený pandémiou COVID-19, kvôli ktorej bolo nútené zaviesť opatrenia. V sezóne 2020/2021 sa hralo buď bez divákov alebo s kapacitnými obmedzeniami na futbalových štadiónoch. Po katastrofickej sezóne z hľadiska návštevnosti vidíme v ďalšej sezóne 2021/2022 výraznejší nárast počtu divákov. Je to spôsobené tým, že od polovice sezóny boli zápasy v lige už bez obmedzení a ľudia boli “hladní” po futbale. Ale stále je to nízka návštevnosť v porovnaní so sezónami pred covidom.

Počas celého nášho sledovaného obdobia si môžeme všimnúť, že v sezóne 2017/2018 a 2018/2019 boli veľmi podobné celkové návštevnosti. Podľa nás je to spôsobené lepšou infraštruktúrou, otvorili sa nové futbalové štadióny v Trnave, Dunajskej Strede a v Bratislave. V najlepších rokoch nami sledovaného obdobia chodilo priemerne 2300 divákov na jeden zápas. Podľa nás je tento priemer nízky. Nastáva otázka, prečo to tak je? Nazdávame sa, že futbalové kluby vyvíjajú slabé aktivity na spropagovanie svojho klubu, čiže nevedia predat svoj produkt a prilákať divákov na futbalové štadióny. Ale môžu to byť aj iné dôvody, napr. veľa zahraničných podpriemerných hráčov a tým nízky počet slovenských hráčov, alebo strach z futbalových chuligánov, ktorí veľakrát narušia pokojný zápas bitkami/výtržnosťami, ale v poslednom rade dôležitú rolu môžu zohrať aj ceny vstupeniek na zápasy, ktoré keď sú cenovo zlé nastavané a sú vysoké, tak futbalové zápasy si viacerí fanúšikovia nemôžu dovoliť. Podľa [3] na Slovensku nie je až taký záujem o návštevu futbalových zápasov. Na futbalové zápasy nechodia v takej miere rodiny s deťmi, ale viac menej skupiny kamarátov. Je to

spôsobené tým, že rodičia sa boja ísť so svojimi deťmi na futbal kvôli možným násilnostiam futbalových fanúšikov. Na štadiónoch zostáva jadro verných fanúšikov, sú to osoby, ktoré sú verní svojmu klubu. [4] Tvrdia, že návštevnosť divákov na zápase zvýšia krátkodobé a dlhodobé úspechy klubu. Zlé poveternostné podmienky znižujú návštevnosť. A keď sa hracie kolo rozdelí na dva až tri dni, tak sú predpoklady na zvýšenie návštevnosti.



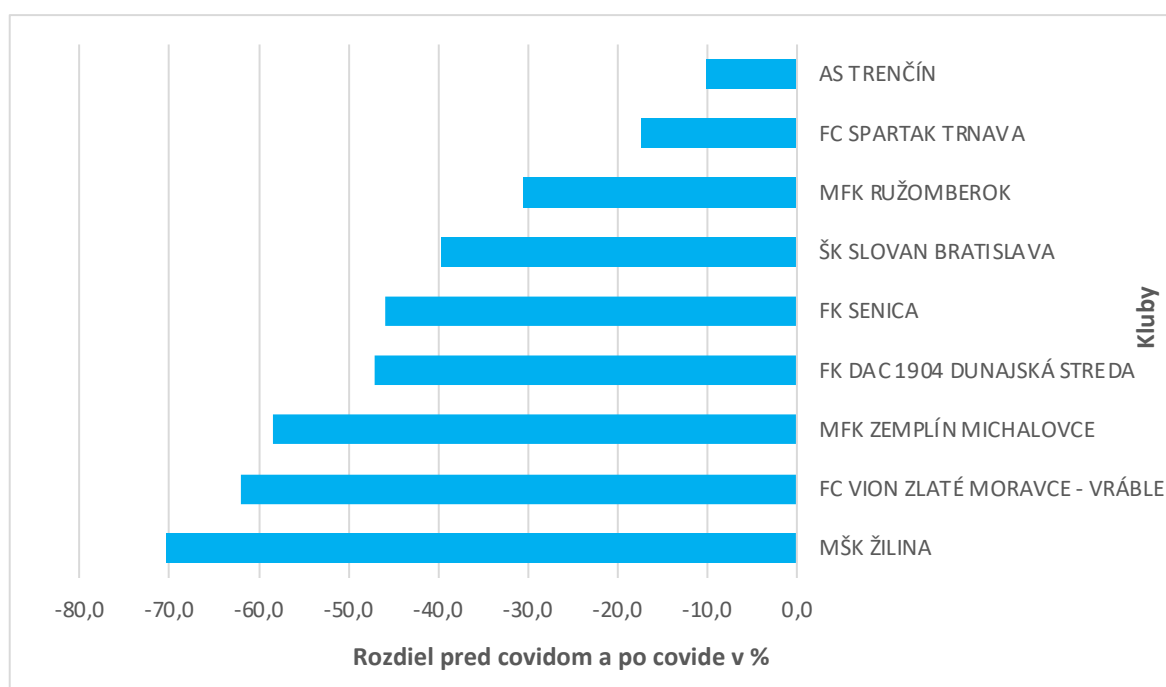
Obr. 1. Celková a priemerná návštevnosť najvyššej futbalovej ligy na Slovensku v sezónach 2015/2016 až 2021/2022

Zdroje: [5], databáza autora, spracované autorom

Keď sa pozrieme na návštevnosť pred covidom, čiže na sezónu 2018/2019 a po cvide 2021/2022, tak vidíme obrovské rozdiely návštevností futbalových klubov na Slovensku (Obr. 2). Najväčší rozdiel až 70 % je pri futbalovom klube MŠK Žilina. Viac ako 50 % rozdiel vidieť aj pri futbalových kluboch FC ViOn Zlaté Moravce-Vráble a MFK Michalovce. Najmenší pokles zaznamenali kluby AS Trenčín a FC Spartak Trnava, kde rozdiel bol menší ako 20 %.

Z týchto výsledkov výskumu môžeme konštatovať, že ľudia sa po cvide až v takom počte nevrátili na futbalové štadióny. Domnievame sa, že mohli by byť viaceré príčiny, prečo sa diváci nevrátili na futbalové štadióny. Prvá príčina je, že ľudia počas covidu si odvykli chodiť na zápasy a radšej si z pokoja domova pozrú zápas alebo čas využijú na inú aktivitu. Čo sa dostávame k druhej príčine, že pred covidom v sezóne 2018/2019 sa nedali všetky zápasy pozrieť online, okrem priamych prenosov, ktoré boli v každom kole z dvoch zápasov. Čo sa v sezóne 2021/2022 zmenilo a ľudia majú možnosť si pozrieť všetky zápasy každého kola

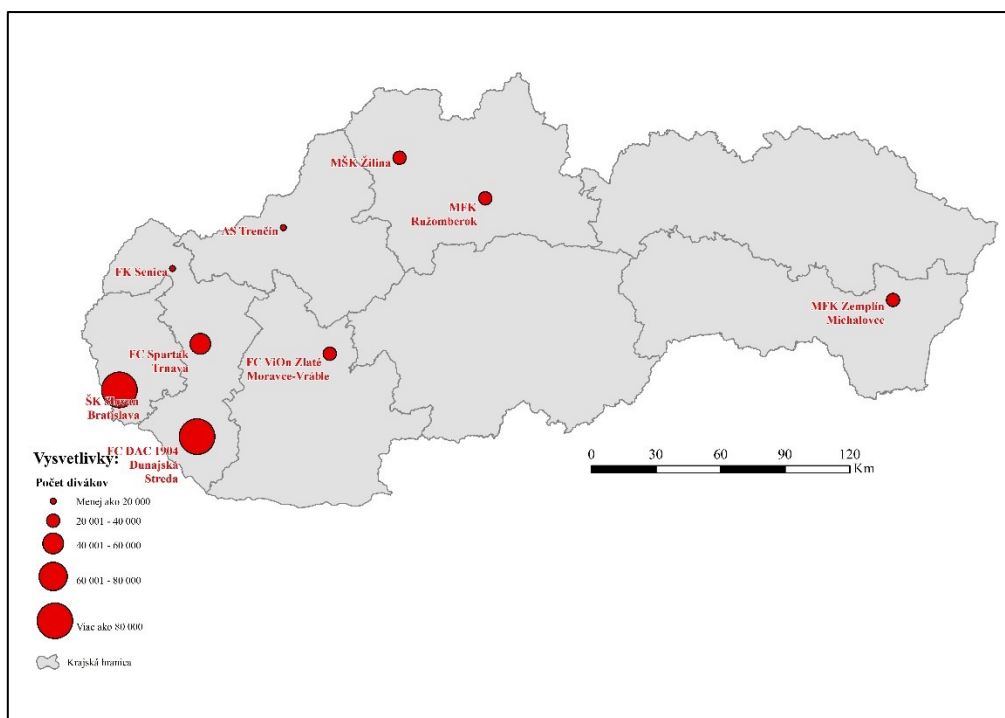
online cez streamovaciú službu VOYO. Ďalšia príčina môže byť cena vstupeniek, prípadne iný faktorom je, že liga nie je taká atraktívna a ľudí neláka na futbalové štadióny.



Obr. 2. Rozdiel návštevnosti vybraných futbalových klubov pred covidom (2018/2019) a po covide (2021/2022)

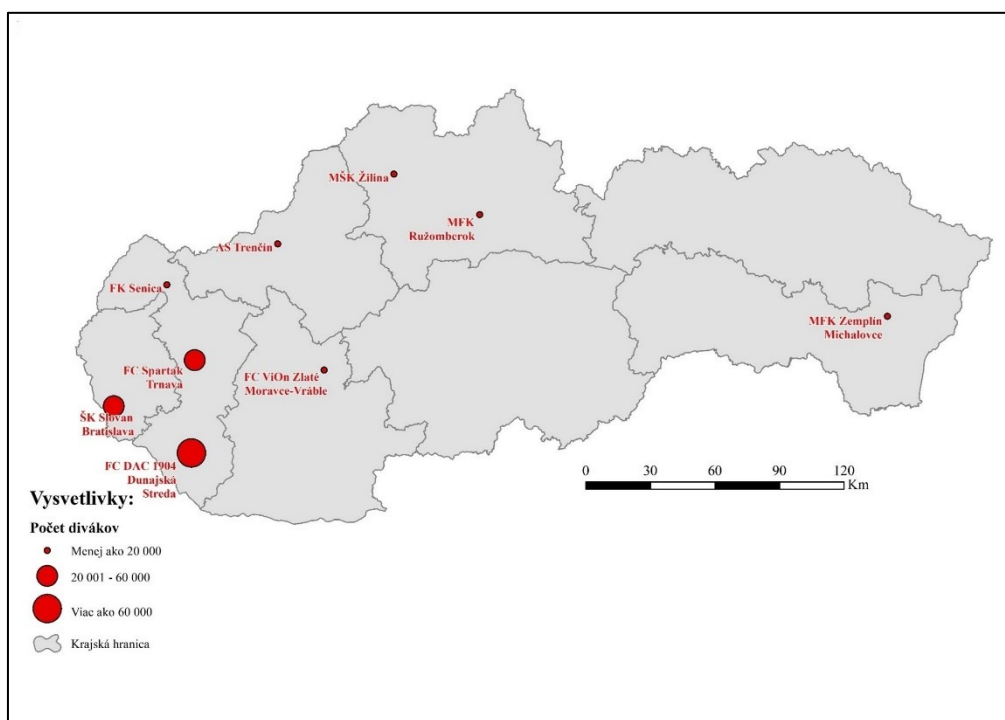
Zdroje: [5], databáza autora, spracované autorom

Keď si porovnáme celkovú návštevnosť vybraných futbalových klubov najvyššej slovenskej futbalovej ligy v sezóne 2018/2019 a v sezóne 2021/2022, tak vidíme, že pandémia veľmi ovplyvnila návštevnosť futbalových zápasov. Za kritické môžeme považovať, že po covidových opatreniach sa v sezóne 2021/2022 síce zvýšila návštevnosť, ale vôbec nie tak, ako by sa mala zvýšiť. Podľa nás po pandémii mala návštevnosť rapídne stúpnuť, lebo si myslíme, že ľuďom počas pandémie musel futbal chýbať (Obr. 3-4).



Obr. 3. Celková návštevnosť vybraných futbalových klubov najvyššej slovenskej futbalovej ligy v sezóne 2018/2019

Zdroje: [5], databáza autora, spracované autorom



Obr. 4. Celková návštevnosť vybraných futbalových klubov najvyššej slovenskej futbalovej ligy v sezóne 2021/2022

Zdroje: [5], databáza autora, spracované autorom

Záver

Analýzou návštevnosti zápasov futbalových klubov najvyššej slovenskej futbalovej ligy sme prišli k záveru, že pred covidom diváci vo vyššom počte navštevovali zápasy a prvý pokles sme zaznamenali v sezóne 2019/2020. Covidová sezóna 2020/2021 spravila obrovský prepád v návštevnosti, ktorý bol spôsobený kapacitnými opatreniami na štadiónoch a zavretím štadiónov na určitú dobu počas covidu na zamedzenie šíreniu vírusu. Po covidovej sezóne 2020/2021 síce stúpila návštevnosť v sezóne 2021/2022, ale vôbec nie tak, ako by mala, keďže si myslíme, že ľuďom musel počas covidu futbal chýbať a mali byť “hladní” po ňom. Dôvody prečo nenastal rapidný nárast vidíme asi v tom, že fanúšikovia si počas covidu odvykli chodiť na futbalové zápasy, prípadne za to mohli ceny vstupeniek. Na to by sa potreboval urobiť ďalší výskum zameraný na ekonomické aspekty zápasov futbalových klubov najvyššej slovenskej futbalovej ligy.

Môžeme s určitosťou povedať, že najvyššia futbalová liga na Slovensku začína strácať fanúšikov a uberať sa zlým smerom. Vedenie futbalu na Slovensku by malo prísť s riešeniami ako tento pokles zastaviť a zvýšiť návštevnosť. Hrozí, že o pár rokov bude na zápasy chodiť minimum fanúšikov a niektoré kluby to nemusia prežiť a skončia s futbalom.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Reade J. J., Singleton C. (2021) European Sport Management Quarterly. 21(3), p. 391
- [2] Reade J. J., Schreyer D., Singleton C. (2021) Applied Economics Letters. 28(18), p. 1542
- [3] Hajdúk M., Bratská M. (2012) Psychologie a její kontexty (Psychology & Its Contexts). 1(3), p. 15
- [4] Borland J., Lye J. (1992) Applied Economics. 24(9), p. 1053
- [5] Futbalnet [Citované: 18. marca 2023] <<http://www.futbalnet.sk>>

Testovanie využitia výšky nad najbližším vodným tokom pri priestorovej identifikácii riečnej nivy rieky Belá

Marián Jančovič, Anna Kidová

*Geografický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Štefániková 49, 814 73 Bratislava,
Slovenská republika; geogjanc@savba.sk*

Abstract

Potential use of height above the nearest drainage in spatial identification of the floodplain of the Bela River

The paper deals with the use of the method of height above the nearest drainage in the spatial identification of the Belá River floodplain. We mainly use DMR 3.5 and DMR 5.0 topographic data. From them, we generate a stream network, according to which we then normalize the digital elevation model so that each stream pixel creates its own subcatchment. Separate results are obtained for the two digital elevation models used. We verify them on the digital elevation model layer normalized by the average slope of the Belá River channel. The HAND methodology does not seem to be suitable for the purpose of spatial identification of the Belá river floodplain, because it produces values higher than 10 m in up to a 1/4 of its area, even though its elevation relative to the channel itself may not be higher than 1 m.

Keywords: *floodplain mapping; height above the nearest drainage; Belá River*

Úvod a formulácia cieľa

Jedným z najakútnejších problémov ľudskej spoločnosti sa v posledných desaťročiach stala klimatická zmena. Medzi jej prejavy patrí aj celosvetovo sa zvyšujúca intenzita a početnosť extrémnych hydrologických javov, akými sú aj povodne. Prirodzenou geomorfologickou formou, ktorá je na povodne viazaná je riečna niva. Tá môže byť definovaná ako relatívne ploché územie siahajúce od brehov vodného toku po svahy údolia, ktoré býva pri extrémnych prietokoch zaplavované [1]. Na aktívne riečne nivy sa viažu aj regionálne povodne zapríčiňujúce približne polovicu povodňových udalostí na území Slovenska v období medzi rokmi 1996-2006 [2]. Priestorová identifikácia riečnych nív tak môže predstavovať spôsob vyjadrenia ohrozenia, ktoré takéto povodne predstavujú.

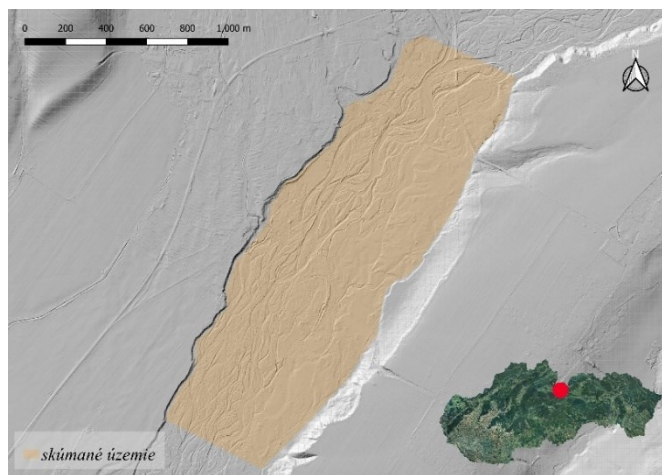
Avšak riečne nivy nebývajú homogénnym rovinatým prostredím. Môžu ich tvoriť rôzne elementárne formy reliéfu [3], ktoré tak utvárajú ich vnútornú štruktúru. To môže ovplyvniť aj rozloženie povodňového ohrozenia v priestore riečnej nivy. Z hľadiska vyliatia vody z koryta je dôležitá najmä vertikálna členitosť riečnej nivy. Jedným z algoritmov na identifikáciu povodňového ohrozenia, ktoré sú na tomto poznatku založené, je výška nad najbližším vodným tokom (HAND)[4]. Ako najbližší vodný tok pritom berie prvý pixel vodného toku, ktorý je od daného miesta po smere odtoku. Výsledná výška je potom rozdielom nadmorských výšok takto prepojených pixelov. HAND predstavuje jednoduchý prístup k identifikácii povodňového

ohrozenia, ktorý sa využíva najmä pre svoju dátovú a výpočtovú nenáročnosť.

Cieľom práce je testovať využitie HAND pri priestorovej identifikácii riečnej nivy vodného toku Belá a jej vnútornej štruktúry. Zaoberať sa budeme aj vplyvom priestorového rozlíšenia a výškovej presnosti na výsledok. Ako validačnú vrstvu použijeme digitálny model reliéfu normalizovaný podľa priemerného sklonu koryta rieky Belá.

Materiál a metódy

Ako hlavný zdroj dát sme využívali DMR. Od Úradu geodézie, kartografie a katastra SR (ÚGKK SR) sme získali jednak DMR 3.5 s priestorovým rozlíšením 10 m a výškovou presnosťou do 1 m v 61,21 % prípadov, do 3 m v 89,66 % a v 97,42 % s presnosťou do 5 m [5]. Okrem toho sme v okolí rieky Belá disponovali aj novším DMR 5.0 s priestorovým rozlíšením 1 m a výškovou presnosťou 4 cm. Za účelom vektorizácie prúdnice Belej sme použili ortofotomozaiku SR z roku 2018 s priestorovým rozlíšením 25 cm poskytnutá ÚGKK SR. Skúmanú lokalitu sme vymedzili vrstvou riečnej nivy úseku rieky Belá získanú mapovaním na podklade tieňového reliéfu DMR 5.0 (Obr. 1).



Obr. 1. Vymedzenie skúmaného územia – na podklade tieňovaného reliéfu odvodeného z DMR 5.0

Ako vstupy analýzy HAND sa používajú DMR a z neho odvodená rastrová vrstva vodných tokov získaná prahovaním príspevkovej plochy. V našom prípade tvoria vrstvu vodných tokov pixely s príspevkovou plochou väčšou ako $5 \cdot 10^{-3} \text{ km}^2$, ktorá bola zvolená tak, aby výsledná vrstva čo najviac zodpovedala jej ekvivalentu v Základnej báze údajov pre geografický informačný systém (ZB GIS). Na výpočet HAND je potrebné získať z DMR raster lokálnych smerov odtoku a pre každý pixel vodného toku sa následne vypočíta vlastné subpovodie, ktorému sa v celom areáli priradí hodnota jeho najnižšej nadmorskej výšky.

Výstup je potom odpočítaný od pôvodného DMR, čím vo výsledku vznikne raster HAND. Ten teda predstavuje DMR normalizovaný podľa nadmorskej výšky vrstvy vodných tokov.

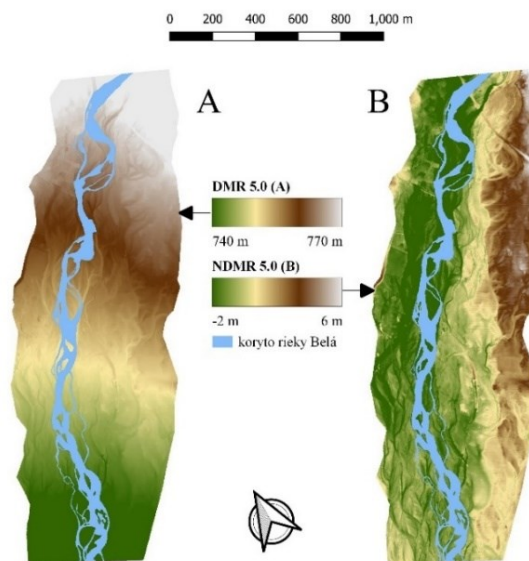
Aby sme mohli výsledky analýzy HAND konfrontovať s kontextom terénu a tým ho verifikovať, museli sme u DMR najprv zohľadniť vplyv sklonu reliéfu v smere vodného toku. Na skúmanom území, ktoré je dlhé vyše 2 km, sa totiž dá v členitom prostredí Liptovskej kotliny predpokladať značné prevýšenie. Z toho dôvodu sme preto normalizovali DMR nasledovným spôsobom:

$$NDMR = (DMR - DMR_{min}) - (\tan(s) * d) \quad [I.]$$

Kde $NDMR$ značí DMR normalizované podľa priemerného sklonu koryta rieky Belá, DMR_{min} je nadmorská výška koryta rieky Belá v mieste odtoku zo sledovaného územia, d je horizontálna vzdialenosť od miesta odtoku Belej zo sledovaného územia a s je konštanta priemerného sklonu koryta počítaná medzi miestom prítoku a miestom odtoku Belej z výskumnej lokality z ich prevýšenia a horizontálnej vzdialenosti.

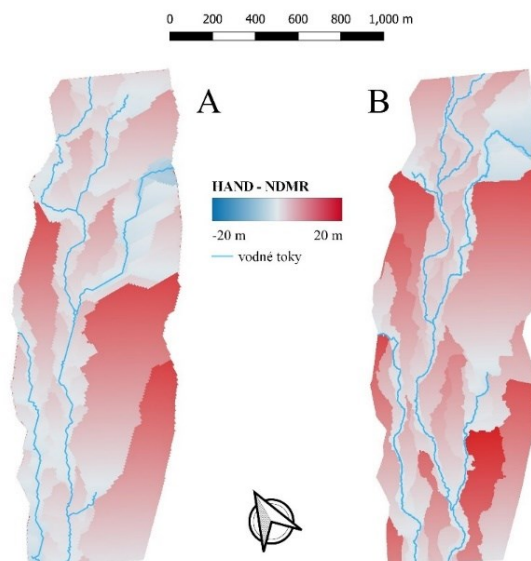
Výsledky a diskusia

Prevýšenie koryta rieky Belá dosahuje na sledovanom území u oboch DMR skoro 40 m. Jednoduchou normalizáciou pomocou konštanty priemerného sklonu v smere osi toku Belej sme viditeľne znížili vplyv tohto prevýšenia (Obr. 2). Získané $NDMR$ sme následne mohli odpočítať od HAND a zistiť, ako je HAND schopný vyjadriť vnútornú štruktúru riečnej nivy (Obr. 3).



Obr. 2. Vertikálna členitosť riečnej nivy úseku vodného toku Belá – DMR 5.0 (A), DMR 5.0 normalizované podľa priemerného sklonu koryta rieky Belá (B)

V prípade HAND aj verifikačnej vrstvy NDMR ide o formy normalizácie DMR podľa vodného toku. Kým NDMR vychádza z konštanty priemerného sklonu koryta rieky Belá, HAND stavia na smere odtoku počítanom v smere najnižšie položeného susedného pixelu. Rozdielna povaha normalizácie DMR sa výrazne prejavuje aj na výstupoch (Obr. 3). NDMR sa javí spojitou, s plynulou zmenou hodnôt podobnou DMR. Naopak na výstupe HAND sú na prvý pohľad viditeľné až niekoľko metrové skoky v hodnotách na hraniciach jednotlivých subpovodí. Dôležitým prvkom HAND je sieť vodných tokov, ktoré vstupujú do výpočtu. Koncipované to bolo tak, že sa pri tejto analýze využije vrstva vodných tokov generovaná z toho istého DMR ako samotný HAND [4]. Problémom takéhoto prístupu je jeho parametrizácia. Takto generovaná vrstva vodných tokov je závislá od konštanty zvolenej pri prahovaní príspevkovej plochy. V prostredí vodných tokov s komplexnejšou topografiou, akým je aj divočiaci a migrujúci vodný tok Belá, je tak isto problematickou stránkou aj neschopnosť vytvárať formy geometrie vznikajúce vetvením línie v smere toku (napr. ostrovy).



Obr. 3. Rozdiely medzi výškou nad najbližším vodným tokom a DMR normalizovaným podľa priemerného sklonu koryta rieky Belá – HAND a NDMR počítané z DMR 3.5 (A), HAND a NDMR počítané z DMR 5.0 (B)

Odhliadnuc od vstupnej vrstvy vodných tokov sa pri aplikácii HAND pri priestorovej identifikácii riečnych nív dá polemizovať aj o logike samotnej metódy normalizácie DMR. Sporne vnímame najmä spôsob, akým definuje vzdialenosť od vodného toku. Smer odtoku totiž smeruje vždy k najnižšie položenému susednému pixelu. Vodný tok je tak konečným bodom. To je však v rozpore s logikou šírenia povodní, ktoré postupujú od vodného toku do okolia, tzn. opačným smerom. Ak by sme adekvátne zmenili orientáciu smeru odtoku, smeroval by vždy k najvyššie položenému susednému pixelu. Takáto situácia pritom predstavuje pre šírenie povodní cestu najvyššieho odporu. Práve povodne sú pri tom kľúčovým procesom genézy riečnych nív.

Problematickosť definície vzdialenosti od vodného v prípade HAND je dobre badateľná aj na riečnej nive Belej. Vďaka divočeniu a korytovej migrácii je dobre vyvinutá, v sledovanom úseku dosahuje šírku až 780 m a priemerný sklon koryta Belej je skoro 1°. Smer odtoku je tu výrazne ovplyvnený naklonením riečnej nivy v smere prúdenia Belej, čo vo významnej časti územia spôsobuje takmer jeho paralelný priebeh voči samotnej rieke. Následkom toho je takto počítaná vzdialenosť k vodnému toku predĺžená a takto definovaný najbližší vodný tok je posunutý nižšie po prúde. HAND tak dosahoval hodnoty skoro 20 výškových metrov aj v prípade, keď sa nemusel nachádzať viac ako 1 m nad úrovňou koryta Belej. Lepšie výsledky by mohlo dosahovať využitie detailnejšieho a presnejšieho DMR [6]. Avšak z našich testov nie je pri DMR 5.0 viditeľný zásadný vplyv na výsledok. V oboch

prípadoch dosahoval HAND približne na štvrtine plochy riečnej nivy hodnoty vyššie ako 10 m a pri 10% hodnoty nad 15 m.

Záver

V práci sme sa zamerali na testovanie využitia ukazovateľa HAND pri priestorovej identifikácii riečnej nivy vodného toku Belá. Z výsledkov vyplýva, že s použitím prahovania hodnôt HAND by sa značnú časť riečnej nivy nepodarilo zachytiť. Ak by sa totiž prahová hodnota nastavila tak, aby pokryla aspoň 90% jej plochy, musela by zahrnúť všetky pixely s hodnotou HAND menšou ako 15 m. Táto hodnota by pri tom bola rovnaká nezávisle od toho, či by sme na to použili DMR 3.5 alebo detailnejšie DMR 5.0. V oboch prípadoch by takýmto spôsobom ako riečna niva boli zároveň označené aj okolité riečne terasy. Problémom HAND je totiž spôsob, akým sa počíta vzdialenosť od najbližšieho toku. Z toho dôvodu neodporúčame použiť popísanú metodiku HAND ani pri snahe o zachytenie vnútornej štruktúry nivy.

PodĎakovanie

Ďakujem svojej školiteľke Anke Kidovej za pripomienky k práci. Tento výskum bol podporený Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaŠ SR a SAV (VEGA): 02/0086/21.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Goudie A. (2004) Encyclopedia of Geomorphology. Routledge, London, UK, p. 381
- [2] Solín Ľ. (2007) J. Hydrol. Hydromech. 56(2), p. 99
- [3] Minár J. (1995) Acta. Fac. Rerum. Geo. 36, p. 40
- [4] Rennó C. D., Nobre A. D., Cuartas L. A., et al. (2008) Remote Sens Environ 112(9)
- [5] Geoportál [Citované: 15. marec 2023] < <https://www.geoportal.sk/sk/zbgis/> >
- [6] Zheng X., Maidment D., Tarboton D. et al. (2018) Water Resour. Res. 54

Využitie voľne dostupných satelitných údajov a neurónových sietí na identifikáciu poľnohospodárskych pozemkov

Šimon Opravil

*Geografický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Štefánikova 49, 814 73 Bratislava,
Slovenská republika; opravil1@uniba.sk*

Abstract

Leveraging open source satellite data and neural networks to identify agricultural land parcels
The delimitation of agricultural land is essential in the Common Agricultural Policy and digital farming context. The delimitation is currently supervised and manual based on the currently available orthophoto mosaics. Satellite imagery and deep neural network algorithms provide possibilities for identifying the extent and boundaries of agricultural land. In this paper, I use Sentinel-2 satellite imagery, reference records from the LPIS database, and train deep neural network with U-Net architecture to identify agricultural parcels. The results indicate the potential of using such a framework approach, highlight its limitation, and underline the necessity of further experiments to improve the resulting delimitation.

Keywords: *neural networks; agriculture; remote sensing; Sentinel-2*

Úvod a formulácia cieľa

Presné vymedzenie rozsahu a hraníc poľnohospodárskych pozemkov je nevyhnutnou podmienkou pre poskytovanie priamych platieb poľnohospodárom zo Spoločnej poľnohospodárskej politiky [1]. Vymedzenie hraníc je dôležité aj pre digitálne poľnohospodárstvo, ktoré sa sústreďuje na pomoc poľnohospodárom pri monitorovaní ich pozemkov počas vegetačného obdobia [2]. V súčasnosti sú údaje o rozsahu a hraniciach poľnohospodárskych pozemkov produkované príslušnou sekciou Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka pod názvom LPIS (Land Parcels Identification System) [3]. Produkované sú ručne zo snímok ortofotomozaiky a aktualizované každé 3 roky, v závislosti od aktuálnej kampane snímania ortofotosnímkov [4].

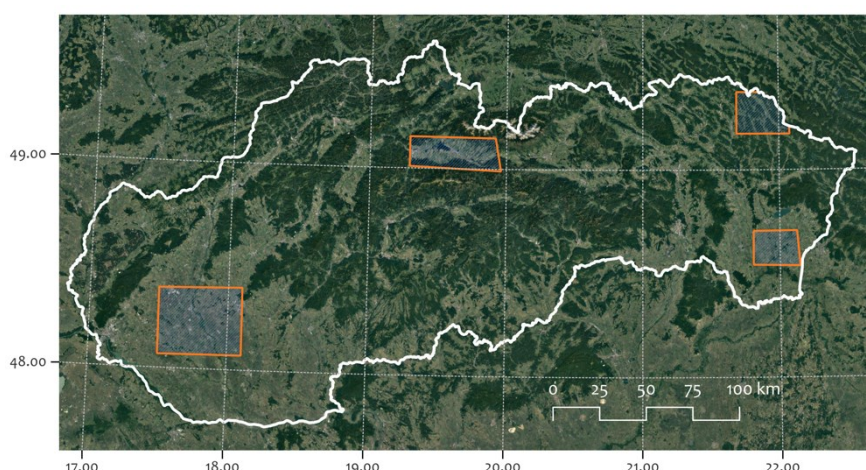
Optické satelitné údaje misie Sentinel-2 [5], Európskej vesmírnej agentúry, poskytujú možnosť nielen identifikovať ale aj monitorovať poľnohospodárske pozemky a ich zmeny počas vegetačnej sezóny. Doposiaľ boli na tento účel využívané algoritmy sémantickej segmentácie (t. j. procesu prepojenia každého pixelu v obraze s označením triedy) na základe hraníc alebo algoritmy segmentácie na základe regiónov [6, 7]. Tie však majú tendenciu nadmerne segmentovať pozemky s vysokou vnútornou variabilitou a nedostatočne segmentovať susediace pozemky s nízkou variabilitou [8].

Hlboké konvolučné neurónové siete sa čoraz častejšie používajú pri analýze obrazu, pretože dokážu využívať hierarchické (lokálne až globálne) kontexty v obrazoch. Tieto siete

sa používajú v diaľkovom prieskume Zeme na riešenie rôznych problémov ako je napríklad segmentácia ciest [9], detekcia budov [10], či identifikácia plodín [11]. Konvolučné neurónové siete však môžu extrahovať aj rozsah a hranice poľnohospodárskych pozemkov. Cieľom tohto príspevku je načrtnutie možného využitia segmentačných algoritmov neurónových sietí a voľne dostupných satelitných snímok na identifikáciu poľnohospodárskych pozemkov na území Slovenska.

Materiál a metódy

Na dosiahnutie stanoveného cieľa integrujem dva zdroje údajov a to LPIS a optické satelitné snímky Sentinel-2. V prvom kroku som vybral geograficky a poľnohospodársky heterogénne regióny, zasahujúce do Podunajskej nížiny, Východoslovenskej nížiny, Podtatranskej kotliny a Laboreckej vrchoviny (Obr.1.).



Obr. 1. Regióny (oranžové hranice) vybrané na trénovací proces.

Pre tieto oblasti som následne predpripravil a stiahol satelitné snímky Sentinel-2 pomocou cloudovej výpočtovej platformy Google Earth Engine (GEE). Snímky boli filtrované na základe zvolených regiónov v časovom období 1.4.2018 – 30.10.2018 a z deklarovanou oblačnosťou na snímku pod 25. Zvyšné oblaky a tieň oblakov som maskoval pomocou dátovej sady Sentinel-2 *Cloud Probability*, tiež dostupnej na platforme GEE. Zamaskovaný bol každý pixel z pravdepodobnosťou oblačnosti nad 60%. Následne som zo získaného časového radu snímok pre každý pixel vybral hodnotu mediánu za celé vegetačné obdobie. Z takto spracovaného obrazu (1 obraz mediánu pre každý región) som vybral 3 viditeľné spektrálne pásma a blízke infračervené pásmo, ktoré boli následne stiahnuté na lokálny disk.

Vektorová databáza LPIS bola stiahnutá z voľne dostupného zdroja na internetovej

stránke <http://data.europa.eu> [3]. Postup spracovania pozostával z rasterizácie a priestorovej koregistrácie údajov na sústavu pixelov Sentinel-2. Na základe tohto postupu vznikla obrazová maska, kde hodnoty 1 a 0 znamenali príslušnosť, resp. nepríslušnosť k poľnohospodárskemu pozemku.

Spracované obrazové záznamy Sentinel-2 a obrazovú masku LPIS som rozdelil na menšie obrazové záznamy s veľkosťou 256x256, vďaka čomu je celý proces pamäťovo menej náročný a práca s ním jednoduchšia. Nakoniec som záznamy rozdelil na tréningovú a validačnú vzorku v pomere 80:20, čoho výsledkom je 2137 a 535 záznamov v tréningovej a validačnej vzorke resp..

Pre účely sémantickej segmentácie som použil knižnice programovacieho jazyka Python - Tensorflow [12] a Segmentation-models. Segmentačný model vychádza z architektúry U-net, čo je konvolučná neurónová sieť vyvinutá na segmentáciu obrazových záznamov [13]. Sieť sa skladá z kontrakčnej a expanzívnej fázy, čo jej dáva architektúru v tvare písmena U. Na kontrakčnej fáze som využil transferové učenie, kde sa predtrénované modely (v tomto prípade ResNet 34 [14]) používajú ako východisko pri iných úlohách, čo významne šetrí výpočtové a časové zdroje potrebné na vývoj modelu [15].

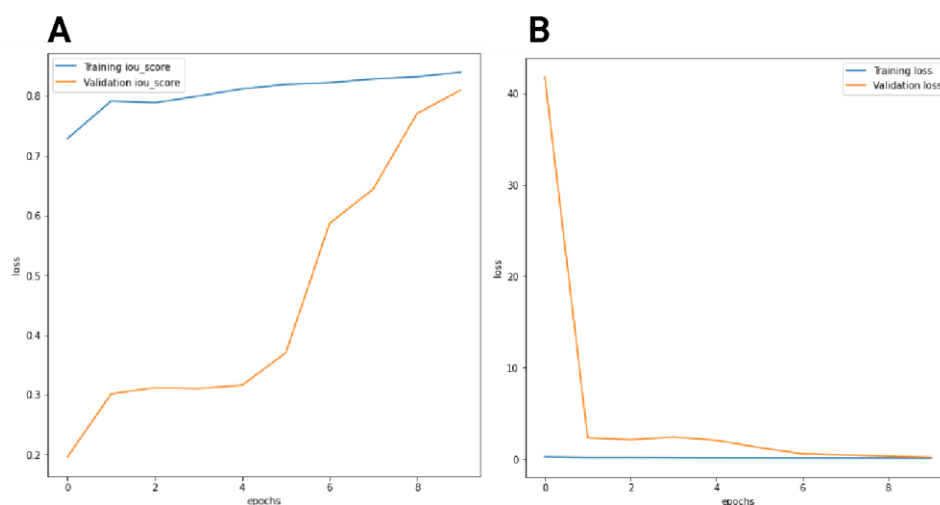
Cieľom trénovania a parametrizácie modelu je minimalizácia účelovej funkcie a maximalizácia presnosti modelu. Na odhadnutie účelovej funkcie som použil metriku krížovej entropie (čím nižšia hodnota, tým lepšie) medzi rozdelením skutočných záznamov a rozdelením modelovaných záznamov. Na vyhodnotenie presnosti modelu som použil metriku *Intersection over Union* (IOU) [eq. II], čo je metóda na kvantifikáciu percentuálneho prekrytia cieľovej masky a výstupu predikcie (čím vyššia hodnota, tým lepšie).

$$IOU = \frac{\text{reálna maska} \cap \text{predikovaná maska}}{\text{reálna maska} \cup \text{predikovaná maska}} \quad [I.]$$

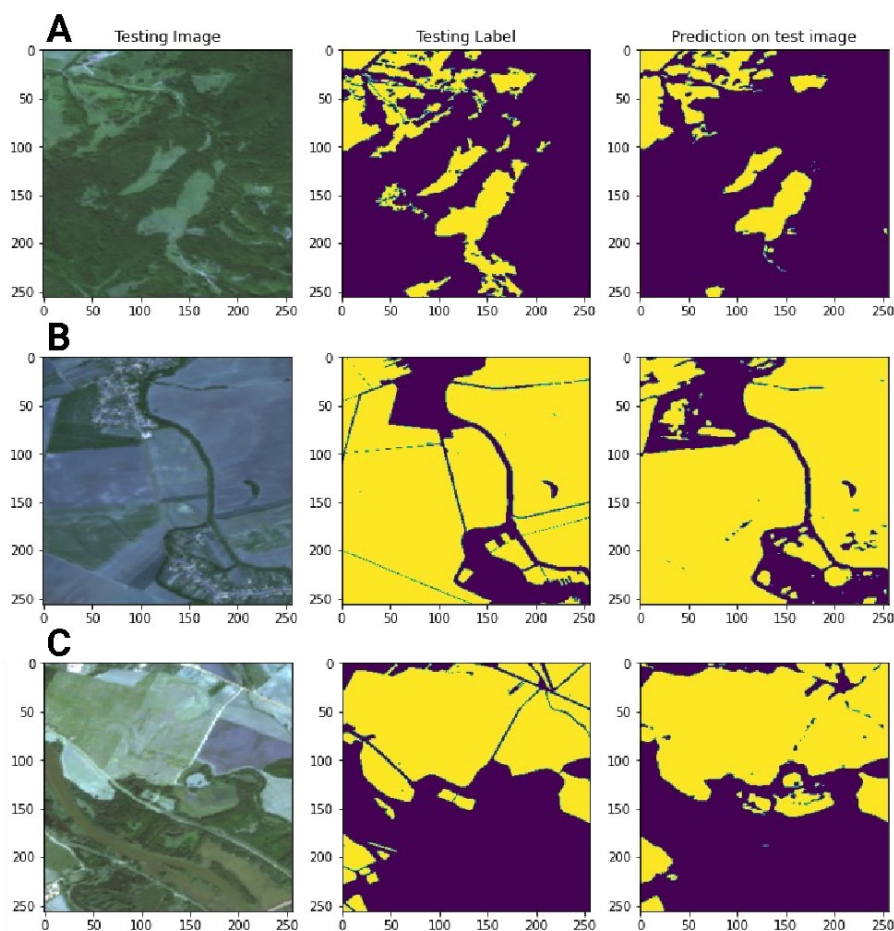
Výsledky a diskusia

Model identifikácie poľnohospodárskych pozemkov bol trénovaný na 10 epochách s priemernou hodnotou IOU 77% na testovacej vzorke (Obr. 2-A). Na základe hodnotenia účelovej funkcie možno konštatovať, že model bol trénovaný robustne a nedošlo k pretrénovaniu (Obr. 2-B). Identifikácia poľnohospodárskych pozemkov je úspešnejšia ak je okolie pozemku kontrastné čo je zrejmé z Obr.3-A. Zároveň však model nedokázal dobre identifikovať jemnejšie hrany poľnohospodárskych pozemkov ako napríklad poľné cesty Obr.3-B, C.

Model bol trénovaný na maske LPIS, ktorá predstavuje rozsah poľnohospodárskych pozemkov. Možným vylepšením modelu sa teda javí predstavenie druhej masky, ktorá by predstavovala striktne iba hranice pozemkov. Symetrický rozdiel týchto dvoch binárnych vrstiev (množina pixelov, ktoré sú v jednej z masiek, ale nie v ich priesečníku) vytvorí jednotlivé polia s uzavretými hranicami. Implementáciou takejto masky bola v podobne zameranej publikácii dosiahnutá presnosť identifikácie poľnohospodárskych pozemkov na úrovni presnosti 85% [8].



Obr.2. Metrika IOU (A) a účelová funkcia (B) dosiahnuté v jednotlivých epochách počas trénovania



Obr.3. Výsledky segmentácie na validačných obrazových záznamoch

Záver

V tomto príspevku je predstavený možný postup identifikácie poľnohospodárskych pozemkov zo satelitných údajov pomocou neurónových sietí. Na to sú využité obrazové záznamy satelitu Sentinel-2 a referenčné údaje z databázy LPIS. Pre účely tohto príspevku bol trénovaný model neurónových sietí s architektúrou U-Net, ktorý bol vyhodnotený pomocou metriky Intersection over Union. Z výsledkov je možné konštatovať, že model úspešne identifikuje rozsah poľnohospodárskych pozemkov s presnosťou metriky IOU v priemere na 77%. Výsledky však ukazujú, že hrany pozemkov boli identifikované s nedostatočnou presnosťou pokiaľ okolie pozemku nebolo oproti pozemku dostatočne kontrastné z hľadiska okolitej krajiny. Kód vytvorený pre potreby tohto príspevku je dostupný pre zreprodukovanie na platforme GitHub v nasledujúcom linku: https://github.com/simonopravil/nn_to_al/tree/main.

PodĎakovanie

Týmto sa chcem poďakovať Mgr. Róbertovi Pazúrovi, PhD. za pripomienky pri spracovávaní tohto príspevku.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Nariadenie vlády SR 342/2014 Z.z., ktorým sa ustanovujú pravidlá poskytovania podpory v poľnohospodárstve v súvislosti so schémami oddelených priamych platieb.
- [2] Weiss M., Jacob F., Duveiller G. (2020) Remote Sens. Environ. 236, 111402.
- [3] Systém identifikácie poľnohospodárskych pozemkov (LPIS). [Citované: 20.3.2023]. <<http://data.europa.eu/88u/dataset/4c408849-80e9-41a2-8c93-08a65b7ce4fb>>.
- [4] Ortofotomozaika SR. [Citované: 20.3.2023]. <<https://www.geoportal.sk/sk/zbgis/ortofotomozaika/>>.
- [5] Sentinel-2 Overview [Citované: 20.3.2023]. <<https://sentinels.copernicus.eu/web/sentinel/missions/sentinel-2/overview>>.
- [6] Graesser J., Ramankutty N. (2017). Remote Sens. Environ, 201, p. 165.
- [7] Belgiu M., Csillik O. (2018). Remote Sens. Environ, 204, p. 509.
- [8] Waldner F., Diakogiannis F. I. (2020). Remote Sens. Environ 245, 111741.
- [9] Abdollahi A., Pradhan B., Sharma G., et al. (2021) IEEE Access. 9, 64381
- [10] Yi Y., Zhang Z., Zhang W., et al. (2019). Remote sens. 11(15), 1774.
- [11] Du Z., Yang J., Ou C., et al. (2019). Remote Sens. 11(7), 888.
- [12] Abadi M., Barham P., Chen J., et al. (2016). 12th USENIX Symposium on Operating Systems Design and Implementation. 16 (2016), p. 265.
- [13] Ronneberger O., Fischer P., Brox T. (2015). Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention–MICCAI 2015: 18th International Conference, Munich, Germany, p. 234.
- [14] He K., Zhang X., Ren S., et al. (2016). Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition, (CVPR 2016), p. 770.
- [15] Goodfellow I., Bengio Y., Courville A. (2016). Deep learning. MIT press. Cambridge, Massachusetts, USA, p. 536.

Ženy v športe v modernom olympijskom hnutí

Viktória Podstavková

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra ekonomickej a sociálnej geografie, demografie a územného rozvoja, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; podstavkova3@uniba.sk

Abstract

Women in Sport in the Modern Olympic Movement

Despite the fact that the re-established modern Olympic Games were supposed to support the claim that sport is part of the heritage of every man and woman, they promoted and spread masculine values, which gave reasons why women should not and did not participate in the first Olympics. This paper emphasizes on the growing influence of feminist movements throughout the last century by highlighting gender inequality in sport. Emancipation of women in the Olympic movement then brought challenges towards International Olympic Committee regarding suppression of male domination and celebration of female athletes by gradual equalization of women's disciplines in these Games.

Keywords: *feminist geographies; women; sport geography; sport; Olympic Games*

Úvod a formulácia cieľa

Feministické geografie sú definované ako geografie zameriavajúce sa na to, ako sa rod a geografie vzájomne vytvárajú a transformujú, a na spôsoby, akými rodová diferenciácia preniká do spoločenského života [1]. Často bývajú zakorenené v obavách o sociálnu spravodlivosť pamätajúc na schopnosť upozorniť na spôsoby, akými sú postihnuté komunity negatívne ovplyvnené utláčateľskými silami vo svete [2].

V rámci feministických geografí sa môže často objavovať aj problematika geografie športu alebo športu samotného, s ktorou súvisí aj príbeh Bobbi Gibb zo 60-tych rokov minulého storočia, ktorá na to, aby odbehla maratón, sa musela prezliecť za muža a požičať si bratovu mikinu a šortky na zamaskovanie, pretože ženám pretekanie ako inak nebolo dovolené [3].

Bez ohľadu na geografické charakteristiky športu týkajúce sa najmä času, priestoru, komunit, mobility a identity, sa šport stal cieľom výskumov rôznych oblastí [4]. Šport sa svojou organizáciou a formami prejavu vybudovanou špecifickou infraštruktúrou stal neoddeliteľnou súčasťou spoločnosti vo všeobecnosti, pričom tu ale vznikajú rozdiely rôznorodého charakteru. Hodnota týchto rozdielov je generovaná mierou zapojenia každého aktéra ako súčasti spoločnosti. Účinky priestorového vykonávania športových aktivít sú mimoriadne rôznorodé, pričom sú široko viditeľné v hospodárskej, sociálnej alebo kultúrnej oblasti [5].

Zamerajúc sa na hodnotu každého športovca, rovnosť pohlavia v športe by mala byť

samozrejmosť. Už samotný zakladateľ moderných olympijských hier, Pierre de Coubertin, bol názoru, že „*Šport je súčasťou dedičstva každého muža a ženy a nemožno ho nahradiť ničím iným.*“. Avšak táto jeho mienka už od začiatku zasvedčovala tomu, že to nie je tak celkom pravda. Ženy už od dávnej minulosti nemali rovnaký prístup k športu tak, ako muži a spočiatku tomu nebolo inak ani na novovzniknutých olympijských hrách.

Cieľom tohto príspevku je poukázať na rodové nerovnosti v športe prostredníctvom analýzy účasti žien a ich zastúpenia na moderných olympijských hrách.

Materiál a metódy

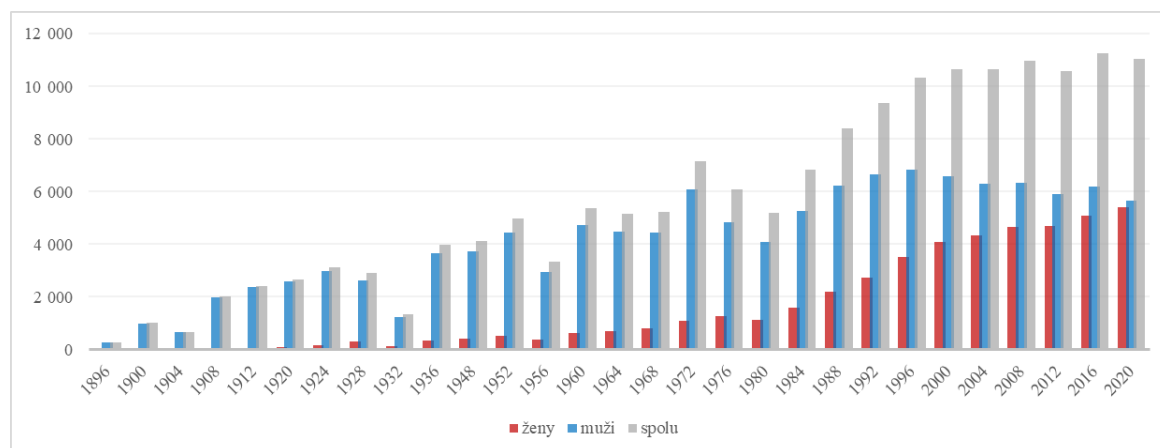
Účasť a zastúpenie žien vo vrcholovom športe boli vyhodnotené na základe analýzy štatistík z novodobých olympijských hier. Keďže cieľom analýzy bolo vyhodnotiť účasť žien v športe, ich najlepším ukazovateľom sú práve súťaže medzinárodného rázu vo vrcholovom športe. K tomu, aby posun v rámci vývoja bol čo najviditeľnejší, bolo potrebné zozbierať dáta z čo najdlhšieho časového obdobia, prípadne rôznych športov. V tomto prípade tak bolo najideálnejšou voľbou analýzu vykonať prostredníctvom moderných olympijských hier. Keďže hry sa konajú pravidelne každé 4 roky už od roku 1896 a prebiehajú dodnes, z historického hľadiska a časového horizontu poukazujú na značnú zmenu. Okrem toho olympiáda sa uskutočňuje ako v lete, tak aj v zime, čiže rôznorodosť športov bola taktiež zachovaná, a na tomto podujatí sa zároveň zúčastňujú ako muži, tak i ženy. Olympijské hry sú zastrešované Medzinárodným olympijským výborom, ktorý všetky uvádzané potrebné dáta od ich založenia uchováva a taktiež sprístupňuje pre verejnosť. Výber sledovaných a analyzovaných moderných olympijských hier bol tak do značnej miery determinovaný aj pomerne bezproblémovým prístupom k dátam a ich jednoznačnou výpovednou hodnotou.

Výsledky a diskusia

Dáta o zastúpení mužov a žien v športových disciplínach na olympijských hrách poukazujú na to, že ženy sa začleňovali postupne a pomaly. Na prvých týchto olympijských hrách konajúcich sa v Aténach v roku 1896 sa zúčastnili iba muži. Až v Paríži na hrách II. olympiády boli organizované prvé ženské súťaže, ktorých sa mohli zúčastniť, avšak iba v tenise a golfe. Na olympiáde v Saint Louis o štyri roky neskôr pretekali ženy aj v lukostreľbe (Obr. 1. a 3.), v Londýne 1908 bolo pridané krasokorčuľovanie (Obr. 2.) a na olympijských hrách 1912 v Štokholme pretekali ženy už aj v plávaní a v skokoch do vody [6] (Obr. 1. a 3.).

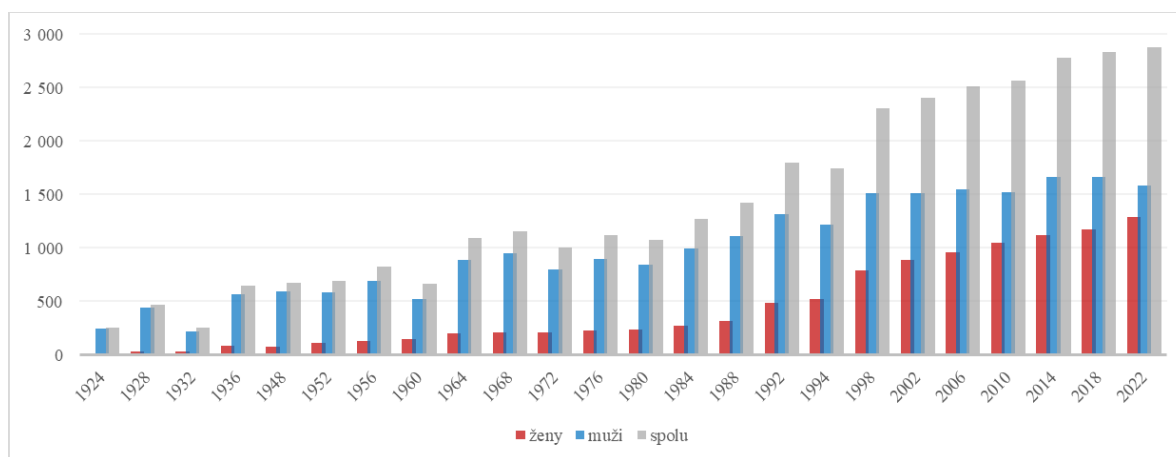
K veľkému obratu v nazeraní na ženský šport došlo po prvej svetovej vojne, kedy do programu bola zaradená atletika [7] (Obr. 1. a 3.). V tejto dobe sa na ženy pri vstupe na závodné

dráhy pozeralo značne skepticky a muži často viedli diskusie o vhodnosti tohto športu pre ženský organizmus a o škodlivých vplyvoch na ich telo a dušu. Priaznivý pohľad na ženskú atletiku sa tak presadzoval, no pomaly [8]. Rastúci záujem o ženské súťaže viedol k zaradeniu gymnastiky do programu olympijských hier 1928 v Amsterdame [6] (Obr. 1. a 3.). Ku koncu tridsiatych rokov minulého storočia začal ženský šport pozvoľna splyvať so športom mužov [8] a pred 2. svetovou vojnou sa do programu žien dostalo aj zjazdové lyžovanie [6] (Obr. 2).



Obr. 1. Počet súťažiacich na letných olympijských hrách podľa pohlavia v rokoch 1896 – 2020

Po druhej svetovej vojne sa v roku 1948 v Londýne sformovala základná päťka ženských športových odvetví; atletika, gymnastika, kanoistika, plávanie a šerm, ktorá až do 70. rokov tvorila ženské športové súťaže na olympijských hrách (Obr. 1. a 3.). Na zimných olympijských hrách patrili ženy k tradičným účastníkom súťaží v krasokorčuľovaní. V roku 1952 sa k zjazdovému lyžovaniu pridalo aj bežecké lyžovanie. V roku 1960 pribudlo rýchlokorčuľovanie a v roku 1964 preteky na saniach [6] (Obr. 2).

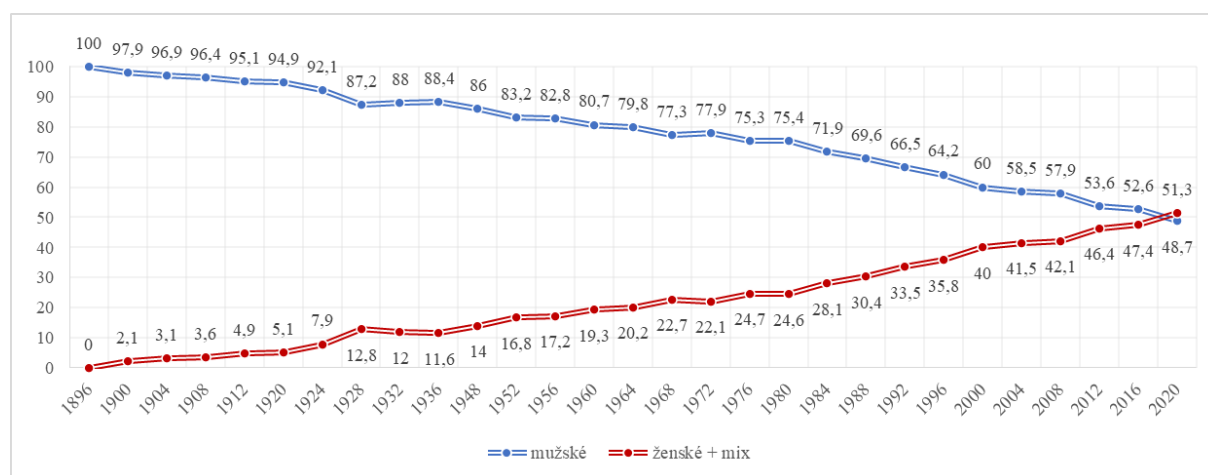


Obr. 2. Počet súťažiacich na zimných olympijských hrách podľa pohlavia v rokoch 1924 – 2022

Povojnový vývoj tak zaznamenal síce pomalý, no nezadržateľný rast počtu ženských olympijských športových disciplín. V roku 1964 v Tokiu na program olympiády pribudla bežecká disciplína žien na 400 metrov [9] a volejbal [10] a na nasledujúcej olympiáde v roku 1972 v Mníchove sa objavil aj beh na 1 500 metrov. V Montreale v roku 1976 debutovali ženy vo veslovaní, basketbale a hádzanej. K behu na 3 000 metrov v roku 1984 pribudol olympijský maratón žien [9] a aj ženské strelecké disciplíny [10]. V roku 1988 v Soule sa nepomer medzi ženskými a mužskými disciplínami redukoval: muži súťažili v 26 športových odvetviach a 165 športových disciplínach, ženy naopak v 22 športových odvetviach a 83 disciplínach (Obr. 1. a 3.). Na zimných olympijských hrách vtedy mali muži na programe 11 športových odvetví v 30 disciplínach, ženy 6 športových odvetví v 17 disciplínach [9] (Obr. 2.).

Ďalší prudký rozmach nastal v poslednom desaťročí 20. storočia, kedy do programu olympijských hier boli zaradené nielen kedysi pre ženy „zakázané“ disciplíny ako napríklad v atletike skok o žrdi či hod kladivom, ale aj celé športové odvetvia doposiaľ vyhradené mužom, medzi ktoré patrí futbal, ľadový hokej, vzpieranie alebo boby [6] (Obr. 1., 2. a 3.). V Barcelone v roku 1992 k ženským olympijským športom pribudlo džudo, vodný slalom a windsurfing. Mužské športy však aj napriek rozmachu naďalej jasne dominovali s 28 športovými odvetviami a 171 disciplínami oproti 24 odvetviam a 98 disciplínam žien. V troch športových odvetviach a 12 disciplínach sa súťažilo v zmiešaných zostavách (Obr. 1. a 3.). Zimné olympijské hry v Albertville ponúkli popri štyroch zmiešaných športoch 29 športových disciplín mužov a 22 disciplín žien [9] (Obr. 2.).

Charakteristickou črtou tohto obdobia bol tak značný rozvoj športu žien. Prejavil sa nielen vo zvýšenom počte pretekárook, ale aj zvyšovaním počtu ženských disciplín a športov na Olympijských hrách [11] (Obr. 3.).



Obr. 3. Podiel disciplín na letných olympijských hrách podľa pohlavia v rokoch 1896 – 2020 v %

Postupná emancipácia ženskej účasti na olympiádach sa stala neprehliadnuteľnou. Sto rokov olympiád priniesol i keď pomalý a nízky, no predsa len viditeľný rast zastúpenia žien. Prvá olympiáda v roku 1896 začínala nulovým zastúpením žien, avšak zlomovým okamihom bolo uvedenie gymnastických a atletických súťaží žien v roku 1928 v Amsterdame, keď sa podiel žien priblížil k hranici 10%. Tá bola plne prekonaná až v roku 1952 v Helsinkách najmä vďaka individuálnym gymnastickým disciplinám. V roku 1976 v Montreale bola prekonaná 20% hranica, a to s ohľadom na novo uvedené ženské olympijské disciplíny ako napríklad prekážkové behy, bežecké štafety, skok do výšky, skok do diaľky, päťboj, basketbal a volejbal. Osemdesiate roky uviedli skôr tradičné mužské športy na pôde ženskej olympijskej účasti: pozemný hokej, beh na 3 000 metrov, maratónsky beh, džudo, vodný slalom, či windsurfing. Prvá olympiáda v novom tisícročí, v austrálskom Sydney v roku 2000, bola okrem iného aj oslavou storočného výročia ženskej olympijskej účasti, ktorá tu pri počte viac ako 4 000 športovkýň dosiahla takmer 40% účasť. Počas tejto olympiády došlo aj k inej zaznamenaníhodnej udalosti, kedy emancipačné úsilie žien vyvrcholilo symbolickým zapálením olympijského ohňa. Prvýkrát v histórii sa na jeho zapálenie totižto podujali ženy – športovkyne a olympijské víťazky [9]. Neskôr, na olympiáde v Londýne v roku 2012, sa k vtedy existujúcim ženským olympijským disciplinám pridal prvýkrát aj ženský box [10] a v nasledujúcich rokoch postupne pribúdali disciplíny ako skoky na lyžiach alebo ragby a na olympiáde v roku 2020 pribudla aj BMX cyklistika, karate, skateboarding, surfing a lezenie (Obr. 1., 2. a 3.).

Záver

Z analýzy vyplýva, že v priebehu rokov sa postupne dovršuje emancipácia ženského športu. V súlade s inými odbornými prácami je zrejmé, že od starovekých aténskych arén, ktoré boli ženám nedostupné po stránke športovej i diváckej, dostávame sa do Atén nových, kde je ženskému športu otvorený takmer rovnaký priestor ako športu mužskému a taktiež postupne mizne pôvodná exkluzivita niektorých mužských disciplín [9]. I napriek tomu, že podiel žien na celkovom počte účastníkov športových súťaží olympijských hier neustále rastie, zastúpenie žien na olympijských hrách nezodpovedá súčasnému rozvoju ženského športu a zaostáva tak za účasťou (a taktiež počtom súťaží) mužov [6]. Situácia v rámci účasti žien na olympijských hrách v porovnaní s minulosťou sa však zásadne zlepšuje. Postupne sa tak vyrovnáva zastúpenie jednotlivých pohlaví. Na letných olympiádach sa spravidla zúčastňuje viac žien v porovnaní s tými na zimných. Na letnej olympiáde v roku 2016 bola účasť žien v pomere mužov 45%:55%, toto isté zastúpenie bolo aj na poslednej zimnej olympiáde v roku 2022. Naopak na poslednej letnej olympiáde bol však pomer ešte vyšší, a to 48,8%:51,2%.

Postupná rovnosť v športe je tak zjavná a v najbližších rokoch možno očakávať aj jej plné vyrovnanie. Pri vytváraní priestoru pre ženy v športe môže feministická športová geografia sledovať a získavať nové objavy a cesty prostredníctvom súčasného nárastu jej popularity a podporovať rozmanitosť a otvorenosť iným spôsobom života v športových priestoroch [12].

Zoznam použitej literatúry

- [1] Derek G., Johnston R., Pratt G., et al. (2009) The Dictionary of Human Geography. Reino Unido: Wiley-Blackwell, p. 1
- [2] Mott C. (2016) Feminist Geography. Oxford Bibliographies, p. 1
- [3] Burfoot A. (2016) First ladies of running: 22 inspiring profiles of the rebels, rule breakers, and visionaries who changed the sport forever. Rodale, p. 1
- [4] Wise N., Kohe G. Z. (2020) Sports geography: New approaches, perspectives and directions. Sport in Society, 23(1), p. 1
- [5] Ilieș A., Dehoorne O., Wendt J., et al. (2014) For geography and sport, sport geography or geography of sport. Geosport for Society, 1(1-2), p. 7
- [6] Knorre N., Kolář F., Dovalil J. (2004) Olympismus. Ženy a sport v olympijském hnutí, Praha: Olympia, p. 1
- [7] Vostatková P. (2020) Czechoslovak Female Athletes at the International Scene During The Interwar Period Between WWI and WWII. Sport i Turystyka, Środkowoeuropejskie Czasopismo Naukowe, 3(4), p. 1
- [8] Schůtová J. (2014) Ženské světové hry. Praha: Časopis Národního muzea, řada historická, 183(3-4), p. 15
- [9] Sekot A. (2006) Sociologie sportu. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita a Paido, Pedagogická edice, p. 1
- [10] Seman F. (2012) Mířníky světového športu. Olympizmus v praxi, Bratislava: Slovenský olympijský výbor, p. 1
- [11] Novotná V., et al. (2012) Gymnastika jako tvůrčí akt. Praha: Karlova Univerzita v Praze, Karolínium, p. 1
- [12] Pavlidis A. (2018) Making “space” for women and girls in sport: An agenda for Australian geography. Geographical research, 56(4), p. 343

Predikcia poškodenia lesných porastov v dôsledku veternej kalamity s využitím logistickej regresie

Vladimír Šagát

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyzickej geografie a geoinformatiky, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; sagat13@uniba.sk

Abstract

Prediction of windstorm-driven forest damage, using logistic regression

In the 20th century, windstorm-driven damages in temperate mountain forests increased, primarily due to forest management changes. Therefore, it is crucial to understand spatial and temporal patterns of deforestation, with a focus on its environmental drivers. In this study, we inspected the impact of selected topographic and biotic variables on deforestation in the central Low Tatras, Slovakia, using the logistic regression model. The response variable is the presence of deforestation driven by the Elisabeth windstorm (2004), while the explanatory variables are various environmental characteristics. The final model trained on historical data was applied to an up-to-date dataset, and the damage probability map was computed. Our model shows, that the risk of future deforestation rises with increasing elevation, decreasing slope, an increasing proportion of Norway spruce, and increasing average tree diameter. Most prone to the damage are also forests growing on the north-facing slopes close to the ridges, which are under active forest management.

Keywords: *Damage probability; Logistic regression; Low Tatras; Mountain forests; Windstorm*

Úvod a formulácia cieľa

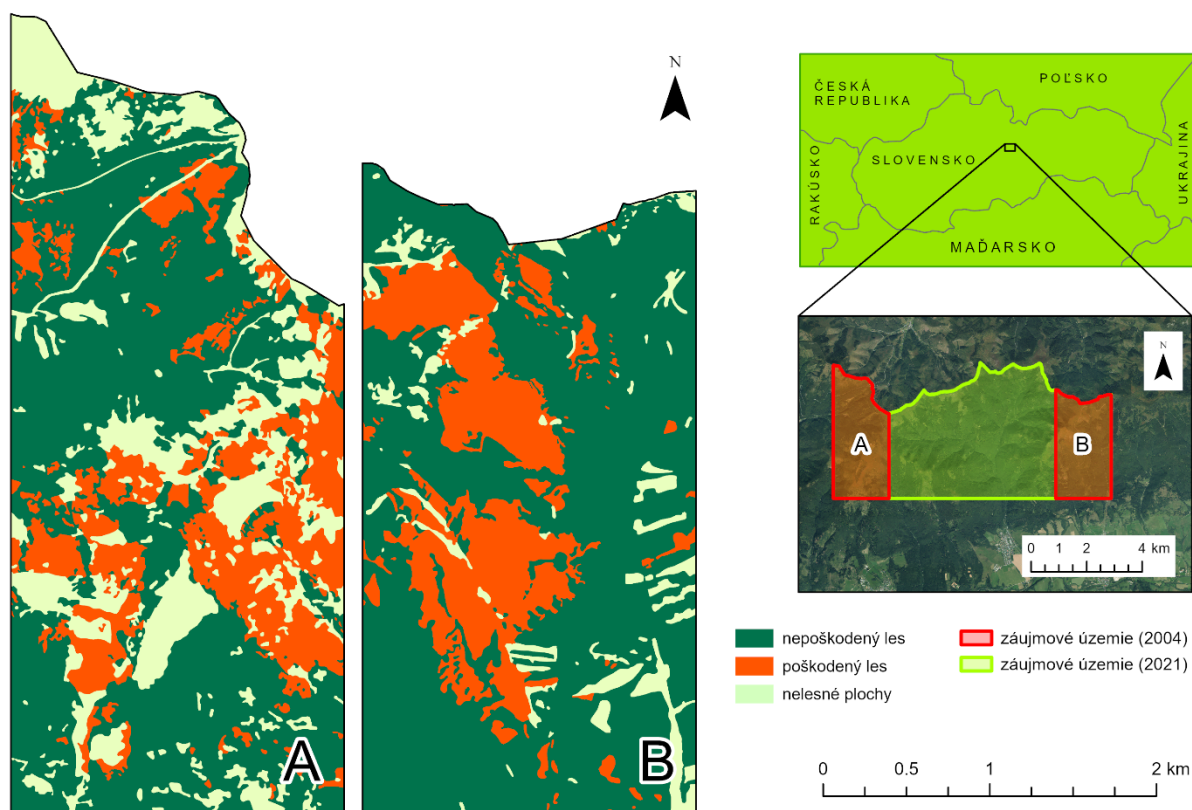
Veterné kalamity sú prirodzenou súčasťou cyklickej obnovy horských lesov [1]. V priebehu 20. storočia však miera tohto typu poškodenia významne vzrástla [2], a tak sa porozumeniu disturbančnej dynamiky lesov venuje omnoho väčšia pozornosť. Pomerne dôsledne boli preskúvané prírodné kalamity formujúce podhorie Vysokých Tatier [3, 4], pre ostatné geomorfologické celky Slovenska však nateraz podobné odborné štúdie absentujú. V tomto príspevku sme sa preto zamerali na horské lesy rastúce v centrálnej časti Nízkyh Tatier.

Pri výskume prírodných disturbancií sa aplikujú rôznorodé metódy štatistického modelovania, ktorých cieľom je objasniť vplyv environmentálnych charakteristík na prítomnosť, resp. intenzitu odlesnenia. Najčastejšie sa využívajú logistické regresné modely [5], generalized additive models [6], boosted regression trees [7], alebo pokročilejšie simulačné modely [8].

Cieľom tohto príspevku je pomocou logistického regresného modelu popísať vplyv vybraných prediktorov na prítomnosť odlesnenia po veternej kalamite z roku 2004, a zostaviť mapu zraniteľnosti lesných porastov voči poškodeniu vetrom pri ich súčasnej štruktúre.

Materiál a metódy

Záujmovým územím pre trénovanie modelu boli dve plochy s rozmerom približne 2 x 4 km ležiace južne od hlavného hrebeňa Nízkych Tatier, v okolí vrchov Beňuška (plocha A) a Babiná (plocha B). Mapa aktuálnej zraniteľnosti lesných porastov bola zostavená aj pre územie medzi nimi (Obr. 1).



Obr. 1. Záujmové územie a prítomnosť odlesnenia po veternej kalamite z roku 2004.

Podkladová mapa: Ortofotomozaika SR 2021 (GKÚ Bratislava, NLC).

Závislá premenná v modeli predstavuje prítomnosť odlesnenia po veternej kalamite z roku 2004 v binárnej škále. Disturbované plochy boli identifikované manuálne v softvéri ArcGIS PRO 3.0 na základe ortofotosnímkov z rokov 2002 a 2006. Minimálny mapovací areál a minimálny areál zmeny bol stanovený v súlade s modifikáciou metodiky CORINE Land Cover podľa Otáhel'a a kol. [9].

Rastre topografických nezávislých premenných boli vypočítané z voľne dostupného digitálneho modelu reliéfu „DMR 3.5“ s rozlíšením 10 m. Dáta o štruktúre lesných porastov boli získané z Programov starostlivosti o les so začiatkom platnosti v rokoch 1999, 2004, 2014 a 2019. Zoznam použitých nezávislých premenných je uvedený v Tab. 1.

Dáta o jednotlivých premenných boli extrahované do pravidelnej siete bodov s rozstupom 10 m. Následne bolo náhodne vyselektovaných 15 000 bodov pre každý stav závislej premennej, s minimálnou vzdialenosťou 20 m medzi vybranými bodmi.

Tab. 1. Nezávislé premenné použité v logistickom regresnom modeli

Kategória	Premenná	Skratka	Typ	Jednotka
Topografické	Nadmorská výška	ELEV	numerická	m
	Sklon	SLOPE	numerická	°
	Orientácia	ASP	kategorická (8)	-
	Expozícia voči severozápadnému vetru	NWDIR	numerická	°
	Horizontálna krivosť	PLAN	numerická	10 ⁻² z
	Spádníková krivosť	PROF	numerická	10 ⁻² z
	Topographic Position Index	TPI	numerická	-
	Topographic Wetness Index	TWI	numerická	-
Biotické	Počet druhov drevín v poraste	SPC	numerická	-
	Rovnakoveký / rôznoveký porast	EUAG	kategorická (2)	-
	Zastúpenie smreka obyčajného	PICEA	numerická	%
	Zastúpenie listnatých druhov drevín	DECX	numerická	%
	Maximálny vek porastu	AGE	numerická	rok
	Maximálna výška porastu	HGHT	numerická	m
	Priemerná hrúbka stromov v poraste	DBH	numerická	cm
	Zakmenenie porastu	DENS	numerická	-
	Ochranný / hospodársky les	FMR	kategorická (2)	-

Vybrané záznamy boli použité na tréovanie logistického regresného modelu. Model bol zostavený v softvéri RStudio 2022.02.0. Pri jednotlivých premenných sme testovali použitie logaritmických a mocninových transformácií [10], pričom aplikované boli transformácie znižujúce hodnotu Akaike Information Criterion (AIC).

Vo výslednom modeli bola testovaná multikolinearita prediktorov prostredníctvom Variance Inflation Factors (VIF). Premenné s VIF > 4 boli z modelu odstránené [11]. Následne sme zisťovali klasifikačnú schopnosť modelu na testovacích dátach prostredníctvom Receiver Operating Characteristic Curve (ROC) a Area Under Curve (AUC) [12].

Za účelom zostavenia mapy potenciálneho poškodenia lesa sme opakovali postup s extrakciou dát do pravidelnej bodovej siete s rozstupom 10 m. Trénovaný model sme aplikovali na aktuálne dáta, a získali sme predpokladané hodnoty závislej premennej v škále 0-1. Pravdepodobnosti poškodenia bola priradená k pravidelnej bodovej sieti. Napokon sme pripravili raster pravdepodobnosti poškodenia, s hodnotami reklasifikovanými do desiatich intervalov podľa percentilu predikovaného poškodenia v rámci záujmového územia.

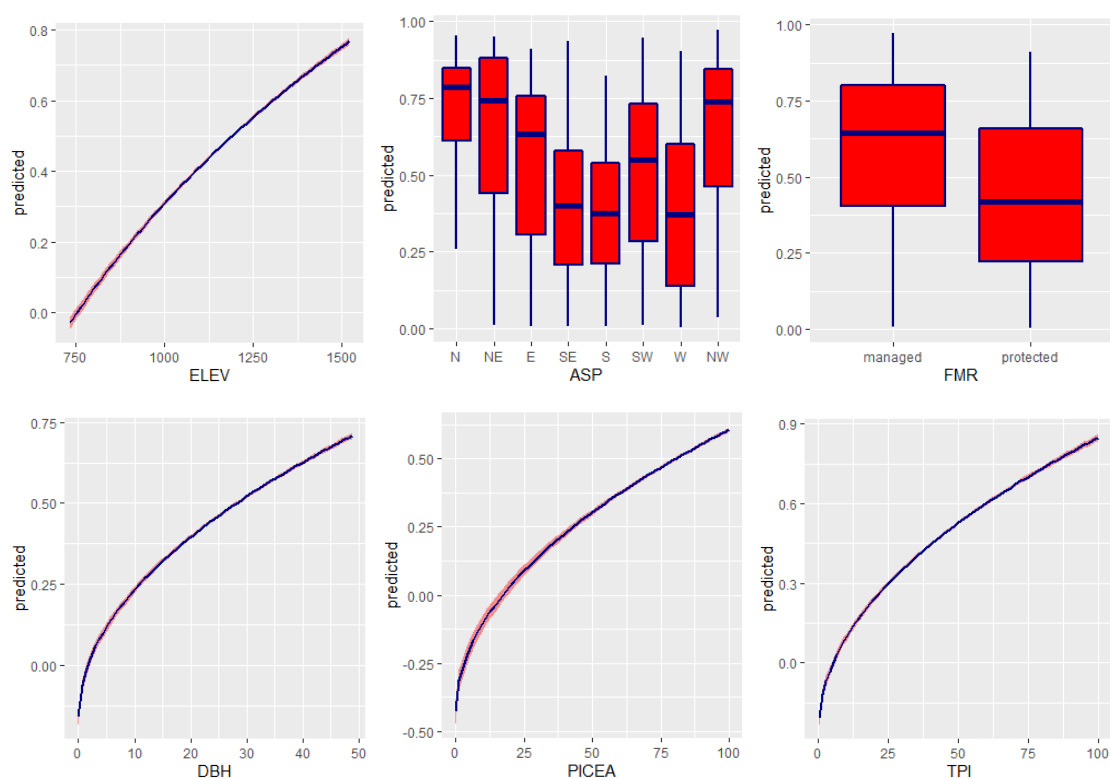
Výsledky a diskusia

Výsledný logistický regresný model dosiahol hodnoty $AUC = 0.80$ na trénovacích aj testovacích dátach. Premenné NWDIR, DECX a AGE boli z modelu odstránené z dôvodu nadlimitných hodnôt VIF. Vynechaná bola aj premenná PLAN, ktorá sa ukázala byť nesignifikantná ($p > 0.05$).

Podľa zostaveného modelu je riziko odlesnenia v dôsledku veternej kalamity najvyššie vo vyšších nadmorských výškach, na mierne sklonených svahoch, na svahoch orientovaných na sever, severovýchod a severozápad, na konvexných svahoch (v zmysle horizontálnej krivosti), v blízkosti chrbátice a na suchších pôdach (Obr. 2).

Ohrozenejšie sú porasty s vyšším zastúpením smreka obyčajného, nižším počtom druhom drevín, vyššími a hrubšími stromami, s nižšou hustotou, rôznoveké porasty, a hospodárske lesy oproti ochranným a lesom osobitného určenia (Obr. 2).

Najdôležitejšími premennými boli ELEV, ASP, FMR, DBH, PICEA a TPI. Mapa zraniteľnosti lesných porastov v záujmovom území pri ich súčasnej štruktúre je na Obr. 3.

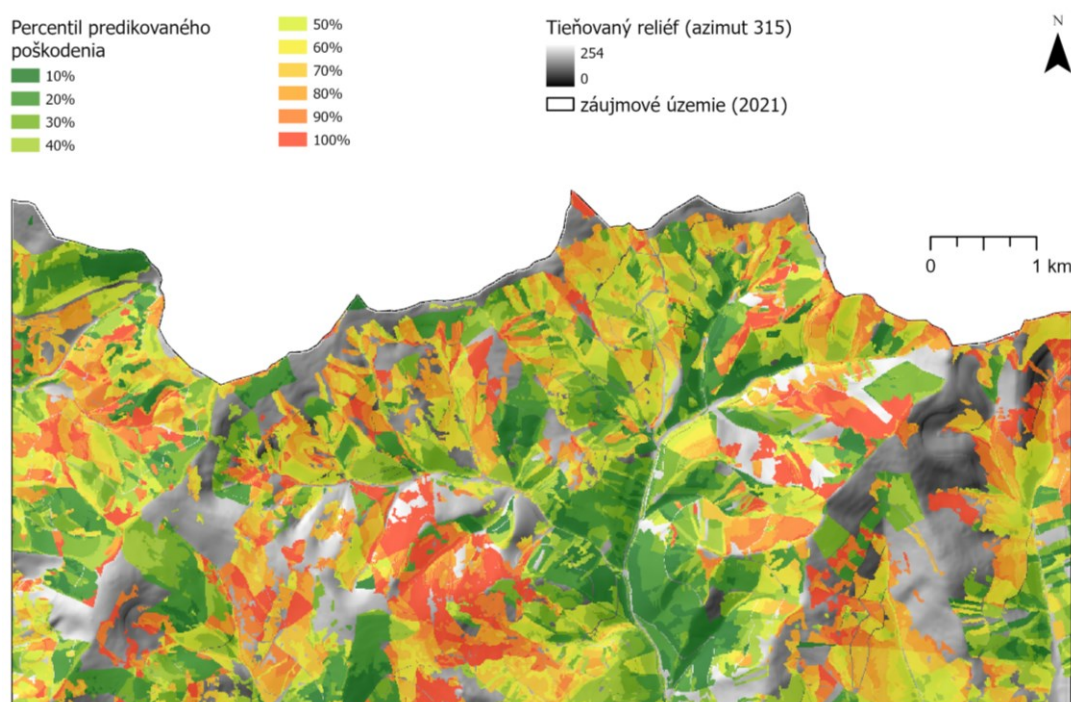


Obr. 2. Vplyv vybraných premenných na prítomnosť odlesnenia

Os X reprezentuje distribúciu dát jednotlivých premenných. Os Y popisuje pravdepodobnosť poškodenia odhadnutú výsledným logistickým regresným modelom na testovacích dátach. 95% interval spoľahlivosti je vyznačený červenou farbou.

Nárast poškodenia so stúpajúcou nadmorskou výškou zistili aj iní autori [13, 14]. Opačné výsledky publikovali napríklad [6, 15]. V prípade expozície svahu panuje všeobecná zhoda na tom, že najviac poškodené boli svahy priamo vystavené prúdeniu vetra počas disturbancie [3, 16, 17], čo potvrdzujú aj naše zistenia. Rozdielne výsledky sledujeme opäť pri svahovej pozícii (v našej štúdii TPI) [6, 17].

Autori sa ďalej zjednocujú na tom, že zraniteľnosť porastu stúpa s narastajúcim zastúpením smreka [4, 13]. V súvislosti s hrúbkou [10] poznamenáva, že najzraniteľnejšie sú stromy strednej hrúbky (30-50 cm). Obe tieto zákonitosti sa prejavujú aj na našom území. Prítomnosť hospodárskych zásahov v poraste je nateraz pomerne málo preskúmanou premennou, no výsledky našej štúdie sú v súlade s [10, 13].



Obr. 3. Zraniteľnosť lesných porastov voči poškodeniu veternou kalamitou pri ich aktuálnej štruktúre.
Zdroj: Digitálny model reliéfu „DMR 3.5“ (GKÚ Bratislava).

Pri vzájomných porovnaníach výsledkov možno pozorovať viacero kontradikcií. Modely prírodných disturbancií sú takmer výlučne stochastické, a majú teda regionálne limitovanú platnosť, ktorá vychádza predovšetkým z mikroklimatickej a topografickej disparity záujmových území [18]. Preto by podobné štúdie nemali venovať pozornosť len vplyvu environmentálnych prediktorov na mieru odlesnenia, ale tiež optimalizácii metodických postupov. Pokiaľ dôjde k simpifikácii a efektívizácii spracovania regresných

modelov, existuje predpoklad ich širšieho využitia v lesníckej praxi.

Záver

V tomto príspevku sme s využitím logistického regresného modelu vyhodnotili vplyv vybraných environmentálnych prediktorov na prítomnosť odlesnenia po veternej kalamite z roku 2004 pre záujmové územie v centrálnej časti Nízkych Tatier. Najvýznamnejší vplyv mali nadmorská výška, expozícia, kategória lesa z hľadiska manažmentu, hrúbka stromov a zastúpenie smreka obyčajného. Model sme následne aplikovali na dáta o súčasnej štruktúre lesných porastov, a zostavili sme mapu ich zraniteľnosti. Výsledky majú regionálne obmedzenú platnosť, no sú využiteľné v lesníckej praxi, najmä pri optimalizácii štruktúry lesov za účelom minimalizácie ich potenciálneho poškodenia veternou kalamitou.

Zoznam použitej literatúry

- [1] White P., Pickett S. (1985) The Ecology of Natural Disturbance and Patch Dynamics. Academic Press, Orlando, p. 6
- [2] Schelhaas M. J., Nabuurs G. J., Shuck A. (2003) Global Change Biol. 11, p. 1620
- [3] Minár J., Falt'an V., Bánovský M. et al. (2009) Landform Analysis 10, p. 95
- [4] Ochtyra A. (2020) Forests 5, p. 1
- [5] Jalkanen A., Mattila U. (2000) Forest Ecol. Manag. 135, p. 315.
- [6] Falt'an V., Katina S., Minár J. et al. (2020) Forests 12, p. 1
- [7] Suvanto S., Peltoniemi M., Tuominen S. et al. (2019) Forest Ecol. Manag. 453, p. 1
- [8] Dobor L., Hlásny T., Zimová S. (2020) Ecol. Evol. 21, p. 12233
- [9] Oľahel' J., Feranec J., Kopecká M. et al. (2017) Geografický časopis 3, p. 189
- [10] Klopčic M., Poljanec A., Gartner A. et al. (2009) Econsience 1, p. 48
- [11] Fox J., Monette G. (1992) J. Am. Stat. Assoc. 417, p. 178
- [12] Fawcett T. (2006) Pattern Recogn. Lett. 8, p. 861
- [13] Klaus M., Holsten A., Hostert P. et al. (2011) Forest Ecol. Mang. 261, p. 1799
- [14] Valinger E., Fridman J. (1999) Environ. Manage. 2, p. 209
- [15] Mayer P., Brang P., Dobbertin M. et al. (2005) Ann. For. Sci. 4, p. 303
- [16] Kramer M., Hansen A. J., Taper M. L. et al. (2001) Ecology 10, p. 2749
- [17] Čada V., Morrissey R. C., Michalová Z. et al. (2016) Forest Ecol. Manag. 363, p. 169
- [18] Lanquaye-Opoku N., Mitchell S. (2005) Forest Ecol. Manag. 216, p. 134

Vývoj a charakteristika zrážkových pomerov Vysokých a Belianskych Tatier v kontexte klimatickej zmeny

Marcel Vasiľák

*Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Prírodovedecká fakulta, Ústav geografie, Jesenná 5,
040 01 Košice, Slovenská republika; marcel.vasilak@student.upjs.sk*

Abstract

Development and characteristics of precipitation conditions in the Vysoké and Belianske Tatra Mountains

Tatras show very interesting and various surroundings. It has been attractive for the people coming there with different intentions due to its feature and massivity since time immemorial. These mountains represent a specific and changeable complex of climate, biospherical, geological and hydrological aspects, which make this area unique. The location of mountain is also specific – in the north temperate zone with elements of oceanic climate and continental mountain climate too. We were analysing the hydrology of Tatras, especially precipitation development in more periods from 1961-2020, in dependence of the meteorological station and concrete indicator. We also put the emphasis on the connection between the founded information and climate change in the Tatra Mountains, which has real and mostly negative effects on Tatra's nature, people, soil etc. Actually, there are a lot of factors directly influencing the climate in each location – orography, local air and precipitation flows etc.

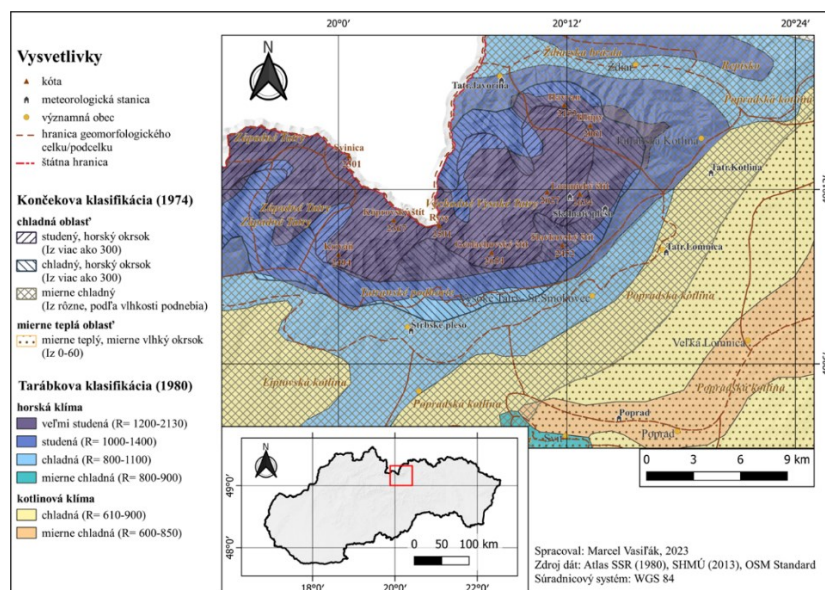
Keywords: *precipitation; orography; extremes; climate change*

Úvod a formulácia cieľa

Cieľom našej práce bolo vyhodnotenie vývoja (v určitých obdobiach) a charakterizácia súčasných zrážkových pomerov vo Vysokých a Belianskych Tatrách, pričom sme sa snažili výsledky dať do súvisu s klimatickou zmenou, ktorá sa dotýka aj zrážok.

Tatry vzhľadom na svoju výšku, polohu a orientáciu predstavujú výrazný faktor vplývajúci na proces kondenzácie pár, tvorbu dažďových oblakov a rozdelenie zrážok v rôznych výškových pásmach a tiež iné procesy [1]. V prostredí Vysokých a Belianskych Tatier je priestorové rozloženie zrážok ovplyvnené orografiou, nadmorskou výškou, orientáciou svahov a existenciou náveterných a záveterných strán [2], kde najväčší úhrn je na SZ a Z svahoch, najmenší na J a JV strane. Zrážkový režim v Tatrách zodpovedá oblastiam s kontinentálnou klímou horského typu s vysokými letnými úhrnmi, ovplyvnených atmosférickou cirkuláciou, lokálnymi poveternostnými poruchami a striedaním vzduchových hmôt [1].

Z hľadiska klimatickej (klimaticko-geografickej) klasifikácie oblasti podľa Končeka (1974) a Tarábka (1980) sa vyčleňujú pásma aj podľa ročných priemerných úhrnov zrážok R (za obdobie 1931-1960), resp. indexu zavlaženia podľa Končeka I_z (v mape ako I_z), ktorý závisí aj od viacerých zrážkových parametrov [3].



Obr. 1. Klimatická regionalizácia Vysokých Tatier podľa Končeka (1974) a Tarábka (1980)

Materiál a metódy

Hlavnou časťou práce bol zber meteorologických dát zo staníc Tatranská Kotlina (ďalej ako TK), Štrbské pleso (ďalej ako ŠtP), Lomnický štít (ďalej ako LŠ), Skalnaté pleso (ďalej ako SkP), Tatranská Javorina (ďalej ako TJ) a Tatranská Lomnica (ďalej ako TL), s využitím nasledujúcich zdrojov: *Klíma Tatier* (Končeka et al. 1974) – historické dáta do r. 1960 (obdobia 1951-1960), *NKP 13-II/15* [4] – dáta za obdobie 1961-1990, *NKP 15/20* [5] – dáta za obdobie 1981-2010 a *SHMÚ* – dáta za roky 2011-2020 (na základe žiadosti o poskytnutie údajov).

Pri čo najkomplexnejšom zbere dát sme boli obmedzení dostupnosťou dát z uvedených zdrojov, s dôrazom na výber dát pre priestorovo rovnomerné rozloženie staníc. V práci sme pracovali s MS Excel, GIS softvérom QGIS a štatistickým programom R.

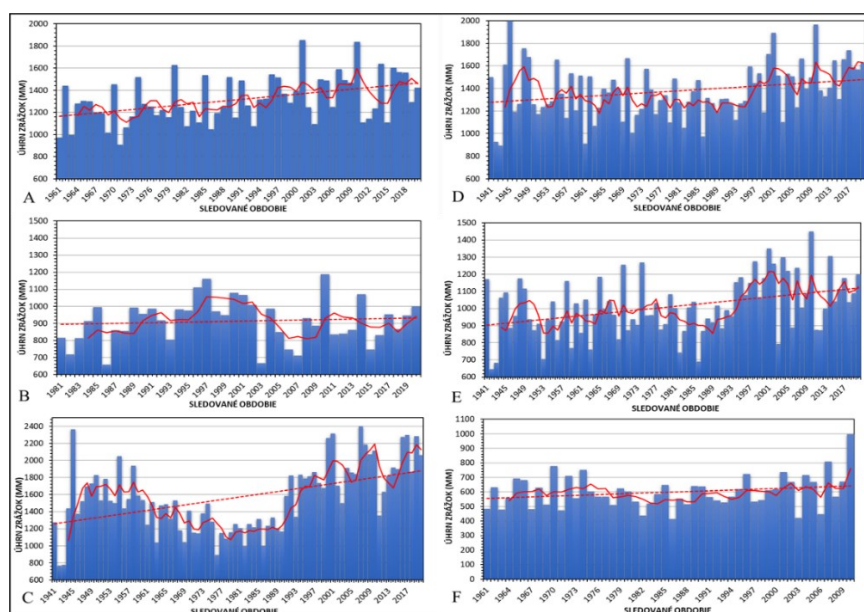
Na určenie smeru lineárnej závislosti (ďalej ako LZ) sme vykreslili lineárnu regresnú priamku, alternatívne pri časových radoch aj krivku kĺzavého priemeru (za obdobie 2 roky). Silu LZ sme vypočítali pomocou Pearsonovho korelačného koeficientu k . Mieru premenlivosti (variability) ukazovateľov v časových vývojových radoch sme vyjadrili pomocou smerodajnej odchýlky a variačného koeficientu. Nakoniec sme vyjadrili štatistickú významnosť trendu závislosti pomocou t-testu (na hladine významnosti $\alpha=0,05$), kde sme využili princíp testovania hypotéz založeného na vyvrátení alebo potvrdení nulovej hypotézy v závislosti na p-hodnote [6].

Výsledky a diskusia

Zrážkomerná sieť nie je v Tatrách a predhorí vzhľadom na orografické pomery Tatier rovnomerne rozdelená [1], avšak sme sa snažili, aby výber obsahoval stanice celkom rovnomerne rozložené vzhľadom na geografickú polohu a nadmorskú výšku - TK, SkP, ŠtP, LŠ, TJ a PP.

V prvom rade sme sa zaoberali ročným úhrnom zrážok na našich lokalitách (obr. 2) a jednoduchou štatistickou analýzou časových trendov vývoja tejto charakteristiky (tab. 1).

Hodnotené obdobia boli roky 1941-2020 (stanice SkP, ŠtP a LŠ), 1961-2020 (stanica TJ), 1981-2020 (stanica TK) a 1961-2010 (stanica PP), v závislosti od dostupnosti dát.



Obr. 2. Ročný úhrn zrážok na staniciach TJ (graf A), TK (B), LŠ (C), SkP (D), ŠtP (E) a PP (F) (zdroj: SHMÚ)

Tab. 1 Štatistické vyhodnotenie časových trendov ročných úhrnov zrážok na vybraných staniciach
¹ štatisticky významný časový trend Zdroj: SHMÚ

Stanica	TJ	LŠ	SkP	ŠtP	PP	TK
Smerodajná odchýlka	210	394	240	167	110	128
Pearsonov koeficient korelácie	0,42 ¹	0,75	0,48	0,38	0,24	0,09
Variačný koeficient	0,20	0,25	0,17	0,17	0,18	0,14

Vďaka pomerne veľkému variačnému koeficientu a smerodajným odchýlkam pre jednotlivé lokality sme pozorovali veľkú variabilitu úhrnov medzi jednotlivými rokmi na všetkých staniciach. Štatisticky významný nárast nastal na 4 staniciach (tab. 1), ktoré sú vo vyšších alebo stredných polohách (nad 1000 m n. m.) s najsilnejšou LZ na LŠ. Tento nárast môže súvisieť s častejším výskytom hlavne krátkodobých a intenzívnych zrážok [7], a j z dôvodu klimatickej zmeny – zvyšovanie priemernej globálnej teploty vzduchu a povrchov oceánov, čím rastie aj výpar z povrchu, a potom obsah vodnej pary v atmosfére [7]. Tento jav pozorujeme intenzívnejšie práve vo vyšších

polohách, kde sa táto oblačnosť vytvára. Na dvoch staniciach (TK a hlavne PP) je za viacročné obdobia stabilný priemerný úhrn zrážok s menšími ročnými úhrnmi v porovnaní s inými stanicami kvôli vplyvu zrážkového tieňa – polohy staníc na záveternej strane horského masívu.

Zrážkové pomery a úhrny súvisia aj s nadmorskou výškou, pričom krátko sme sa zaoberali aj touto závislosťou za obdobie 2001-2020 (tab. 2). Zistili sme, že s rastúcou nadmorskou výškou rastie priemerný úhrn zrážok, pričom efekt orientácie lokality voči pohoriu bol viditeľný na TJ (náveterná severná strana), kde aj napriek nižšej nadmorskej výške bol vyšší priemerný úhrn zrážok oproti ŠtP (čiastočne záveterná strana s orografickou horskou bariérou zo západu a severozápadu).

Tab. 2 Priemerné úhrny zrážok v rôznych nadmorských výškach za určité obdobia na vybr. staniciach
² priemerný úhrn zrážok za obdobie 2001-2010 Zdroj: SHMÚ

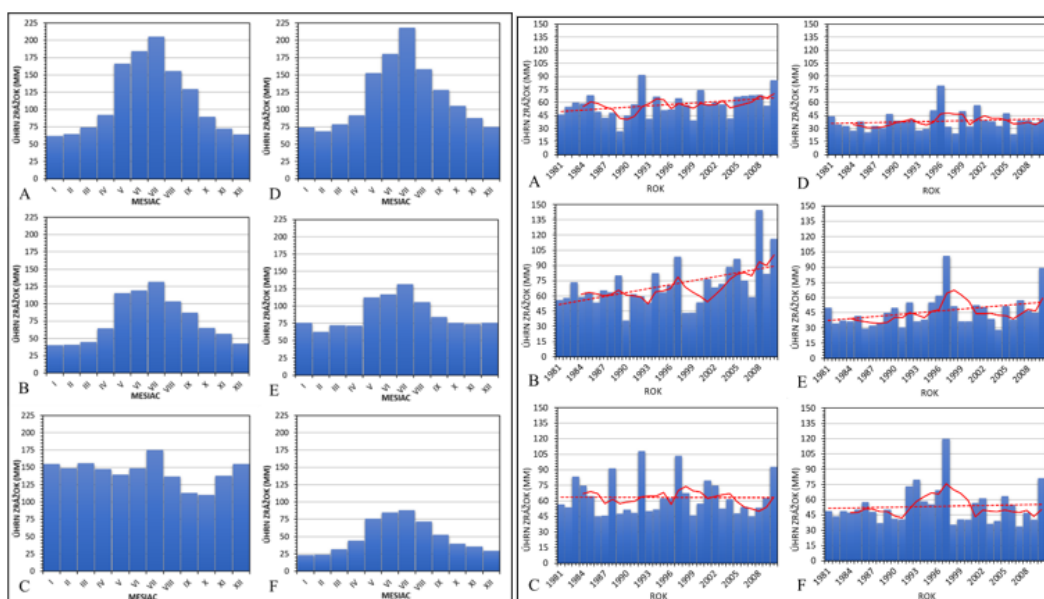
	PP	TK	TJ	ŠtP	SkP	LŠ
Nadmorská výška stanice (m n. m.)	694	803	1013	1322	1778	2635
Priemerný úhrn zrážok za 2001-2020	671 ²	899	1425	1116	1528	1966

Ďalej sme charakterizovali zrážkový režim v oblasti, ktorý súvisí s ďalšími zložkami krajiny, pomocou priemerného ročného chodu zrážok (obr. 3) na rovnakých staniciach za obdobie 1981-2020 (pri PP za 1981-2010).

Z našich zistení plynie, že najvyrovnanejší priemerný ročný chod zrážok je na LŠ s maximom v júli a minimom v septembri a októbri. Maximum je spôsobené formovaním kopovitej zrážkovej oblačnosti, v dôsledku vysokých teplôt, vyššieho výparu z povrchu a výstupného konvektívneho prúdenia ohriateho vzduchu [2]. Minimum môže byť spôsobené obdobím babieho leta spojeného so suchým a slnečným radiačným typom počasia. V ostatných staniciach boli maximá tiež v júli, pričom to súvisí so zonálnym prúdením a letnými búrkami z tepla [8] a minimá vždy v zime (január a február), vo vyššie položených staniciach vo februári. Extrémne hodnoty úhrnov sú v PP posunuté k nižším hodnotám opäť pravdepodobne kvôli zrážkovému tieňu.

Klimatická zmena sa aj v Tatrách prejavuje v prvom rade zvýšenou priemernou teplotou [9], pričom táto zmena má dopad aj na klimatické, biosférické, pôdne a hydrologické pomery, napr. stále častejší výskyt už spomínaných extrémnych úhrnov (intenzívne a krátkodobé zrážky (5-180 min.), tzv. lejaky alebo prívalové dažde [7]. Ich intenzita sa celosvetovo zvýšila hlavne v posledných dekádach (o 4-7 %), pri búrkových zrážkach až 14 % [7]. Z toho dôvodu sme sa v tejto časti zaujímali aj o časové rady priemerných max. denných úhrnov zrážok (obr. 4) z dostupných dát za obdobie 1981-2010 (ročne, na rovnakých staniciach). Tieto rady sa vyznačovali pomerne vysokou

variabilitou (z veľkosti variačného koeficientu a smerodajnej odchýlky) a boli rastúce ročne aj sezónne na stanici TJ, LŠ a ŠtP, pričom časové rady sme štat. vyhodnotili v tab. 3.



Obr. 3 Priemerný ročný chod zrážok pre stanice TJ (graf A), TK (B), LŠ (C), SkP (D), ŠtP (E) a PP (F) (zdroj: SHMÚ)

Obr. 4 Časové rady priemerných max. denných úhrnov (ročne) na staniciach LŠ (graf A), TJ (B), SkP (C), PP (D), ŠtP (E) a TK (F)

Tab. 3 Štatistické vyhodnotenie časových radov priemerných max.denných úhrnov zrážok³ štatisticky významný trend

Stanica	LŠ	TJ	SkP	PP	ŠtP	TK
smerodajná odchýlka	14	22	18	11	16	18
Pearsonov korel. koeficient	0,35	0,51 ³	-0,01	0,13	0,33	0,06
Variačný koeficient	0,24	0,32	0,28	0,29	0,35	0,34

Najčastejšia slabá korelácia bola pozorovaná v časových radoch v zime na staniciach LŠ, PP a TK. Na LŠ bola tiež zaznamenaná stredne silnú štat. významnú LZ na jar, v TJ slabá LZ v lete.

Stručne sme porovnali početnosti dní so zrážkami dennej výdatnosti min. 10 mm medzi obdobiami 1951-1960 a 1981-2010, kde bol možný súvis s vývojom extrémnych zrážkových úhrnov. V staniciach TJ, ŠtP došlo ku miernemu nárastu počtu dní, v ostatných lokalitách boli trendy stabilné. Došli sme k záveru, že vplyv extrémnejších zrážok sa môže ale nemusí prejaviť, okrem zvyšujúcich sa priemerných max. úhrnov zrážok (obr. 4), aj vo vyššej početnosti dní s výdatnejšími zrážkami (min. 10 mm), zohľadňujúc presnosť a variabilitu jednotlivých parametrov.

Záver

V práci sme vyhodnotili do určitej hĺbky niektoré charakteristiky zrážkových pomerov v oblasti Východných Tatier. Zachytili sme a jednoducho štatisticky popísali časové trendy pri priemerných úhrnoch zrážok za 60-ročné obdobie, kde v niektorých prípadoch išlo o významne rastúce závislosti do istej miery súvisiace so zmenou klimatických pomerov. Charakterizovali sme ročný chod zrážok a závislosť úhrnu zrážok a nadmorskej výšky, pričom v oboch ukazovateľoch platia určité lokálne osobitosti. Dôsledky klimatickej zmeny – častejšie intenzívne zrážky [7] sme sa snažili demonštrovať na časových radoch priemerných max. úhrnoch zrážok a z početností dní so zrážkami vyšších výdatností. Zistili sme, že zmeny a trendy niektorých charakteristík sa aj napriek pravdepodobnému vplyvu klimatickej zmeny nepreukázali, ani štatisticky nepotvrdili na všetkých staniciach a v rovnakej miere. To naznačuje prítomnosť ďalších významných lokálnych faktorov ovplyvňujúce zrážkové pomery v oblasti (orografia, lokálne prúdenie atď.).

PodĎakovanie

Touto cestou by som chcel poďakovať vedúcemu práce Dr. Sládekovi za pripomienky k práci, za odbornú korektúru a čas strávený konzultáciami tejto práce, ako aj SHMÚ za poskytnuté dáta z rokov 2011-2020, pričom tieto údaje mi boli poskytnuté prioritne na účely bakalárskej práce.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Chomicz K., Šamaj F. (1974) Zrážkové pomery. In: Konček M. et al. (eds.) Klíma Tatier. Veda (Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied), Bratislava, p. 443
- [2] Konček M., et al. (1973) Klimatické pomery Tatier. In: Strnka M., Marček A. (eds.) Zborník prác o tatranskom národnom parku. Osveta, Tatranská Lomnica (Správa TANAP-u), p. 239
- [3] Atlas SSR (1980) Slovenská akadémia vied, Slovenský úrad geodézie a kartografie
- [4] Mikulová K., Faško P., Šťastný P. (2015) Klimatologické normály atmosférických zrážok za obdobie 1961-1990 na Slovensku. SHMÚ, Bratislava, p. 55
- [5] Mikulová K., et al. (2020) Klimatické normály atmosférických zrážok 1981-2010 na Slovensku, SHMÚ, Bratislava, p. 8
- [6] Klein, D. 2020. Pokročilé štatistické metódy. UPJŠ [Citované: 12.03.2023] <<https://unibook.upjs.sk/img/cms/2020/pf/pokrocile-statisticke-metody.pdf>>
- [7] SHMÚ [Citované: 12.03.2023] <<https://www.shmu.sk/sk/?page=2049&id=932i>>
- [8] Hlavatá H., Škvarenina J., Čepčková E. (2011) Životné prostredie 45(2), p. 64
- [9] SHMÚ [Citované: 12.03.2023] <<https://www.shmu.sk/sk/?page=1379>>

Identifikácia náveterných a záveterných polôh Slovenska pri severných a južných cyklonálnych situáciách

Peter Zaujec

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyzickej geografie a geoinformatiky, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 84215 Bratislava, Slovenská republika; zaujec8@uniba.sk

Abstract

Identification of windward and leeward positions of Slovakia in northern and southern cyclonic situations
The article examines identification of windward and leeward positions of Slovakia in northern and southern cyclonic situations in period 1981 – 2020. In the span of these years, 798 stations provided by SHMÚ (Slovak Hydrometeorological Institute) were a source of information used during examinations in the selected area. We processed sub-situations in the form of precipitation totals using Microsoft Excel software and subsequently created individual sub-fields of all situations in ArcGis software. We created precipitation fields using the interpolated method “topo to raster” for the mean annual totals and for the mean annual totals of the northern and southern individual cyclonic situations. Based on the proportion of the mean annual precipitation totals for the studied cyclonic situations from the total mean annual precipitation totals, we determined the windward, leeward and neutral positions. Presented results could be used in several scientific areas, especially in climatology, meteorology, and hydrology.

Keywords: *Slovakia; northern and southern cyclonic situations; windward and leeward positions*

Úvod a formulácia cieľa

Vodu radíme medzi základné podmienky existencie života. V prírode je obsiahnutá vo všetkých troch skupenstvách a je najrozšírenejšou látkou na Zemi, pričom väčšina svetovej zásoby vody je v oceánoch. Pre tento príspevok je najdôležitejšia voda, ktorá sa zúčastňuje na hydrologickom cykle v podobe zrážok. Vyparovanie vody z oceánov a následná kondenzácia, resp. desublimácia vodnej pary je dôležitou súčasťou tvorby zrážok, ktoré majú významnú úlohu pri vytváraní klímy Zeme.

V príspevku sa budeme venovať všetkým typom severných a južných cyklonálnych situácií, ktoré prinášajú atmosférické zrážky do našej oblasti. Konkrétne sa jedná o tieto typy: severozápadná cyklonálna situácia (NWc), severná cyklonálna situácia (Nc), severovýchodná cyklonálna situácia (NEc), juhovýchodná cyklonálna situácia (SEc), juhozápadná cyklonálna situácia 1. typu (SWc1), juhozápadná cyklonálna situácia 2. typu (SWc2) a juhozápadná cyklonálna situácia 3. typu (SWc3).

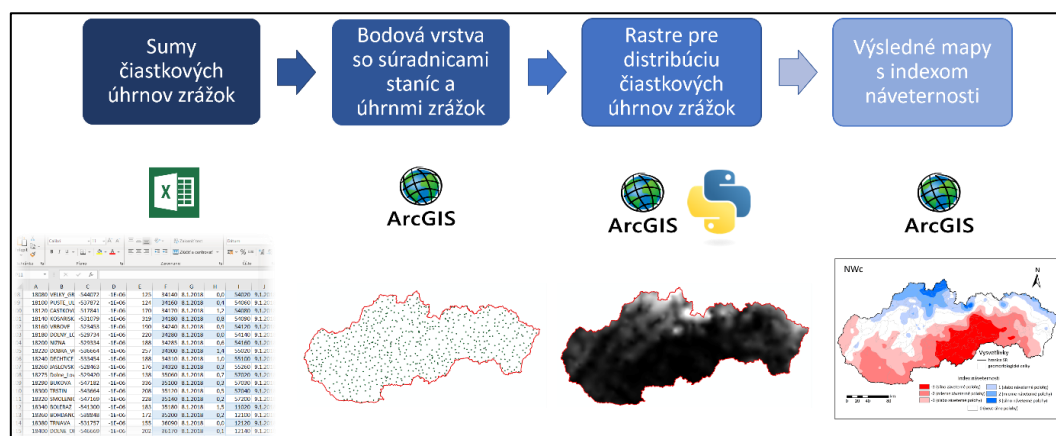
Hlavným cieľom príspevku bolo pre jednotlivé situácie spracovať do mapovej formy index náveternosti a identifikovať tak náveterné (zvýšený úhrn zrážok), záveterné (znížený úhrn zrážok) a neutrálne polohy. Efekt tvorby náveterných a záveterných polôh je primárne ovplyvnený prevládajúcim prúdením vzduchu v kombinácii s členitým georeliéfom Slovenska.

Materiál a metódy

Základom analýzy indexu náveternosti boli úhrny zrážok zo siete zrážkomerných staníc SHMÚ na celom území Slovenska v období rokov 1991-2020. Staničná sieť mala v skúmanom 30 ročnom období k dispozícii 798 staníc, pričom každý rok sa na približne 600 staniaciach stabilne merali úhrny zrážok. Sieť staníc bola relatívne rovnomerne rozložená s výnimkou najvyššie položených častí Slovenska.

Predmetom hlavného spracovania boli ročné a denné, resp. 24-hodinové úhrny zrážok (od 7.00 do 7.00 nasledujúceho dňa). Doplnkovým, ale dôležitým údajom boli geografické súradnice, indikativy a názvy zrážkomerných staníc. Zrážkové úhrny boli triedené v prostredí softvéru Office Excel na základe skúmaných cyklonálnych typov podľa Kalendára poveternostných situácií, vychádzajúceho z Katalógu poveternostných situácií [1]. Ďalej boli ročné a denné úhrny zrážok spracované v programe ArcGIS interpolačnou metódou *Topo to Raster*. Spomínaná metóda počíta odhad interpolovanej hodnoty zo štyroch susedných bodov a využíva pritom iteračnú metódu konečných diferencií [2]. Zjednodušená schéma spracovania výsledných máp s indexom náveternosti je znázornená na Obr. 1.

Mapy s indexom náveternosti jednotlivých situácií boli vytvorené ako podiel priemerných ročných úhrnov zrážok jednotlivých situácií z celkového priemerného ročného úhrnu zrážok. Index náveternosti sme dostali ako: priemerný ročný úhrn zrážok skúmanej situácie/priemerný ročný úhrn zrážok. Výsledky sme rozdelili na 8 rovnakých tried, pričom prvé tri intervaly reprezentujúce najnižšie hodnoty predstavovali záveterné polohy (index -1, -2 a -3), prostredné dva intervaly neutrálne polohy (index 0) a posledné 3 intervaly s najvyššími hodnotami náveterné polohy (index 1, 2 a 3). Podrobná metodika je popísaná v práci Zrážkové pomery Slovenska pri severných a južných cyklonálnych situáciách [3].

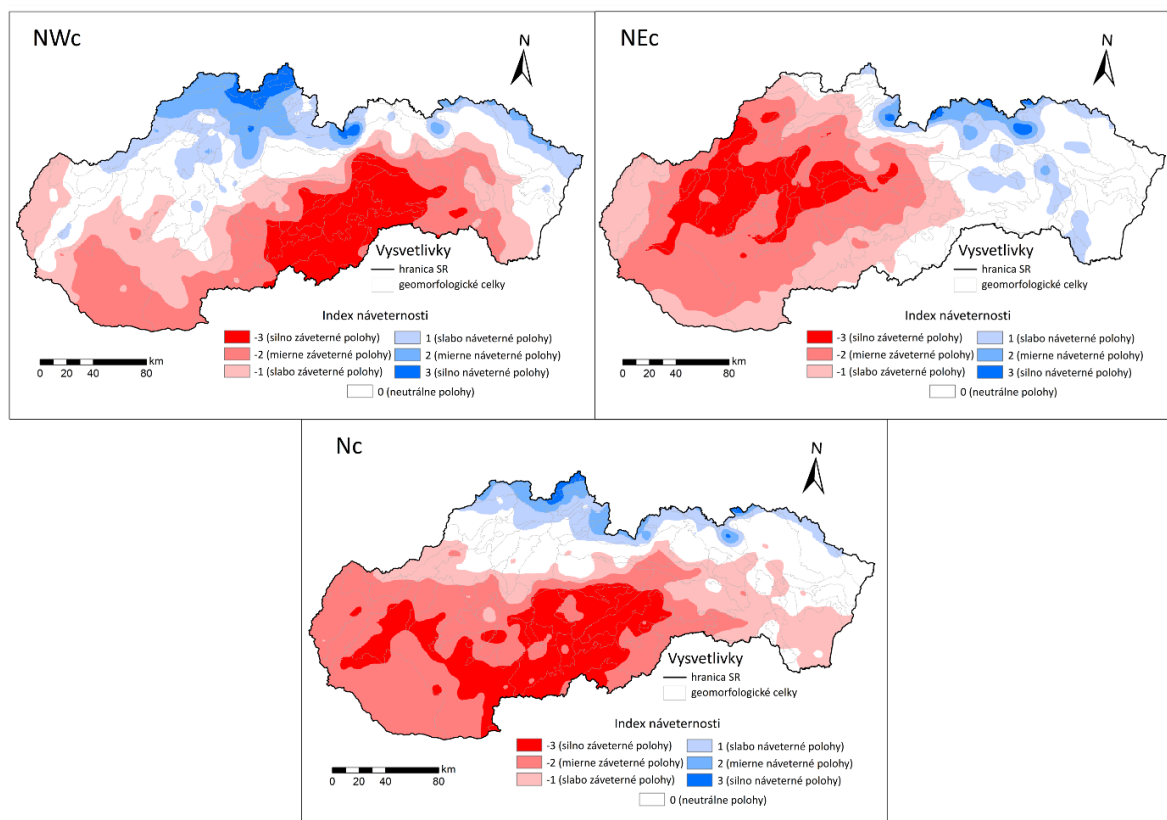


Obr. 1. Zjednodušená schéma spracovania dát do mapovej podoby
Zdroj: [1], z poskytnutých dát SHMÚ, ZBGIS, vlastné spracovanie

Výsledky a diskusia

Pri severných (NWc, Nc, NEc) typoch situácii sú náveterné polohy situované najmä v Žilinskom kraji a celkovo na celom pohraničí Slovenska s Poľskom. Pri type NWc a Nc môžeme silne náveterné polohy vidieť napr. v geomorfologických celkoch Kysucká vrchovina, Kysucké Beskydy, Oravské Beskydy, Oravská Magura, Podbeskydská Brázda a Tatry. Pri NEc type napr. v Ľubovnianskej vrchovine, v Busove a v centrálnej časti Čergova. Okrem toho môžeme z Obr. 2 mierne a slabo náveterné polohy lokalizovať napr. v geomorfologických celkoch Javorníky, Turzovská vrchovina, Moravsko-sliezske Beskydy, Jablunkovské medzihorie, Malá Fatra (Krivánska časť), Veľká Fatra, sever Turčianskej a Podtatranskej kotliny, Oravská vrchovina, Oravská kotlina, Skorušinské, Chočské a Bukovské vrchy, Čergov, Busov a na krajnom severe Ondavskej a Laboreckej vrchoviny.

Naopak pre NWc a Nc typ, môžeme záveterné polohy z Obr. 2 identifikovať najmä v južnej polovici Slovenska (najmä Gemer a Dolný Spiš). Pri NEc type sa jedná predovšetkým o západnú polovicu územia (najmä Trenčiansky kraj). Silne záveterné polohy sú pri NWc a Nc type situované napr. v geomorfologických celkoch Podunajská pahorkatina, Juhoslovenská kotlina, Cerová vrchovina, Ostrôžky, Bodvianska pahorkatina, Revúcka vrchovina, Stolické vrchy, Spišsko-gemerský kras a juhovýchod Podtatranskej kotliny. Pri NEc type sú silne záveterné polohy napr. v geomorfologických celkoch Považský Inovec, Považské podolie, Zvolenská kotlina a Starohorské vrchy. Ďalej môžeme pre všetky severné typy odčítat mierne a slabo záveterné polohy z Obr. 2.

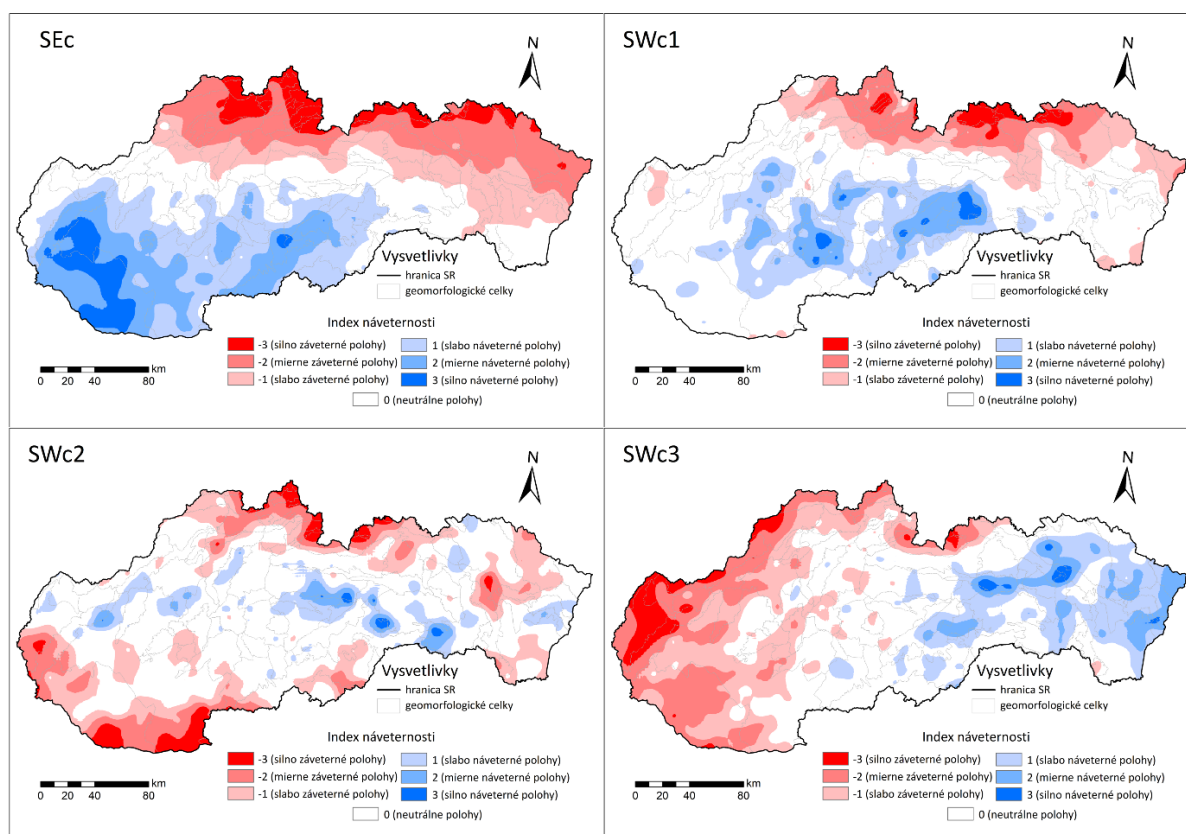


Obr. 2. Index náveternosti pri severných typoch cyklónálnych situácií (typy NWc, Nc, NEc)

Zdroj: [1], z poskytnutých dát SHMÚ, ZBGIS, vlastné spracovanie

Vzájomne príbuzné situácie SWc1, SWc2 a SWc3 sa medzi sebou líšia trajektóriou pohybu, ktorá následne ovplyvňuje priestorové rozmiestnenie zrážok a tým pádom aj rozdielnosť samotných výsledkov máp s indexom náveternosti. Pri situácii typu SEc je priestorová variabilita zrážok charakterizovaná výrazným rozdielom medzi severovýchodnou a juhozápadnou časťou územia Slovenska, čo sa odzrkadlilo aj na výsledkoch máp s indexom náveternosti. Z Obr. 3 možno pre juhozápadné typy cyklónálnych situácií odčítať silno náveterné polohy napr. v geomorfologických celkoch Stolické vrchy, Rožňavská vrchovina, Horehronské podolie a Štiavnické vrchy. Pri SEc situácii sa silno náveterné polohy nachádzajú predovšetkým na rozhraní geomorfologických celkov Malé Karpaty a Podunajská pahorkatina. Slabo a mierne náveterné polohy možno v rámci jednotlivých južných cyklónálnych situácií identifikovať v rámci Slovenska rôzne.

Na druhej strane sú pri južných typoch cyklónálnych situácií situované silno záveterné polohy najmä v geomorfologických celkoch hraničiacich s Poľskom a Českom ako napr. Borská nížina, Javorníky, Oravská Magura, Oravské Beskydy, Spišská Magura, Pieniny a iné. Slabo a mierne záveterné polohy sa vyskytujú v závislosti od typu situácie rôzne, čo možno jednoducho odčítať z Obr.3



Obr. 3. Index náveternosti pri južných typoch cyklonálnych situácií (typy SEc, SWc1, SWc2 a SWc3)

Zdroj: [1], z poskytnutých dát SHMÚ, ZBGIS, vlastné spracovanie

Záver

Novou metodikou vytvárania máp pre náveterné a záveterné polohy sme sa zbavili polôh, kde sú vyššie, resp. nižšie úhrny zrážok nie vždy kvôli náveternému, resp. záveternému efektu, ale kvôli nadmorskej výške. Výsledky náveterných a záveterných lokalít nám teda priniesli v niektorých oblastiach Slovenska významné rozdiely oproti predchádzajúcim prácam bývalých študentov Katedry fyzickej geografie a geoinformatiky [4, 5].

Pri konštatovaní samotných výsledných máp tejto časti výsledkov vidíme pri severných typoch cyklonálnych situácií (NWc, Nc, NEc) len malé plochy náveterných polôh (predovšetkým v pohraničnej oblasti Slovenska s Poľskom) oproti veľkým plochám záveterných polôh (najmä južná polovica Slovenska). Naopak rozdiel medzi veľkosťou plôch náveterných a záveterných polôh pri južných typoch cyklonálnych situácií (SEc, SWc1, SWc2, SWc3) nebol takmer žiadny. Spôsobené to je najmä tým, že významne vertikálne a horizontálne mohutné pohoria v južnej časti Slovenska absentujú. Kvôli tomu sa z južných smerov dostávajú tieto typy situácií nezoslabené pohoriami aj ďalej na sever, ba dokonca častokrát zrážkovo zosilňujú výstupnými pohybmi v centrálnej časti Slovenska (vhodne položené pohoria vzhľadom k smeru prúdenia) a nie sú teda zoslabené ako pri severných

typoch, ktoré musia prekonávať vyššie položené horské bariéry už na hraniciach s Poľskom.

PodĎakovanie

PodĎakovanie in memoriam patrí nášmu kolegovi, ale aj dobrému kamarátovi RNDr. Jakubovi Mészárosovi, ktorý ako prvý nastavil hlavnú časť metodiky spracovania čiastkových úhrnov zrážok pre jednotlivé cyklonálne situácie. Za spoluprácu a vecné konzultácie pri prácach tohto typu ďakujem Mgr. Martinovi Halajovi. PodĎakovanie taktiež patrí Slovenskému hydrometeorologickému ústavu za poskytnutie dát denných a ročných úhrnov zrážok pre celú sieť staníc Slovenska.

Zoznam použitej literatúry

- [1] SHMÚ, Typy poveternostných situácií. [Citované: 7. marec 2023]
<http://www.shmu.sk/sk/?page=8>
- [2] Šercl P. (2008) Meteorologické zprávy 61(2), p. 33
- [3] Zaujec P. (2022) Zrážkové pomery Slovenska pri severných a južných cyklonálnych situáciách. (Diplomová práca) Univerzita Komenského v Bratislave
- [4] Halaj M. (2019) Vplyv reliéfu na rozloženie zrážok na Slovensku pri západných cyklonálnych situáciách. (Diplomová práca) Univerzita Komenského v Bratislave
- [5] Mészáros J. (2019) Priestorové zákonitosti rozmiestnenia atmosférických zrážok na Slovensku pri južných cyklonálnych situáciách za obdobie rokov 1991 – 2015. (Rigorózna práca) Univerzita Komenského v Bratislave

Rodová rovnosť v akademickom prostredí na Slovensku

Katarína Zváčová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra ekonomickej a sociálnej geografie, demografie a územného rozvoja, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; zvacova5@uniba.sk

Abstract

Gender equality in the academic environment in Slovakia

This essay explores the challenges and successes of women in academia in Slovakia. Despite recent initiatives and legislative attempts to promote gender equality in the country, women remain underrepresented in university faculties and research institutions. The essay examines the evolution of the representation of women in professorships, associate professorships and other senior positions in the academic environment and the factors influencing the unequal representation.

Keywords: *gender equality; women in academia; education; gender differences; Slovakia*

Úvod a formulácia cieľa

Ženy na Slovensku dosiahli v akademickom prostredí významný pokrok, ale stále je potrebné pracovať na dosiahnutí rodovej rovnosti. Podľa údajov Slovenskej akadémie vied [1] tvoria ženy približne 40 % všetkých výskumníkov v krajine. Hoci ide o zlepšenie oproti predchádzajúcim rokom, v porovnaní s inými európskymi krajinami je to stále nízky podiel.

V posledných desaťročiach sa rozšírili možnosti vedúceho postavenia žien na pracoviskách, avšak stále pretrvávajú obavy, že ženy sú stále výrazne nedostatočne zastúpené na najvyšších úrovniach [2], [3]. Hoci sa počet žien vo vedúcich pozíciách vo vysokoškolskom vzdelávaní zvyšuje, deje sa to pomalým tempom [4]. S tým, že ženy majú zastúpenie väčšinu vysokoškolských študentov za posledných 35 rokov [5], je na mieste pýtať sa, prečo ich zastúpenie klesá na každom stupni akademického riadiaceho rebríčka.

Hlavným cieľom práce je z dostupných zdrojov analyzovať vývoj zastúpenia žien na vyšších akademických pozíciách. Porovnanie zastúpenia žien v akademickom prostredí s ich mužskými kolegami a pozíciami, ktoré zastávajú.

Materiál a metódy

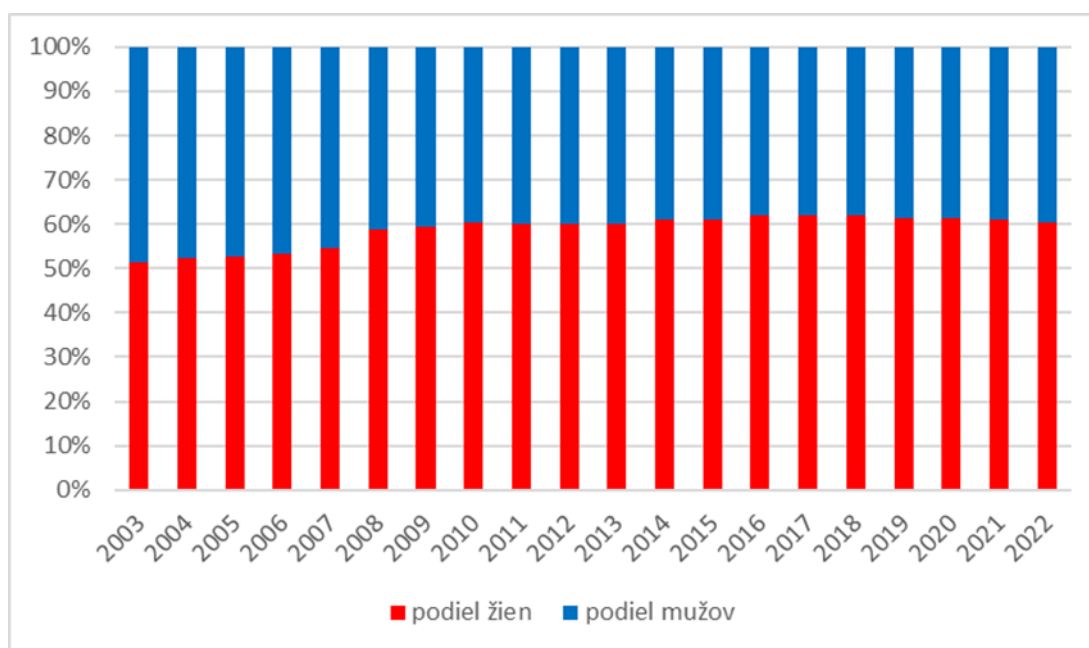
Analýza je vypracovaná z dostupných zdrojov dát uverejnených na stránke Centra vedecko-technických informácií (CVTI). Dáta, z ktorých je vypracovaná táto analýza sú zozbierané za obdobie od roku 1989 až po rok 2021. Tieto dáta sme následne pomocou deskriptívnej štatistiky vyhodnotili a vložili ich do grafov. Dáta zahŕňajú porovnanie podielu

mužov a žien s titulom profesor, s titulom docent a rovnako aj podiel absolventov 1. a 2. stupňa vysokej školy a absolventov doktorandského štúdia.

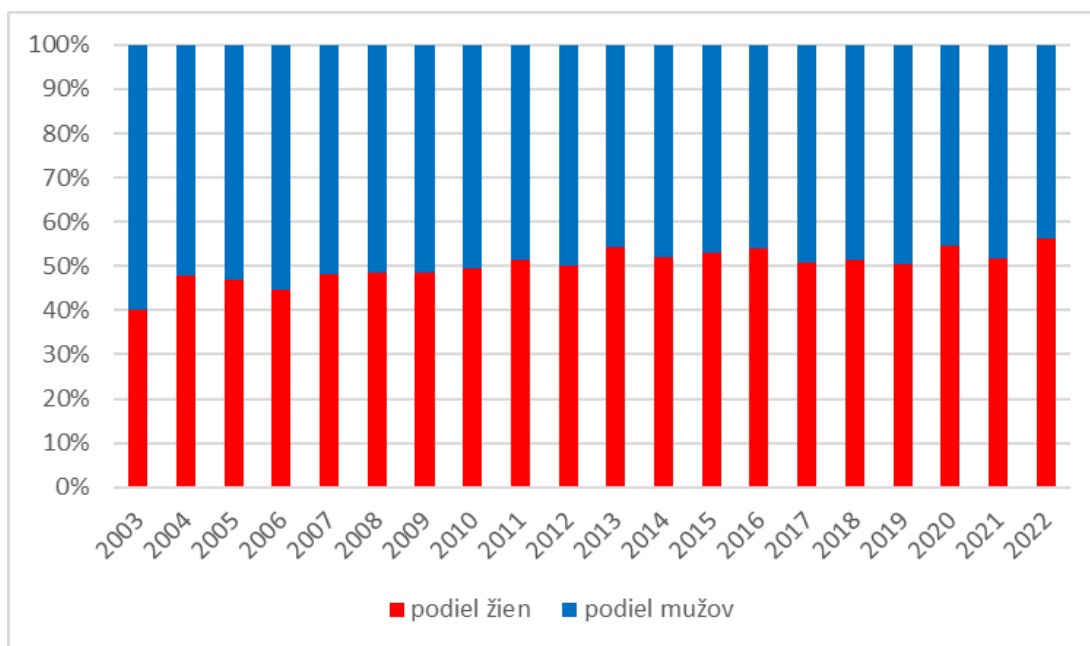
Výsledky a diskusia

Účasť žien na vysokoškolskom a postgraduálnom vzdelávaní sa za posledných tridsaťpäť rokov prudko a stabilne zvýšila. V roku 1989 tvorili ženy 47 % absolventov bakalárskeho a magisterského štúdia, ale 0 % absolventov doktorandského štúdia. V rokoch 1989 – 1994 podľa dostupných dát z portálu CVTI na Slovensku neboli žiadni absolventi doktorandského štúdia s výnimkou roku 1991, kedy podiel žien z absolventov doktorandského štúdia bol 8 %. V dátach sa absolventi doktorandského štúdia permanentne objavujú až od roku 1995, kedy podiel žien predstavoval 29 %.

V akademickom roku 2003 tvorili ženy nadpolovičnú väčšinu, a to takmer 49 % medzi absolventmi bakalárskych a magisterských stupňov vzdelania; v prípade odborných a doktorandských titulov tvorili 40 % absolventov.



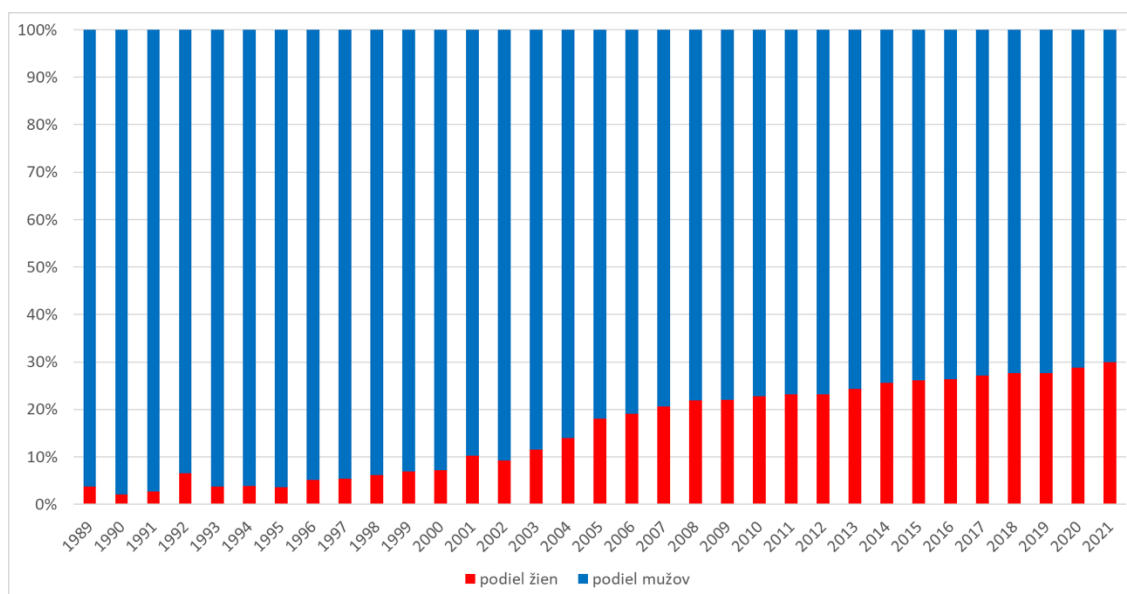
Obr. 1. Podiel absolventov a absolventiek 1. a 2. stupňa vysokej školy na Slovensku (2003 – 2022)



Obr. 2. Podiel absolventov a absolventiek 3. stupňa vysokej školy na Slovensku (2003 – 2022)

Hoci zjavný pokrok žien v oblasti dosiahnutého vzdelania je povzbudivý, menej povzbudivý obraz sa javí, ak skúmame mieru zamestnanosti mužov a žien na profesorskom poste.

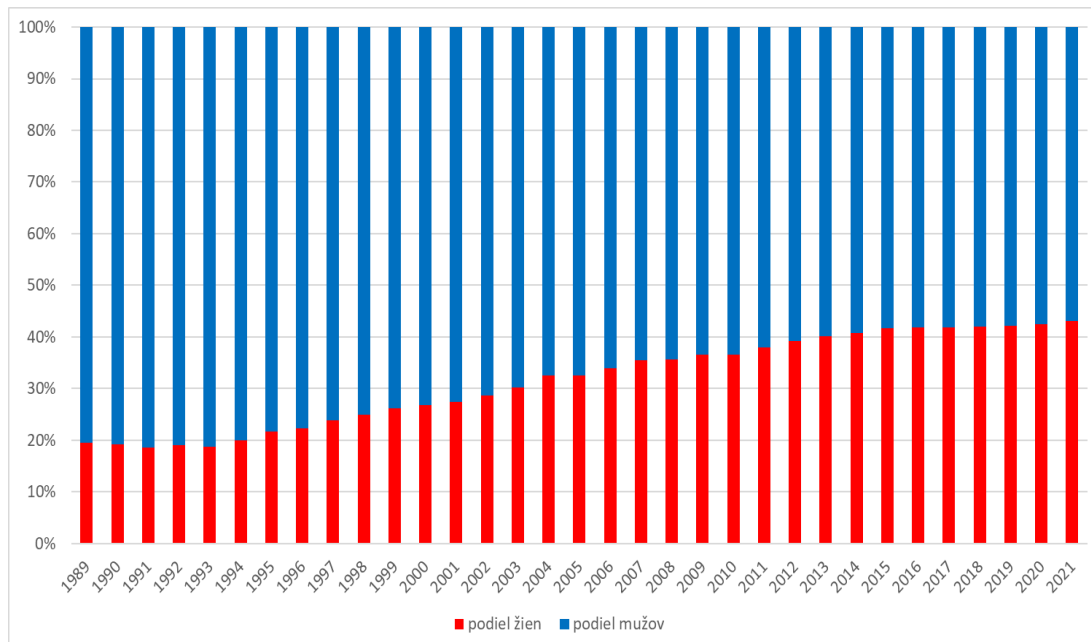
Napríklad v roku 2021, ktorý je posledným rokom dostupných údajov, tvorili ženy len necelých 30 % profesorov v Slovenskej republike. Oproti roku 1989, v ktorom ženy tvorili iba 3% profesorov je to pokrok dopredu, no stále máme ďaleko k rovnosti na tejto pozícii.



Obr. 3. Podiel profesorov a profesoriek na vysokých školách na Slovensku (1989 – 2021)

Vzdelanostná úroveň vysokých škôl a podiel akademických pracovníčok podľa platových tried na Slovensku od konca 90. rokov neustále zvyšoval. Podľa štatistík zverejnených Inštitútom informácií a prognóz školstva (CVTI), v roku 1989 len 0,82 % žien z celkového počtu žien zamestnaných na vysokých školách malo akademickú hodnosť profesor v porovnaní s 10,24 % mužov. V roku 2009 sa podiel žien s akademickou hodnosťou profesor zo všetkých zamestnancov zvýšil na 7,42 % a u mužov tento podiel stúpol na 20,35%. Pri porovnaní iba profesorských postov môžeme vidieť jasnú prevahu mužov nad ženami počas celého sledovaného obdobia, pričom v roku 1989 bolo zastúpenie žien iba 3% zo všetkých profesorov.

Akademická hodnosť docenta v roku 1989 predstavovala 17,49% žien z celkového počtu žien zamestnaných na vysokých školách a 35,67% z celkového počtu mužov zamestnaných na vysokých školách. V roku 2009 sa percentuálny podiel žien s akademickým titulom docent z celkového počtu zamestnaných nezmenil - 17,51 %, avšak podiel mužov s rovnakým titulom z celkového počtu mužov zamestnaných na vysokých školách klesol na 23,56%. Pri pohľade na podiel mužov a žien na poste docenta počas sledovaného obdobia môžeme vidieť, tak ako aj pri profesorskom poste, plynulý nárast podielu žien.



Obr. 4. Podiel docentov a docentiek na vysokých školách na Slovensku (1989 – 2021)

Záver

Z dostupných dát za obdobie 1989 až 2022 môžeme vidieť, že pomer mužov a žien, ktorí absolvovali 1. a 2. stupeň vysoko školského vzdelania je v prospech žien. Tie dosahujú zastúpenie 47% v roku 1989 a ich podiel stúpa po 60%. Túto hodnotu si udržiavajú od roku 2011 až po súčasnosť. Mierny pokles nachádzame pri absolventoch 3. vysoko školského stupňa. Zastúpenie absolventov doktorandského štúdia sa však v roku 2022 stále prikláňa v prospech žien, s podielom 56%.

Úplne opačná situácia však nastáva pri pohľade na zastúpenie mužov a žien s titulmi docent a profesor, kde môžeme pozorovať jasnú prevahu v zastúpení mužov. Za obdobie 1989 až 2021 však môžeme vidieť plynulý nárast v zastúpení žien s týmito vyššími titulmi. Na začiatku sledovaného obdobia bol podiel profesoriek iba 3%, no na konci v roku 2021 sa táto hodnota vyšvihla až na 30%.

Z dostupných dát môžeme predpokladať, že zastúpenie žien v akademickom prostredí by sa mohlo aj naďalej zvyšovať, hlavne na pozíciách profesorov a docentov.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Bianchi G., Žilinská M., Holubová B. (2021) Plán rodovej rovnosti Slovenskej akadémie vied verzia 1.0. 2021 – 2024; SAV
- [2] Madsen, S. R. (2012) Women and leadership in higher education: Learning and advancement in leadership programs. *Advances in developing Human resources*, 14(1), p. 3
- [3] Eddy, P. L., Ward, K. (2015) Lean in or opt out: Career pathways of academic women. *Change: The Magazine of Higher Learning*, 47(2), p. 6
- [4] Gallant, A. (2014) Symbolic interactions and the development of women leaders in higher education. *Gender, Work & Organization*, 21(3), p. 203
- [5] Ward, K., Eddy, P. L. (2013) Women and academic leadership: Leaning out. *The Chronicle of Higher Education*, 60(15), p. 1

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA**



**eŠVK
PRIF UK
2023**

DIDAKTIKA

**ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2023
ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV**

Vplyv respirátorov na rozpoznávanie emócií žiakov základných škôl a gymnázií

Lujza Grambličková¹, Monika Jerigová²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra didaktiky prírodných vied, psychológie a pedagogiky, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; gramblichkova1@uniba.sk

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyzikálnej a teoretickej chémie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

The effect of respirators on the recognition of emotions of elementary school students

COVID-19 is an infectious disease caused by the virus SARS-CoV-2. The spread can be prevented by disinfection, physical distance, vaccination and wearing face masks. Respirators are effective in protecting against infection with the coronavirus, but they cause a problem in recognizing emotions not only by adults, but especially by students, who depend on effective non-verbal communication. The facial expression gives us the first information about the person, which can be significantly weakened due to wearing face masks. The study involved 66 respondents aged from 10 to 15 years old from various elementary schools in Slovakia.

Keywords: coronavirus; face masks; students; nonverbal communication; mimic

Úvod a formulácia cieľa

V rokoch 2020 až 2022 postihla celý svet pandémie respiračného ochorenia COVID-19. Ide o infekčné ochorenie spôsobené vírusom tzv. SARS-CoV-2. Počas pandémie došlo ku rôznym zmenám v každodennom živote. Veľké zmeny nastali najmä v školskom prostredí, ktoré sa so situáciou muselo vyrovnávať zavedením dištančného vyučovania. Keď sa situácia zlepšila, žiaci mohli nastúpiť opäť do školy, ale museli dodržiavať prísne pokyny. Jedným z nich bolo nosenie respirátora, ktorý zabraňuje šíreniu vírusu.

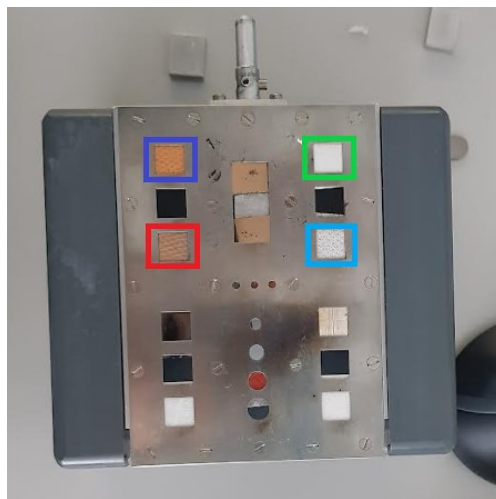
Respirátory sú účinné voči ochrane proti nakazeniu sa koronavírusom, avšak spôsobujú problém pri rozpoznávaní emócií nielen u dospelých, ale hlavne u žiakov závislých na efektívnej neverbálnej komunikácii. Výraz tváre nám ponúka prvú informáciu o danom človeku, ktorá môže byť kvôli noseniu respirátorov výrazne oslabená. Naším prvým cieľom bolo zistiť, či sú respirátory účinné voči koronavírusu. Následne sme zisťovali ako ovplyvňujú neverbálnu komunikáciu, teda či žiaci z výrazu tváre osoby na fotografii vedia rozpoznať konkrétne emócie, ktoré sú vyjadrené najmä mimikou. Výskumnou vzorkou boli žiaci základných škôl (5. – 9. ročník) a osemročných gymnázií (triedy príma až kvarta). V prípade negatívneho pôsobenia respirátora na neverbálnu komunikáciu navrhnúť a spýtať sa žiakov ako sa s touto situáciou vyrovnali. Takisto je našim cieľom overiť nakoľko sú žiaci informovaní

o ochorení COVID-19.

Materiál a metódy

V našom výskume sme sa zamerali najprv na účinnosť respirátorov voči koronavírusu. Využili sme pritom významnú techniku, hmotnostnú spektrometriu sekundárnych iónov, ktorá je založená na princípe „bombardovania“ povrchu vzorky primárnymi iónmi. Našimi vzorkami boli dva respirátory s označením FFP2, ktoré sa od seba líšili pridaným kovom. Jeden neobsahoval žiaden pridaný kov a druhý bol naimpregnovaný oxidom meďnatým. Pridané kovy v tkanivách tvárových maskách, ako napr. striebro, meď, zinok, volfrám alebo horčík sa využívajú ako tzv. antimikrobiálne látky, teda látky, ktorých funkcia spočíva v zabíjaní mikroorganizmov alebo v zastavení ich rastu [1].

Z oboch respirátorov sme z každej vrstvy odobrali malú vzorku s rozmerom približne $1 \times 1 \text{ cm}^2$ (Obr. 1.). Analýza prebiehala v ToF-SIMS pri týchto podmienkach: prúd primárnych iónov Bi^+ dosahoval 1 pA a energiu 250 keV, plocha skúmanej vzorky bola $100 \times 100 \text{ } \mu\text{m}^2$, extrakčná vzdialenosť bola nakalibrovaná na 1,5mm. Vzorky sme merali v pozitívnej aj v negatívnej polarite. Získali sme spektrá, ktoré sme následne porovnávali (Obr. 2.).



Obr. 1. Držiak so stojanom a vzorkami vonkajších a vnútorných strán respirátorov

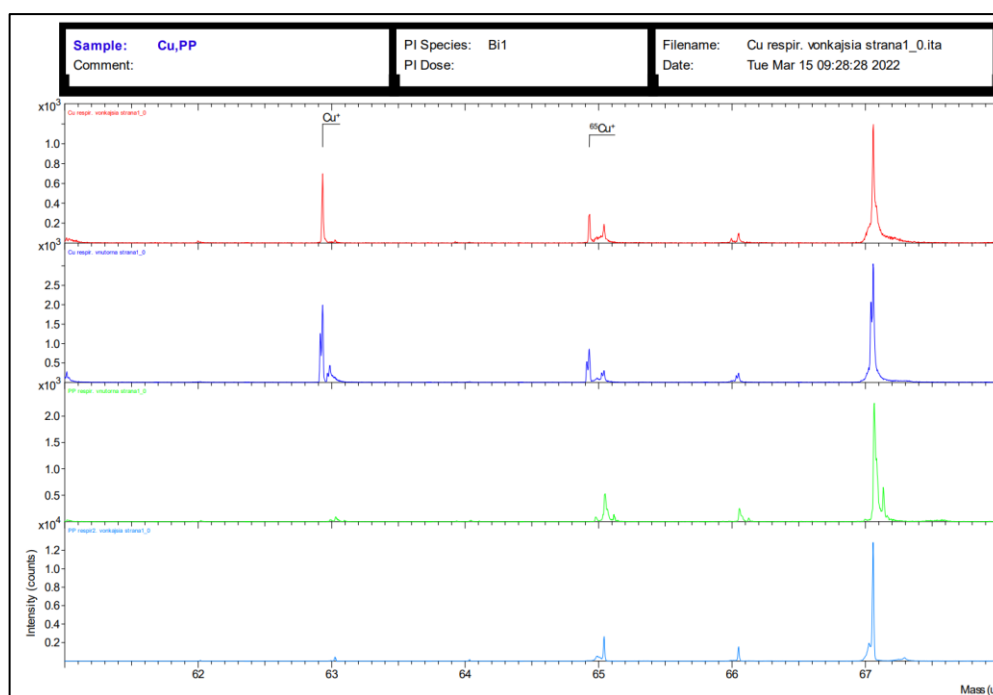
Druhý výskum, zameraný na vplyv respirátorov na neverbálnu komunikáciu žiakov, sme uskutočnili pomocou kvantitatívneho výskumného nástroja, online – dotazníka.

Do štúdie sa zapojilo celkom 66 respondentov vo veku od 11 do 15 rokov z rôznych základných škôl a osemročných gymnázií na Slovensku ($N_{5.\text{ ročník}}=4$; $N_{6.\text{ročník+príma}}=27$, $N_{7.\text{ročník+sekunda}}=17$, $N_{8.\text{ročník+tercia}}=7$, $N_{9.\text{ročník+kvarta}}=11$). Výskum bol uskutočnený pomocou

online-dotazníka, v ktorom mali žiaci určiť emočné stavy ľudí na fotografiách. Výber emócií ľudí (hnev, smiech, strach a smútok) bol zámerný, keďže ide o univerzálne výrazy tváre. Jednotlivé skupiny fotografií sme označili ako model A (fotografia osoby bez tvárovej masky) a model B (fotografia osoby s tvárovou maskou). V dotazníku sa nachádzajú aj položky, ktorých funkcia je overiť či žiaci dokážu vlastnými slovami opísať ochorenie COVID-19 a či sú o danom ochorení dostatočne informovaní.

Výsledky a diskusia

Po analýze vonkajších a vnútorných vrstiev dvoch zložených odlišných respirátorov sme pomocou hmotnostnej spektrometrie sekundárnych iónov identifikovali a názorne vyznačili v spektre píky medi (Obr. 2.). Môžeme zhodnotiť, že respirátory s obsahom iónov medi sú oproti respirátorom bez pridaného kovu účinnejšie voči koronavírusu, pretože sú schopné vírus nielen zachytiť, ale aj zničiť [2].

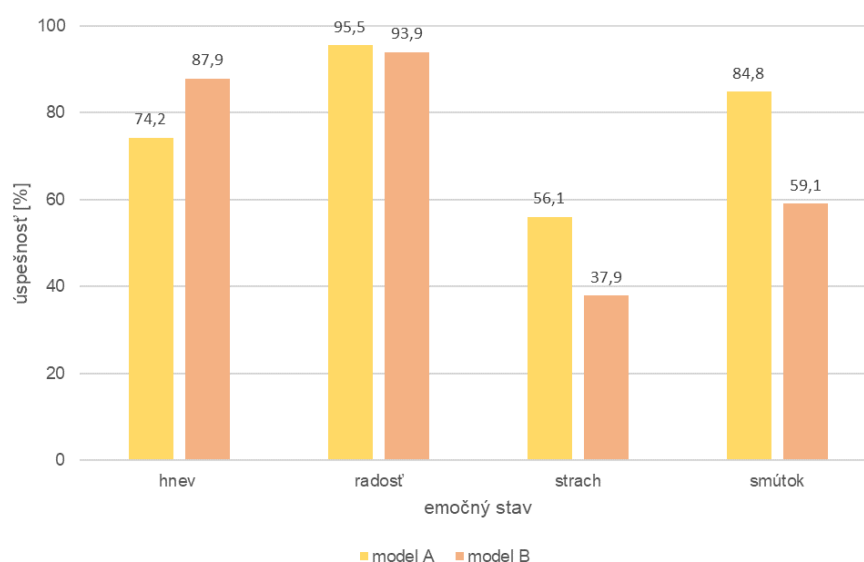


Obr. 2. Spektrum respirátorov z vnútornej a vonkajšej strany

Označenie spektier (zhora-nadol) – Vzorka respirátora s medťou z vonkajšej strany, vzorka respirátora s medťou z vnútornej strany, vzorka respirátora bez medi z vnútornej strany, vzorka respirátora bez medi z vonkajšej strany

Výsledky z didaktického výskumu pomocou dotazníka ukazujú, že žiaci základných škôl a gymnázií vedia určiť emócie ľudí z výrazu tváre, priemerná úspešnosť modelu A dosiahla 78%. V prípade modelu B došlo k poklesu priemernej úspešnosti na 69%.

Štúdie označili emocionálne stavy šťastie, smútok a hnev za emócie, ktoré sú vyjadrené najmä spodnou časťou tváre [3]. Hoci respirátor zakrýva práve spodnú časť tváre, žiaci určovali emócie šťastie a hnev pomerne správne. Pokles nachádzame najmä v modeli B pri emóciách strach a smútok, kde boli zistené úspešnosti 37,9% (strach) a 59,1% (smútok), ako je zobrazené na obrázku 3.



Obr. 3. Graf znázorňujúci priemernú úspešnosť žiakov pri rozpoznávaní emócií v modeli A a B

Menej ako polovica z respondentov dokázala vlastnými slovami opísať, čo je to ochorenie COVID-19. Výsledky nášho výskumu preukázali, že vzorka žiakov ZŠ a gymnázií vo veku od 10 do 15 rokov nie je dostatočne informovaná o spomínanom ochorení. Na otázku, či by vedeli vlastnými slovami písať ochorenie COVID-19 vyberalo z opýtaných respondentov 22 žiakov možnosť „nie som si istý/á“, taktiež niektorí uviedli iba jednoslovnú odpoveď „vírus“, „pandémia“ či „netopiere.“ Správne zodpovedalo otázku iba 31 žiakov.

Záver

Získané výsledky z dotazníku potvrdili, že žiaci vedia určiť emócie ľudí z výrazu tváre, keď osoby nemajú nasadené respirátory (priem. úspešnosť modelu A 78%). Po preštudovaní mechanizmu pôsobenia pridaného kovu voči baktériám a vírusom, môžeme konštatovať, že respirátory majú význam pri zastavení šírenia COVID-19. Nevýhodou však je, že nepriaznivo pôsobia na mimiku, čo vysvetľuje pokles úspešnosti v modeli B na 69%. Keďže v prípade pandémie však boli respirátory nevyhnutnou podmienkou, žiaci sa museli s touto situáciou „popasovať“. Po následných rozhovoroch so žiakmi sme zistili, že ak sú v kontakte s osobou

so zakrytými dýchacími hornými aj dolnými cestami, vedia emócie zistiť hlavne pomocou verbálnej komunikácie, teda neboja sa povedať, napr. „*dnes nemám dobrú náladu, som smutný alebo hnevám sa*“. Ďalším riešením bolo, že žiaci využívali a všímali si aj iné formy neverbálnej komunikácie napríklad gestikuláciu, posturiku alebo sa zamerali na pohľad očí.

Zistili sme, že vzorka opýtaných žiakov ZŠ a osemročných gymnázií na Slovensku vo veku od 10 do 15 rokov nie je dostatočne informovaná o ochorení COVID-19. Možným riešením by bolo organizácia workshopu alebo prednášky pre žiakov napr. počas hodiny chémie alebo biológie. Prednášajúcimi by okrem učiteľov mohli byť osoby priamo z praxe napr. doktori, virológovia, záchranári a pod. Ďalším nápadom sú workshopy, či prednášky, ktoré by mohli byť vedené žiakmi zo starších tried, prostredníctvom tzv. rovesníckeho vyučovania, čo sa ukázalo ako vhodný prostriedok na zvýšenie motivácie a pozornosti žiakov k získavaniu nových informácií [4].

PodĎakovanie

Chcela by som poďakovať doc. Monike Jerigovej za ochotný prístup a odbornú pomoc najmä pri práci s Hmotnostnou spektrometriou sekundárnych iónov. Takisto poďakovanie patrí všetkým žiakom, ktorí vyplnili dotazník.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Govind V., Bharadwaj S., Sai Ganesh M., et al. (2021) Biometals. 34(6), p.1217
- [2] Grass G, Rensing C, Solioz M. (2011) Appl. Environ. Microbiol. 77(5), p. 1541
- [3] Fischer A. H., Gillebaart M., Rotteveel M., et al. (2012) Soc. Psychol. Pers. Sci. 3, p. 266
- [4] Gajdošová M. (2013) Nauč sa to odomňa. Iuventa, Bratislava, SR, p. 9

Z akých zdrojov čerpá denne informácie „Generácia Z“ ?

Kristína Huszárová, Štefan Karolčík

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra didaktiky prírodných vied, psychológie a pedagogiky, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; huszarova8@uniba.sk

Abstract

What are the sources that “Generation Z” gets information from?

Aim of the research is to find out if digital competence among the generation Z is evolving enough so they are able to use different digital gadgets, find diverse types of information among websites and last but not least decide if the information is valid, truthful and trustworthy. The results show that most of the participants are able to use various digital devices. According to our research, the websites generation Z visits daily primarily through social media are Startitup and Refresher. However, up to 27,3 % of the participants don't show interest in the type of website they collect information from. They don't care about the origin or credibility of the data, therefore it is necessary to focus on this aspect of the digital competence in the future. To sum up, we can say that although there is some space for improvement in some areas, the digital competence among generation Z is on adequate level.

Keywords: *generation Z; digital technologies; devices; digital competence; websites*

Úvod a formulácia cieľa

Internet predstavuje v súčasnosti neodmysliteľnú súčasť bežného života takmer každého človeka, predovšetkým každodenného života žiakov a študentov [1, 2]. Žiaci sú denne vystavovaní obrovskému množstvu informácií, ktoré sú im dostupné v rôznych podobách, ktoré sa nemusia nutne zhodovať. Vedomosti, zručnosti a postoje žiakov súvisiace s používaním digitálnych technológií a vzájomnou komunikáciou s ich využitím v sebe zahŕňa jedna z ôsmich kľúčových kompetencií zadefinovaných v Úradnom vestníku EÚ – digitálna kompetencia. V rámci nej by žiaci mali byť schopní informácie získavať, hodnotiť, uchovávať, tvoriť, prezentovať a v neposlednom rade si ich vzájomne vymieňať [3]. V našom výskume sme sa sústredili práve na schopnosť žiakov hodnotiť dostupné informácie. Žiaci by mali byť schopní kriticky hodnotiť zdroje, z ktorých informácie denno-denne prijímajú a na základe tohto hodnotenia prispôbiť ich výber.

Cieľom nášho výskumu preto bolo zistiť, z akých webových stránok respondenti najčastejšie zisťujú informácie o okolitom dianí. Zaujímalo nás taktiež, prečo si respondenti volia práve tieto webové portály. V neposlednom rade sme zisťovali či existujú webové stránky, ktoré respondenti hodnotia ako nevhodné a informáciám z nich sa vedome vyhýbajú.

Materiál a metódy

Ako výskumný nástroj sme zvolili rozhovor. Išlo o semištrukturalizované rozhovory. Mali sme vopred pripravenú kostru otázok, ktoré sme respondentom plánovali položiť a v prípade potreby sme boli pripravení pýtať sa doplňujúce otázky. Otázky súviseli s aktivitami respondentov v rámci online priestoru a boli formulované tak, aby nám poskytli odpoveď na výskumnú otázku: Aké webové stránky sú predmetom záujmu vybraných respondentov?

Otázky, na ktoré respondenti odpovedali boli nasledovné:

1. Aké digitálne zariadenie najčastejšie používate, keď sa chcete informovať o aktuálnom dianí na Slovensku a vo svete?
2. Z akých konkrétnych webových stránok tieto informácie získavate?
3. Čo ovplyvnilo váš výber práve týchto webových stránok? V čom vám vyhovujú?
4. Existujú webové stránky, ktorým sa účelovo vyhýbate pri vyhľadávaní konkrétnych informácií? Ak áno, prečo?

Rozhovory prebiehali individuálne, osobne, len v prítomnosti respondenta a pracovníka vedúceho rozhovor. Odpovede respondentov boli zaznamenávané diktafónom, následne bol zvukový záznam prepísaný a v ďalšom kroku vyhodnocovaný. Na základe charakteru výskumného nástroja sme zvolili kvalitatívne vyhodnotenie a teda sme vyhodnocovali každý rozhovor osobitne pomocou metódy obsahovej analýzy, ktorá sa pre tento typ rozhovorov často používa a jedna z odporúčaných [4].

Charakteristika výskumného súboru:

Výskumný súbor tvorilo 44 účastníkov – 21 žien (47,7 %) a 23 mužov (52,3 %) vo veku od 15 do 28 rokov. Vek respondentov sme cielene obmedzili tak, aby najstarší respondenti nemali viac ako 28 rokov. Je to z toho dôvodu, aby respondenti v našom výskume spadali pod označenie „generácia Z“. Táto generácia sa označuje aj ako „Facebook generation“, „App generation“, „Selfie generation“, „Internet generation“ a tvoria ju ľudia narodení po roku 1995 [5]. Najvyššie dosiahnuté vzdelanie respondentov bolo rôzne: nižšie sekundárne – ISCED 2 (29,5 %), vyššie sekundárne – ISCED 3 (43,2 %), stredné odborné – ISCED 3C (6,8 %), vysokoškolské I. stupňa (9,1 %) a vysokoškolské II. stupňa (11,4 %) – ISCED 5A. Respondenti sa taktiež líšili miestom bydliska: Bratislavský kraj (4,5 %), Trnavský kraj (13,6 %), Nitriansky kraj (6,8 %), Žilinský kraj (25 %), Banskobystrický kraj (9,1 %), Košický kraj (11,4 %) a Prešovský kraj (29,6 %). Internetovým pripojením domácnosti disponovalo 97,7 % respondentov.

Výsledky a diskusia

V rámci prvej otázky sme zisťovali, aké digitálne zariadenie respondenti najčastejšie používajú, keď získavajú informácie. Najčastejšou odpoveďou respondentov bol mobilný telefón (90,9 %) či už používaný samostatne alebo v kombinácii s iným digitálnym zariadením. Ako druhé najčastejšie používané digitálne zariadenie respondenti uvádzali notebook (31,8 %), nasledoval stolný počítač (15,9 %), tablet a televízia (9,0 %) a jeden respondent uviedol taktiež rádio (2,3 %). Ako preukazujú výsledky, v súčasnosti už žiakom, ale ani starším študentom nerobí problém dostupnosť zariadení, ktoré využívajú pre prácu s internetom.

V rámci druhej otázky nás zaujímalo, z akých konkrétnych webových stránok respondenti najčastejšie čerpajú informácie o aktuálnom dianí. Prehľad webových stránok, ktoré respondenti uviedli najčastejšie môžeme vidieť v Tab. 1.

Tab. 1. Prehľad respondentami najčastejšie navštevovaných stránok

<i>Stránka</i>	<i>Počet respondentov, ktorý stránku uviedli</i>
Startitup	15 (34,1 %)
Refresher	14 (31,8 %)
Denník N	9 (20,5 %)
Aktuality	8 (18,2 %)
Denník SME	6 (13,6 %)
Interez	6 (13,6 %)

Menej často respondenti uvádzali stránky ako Wikipédia, stránky televíznych staníc (JOJ, Markíza, RTVS, BBC, TA3), stránky novín a denníkov ako napr. Hospodárske noviny, Nový čas, Topky. Jeden respondent uviedol stránku Tlačovej agentúry Slovenskej republiky (TASR). Dvaja respondenti uviedli oficiálne stránky ministerstiev Slovenskej republiky. 27,3 % respondentov využíva na zisťovanie informácií profily uvedených stránok na sociálnych sieťach. Predovšetkým ide o sociálne siete Facebook a Instagram. V roku 2020 bol realizovaný výskum zaoberajúci sa významom internetu a sociálnych sietí v živote žiakov základných a stredných škôl, ktorého výsledkom bolo zistenie, že takmer polovica žiakov (44 %) ZŠ a SŠ denne číta správy. Množstvo žiakov pre tieto účely taktiež používa sociálne siete. Najčastejšie ide o Instagram a Facebook. Tieto zistenia sa potvrdili aj v našom výskume. Spomedzi používaných sociálnych sietí jednoznačne dominujú Instagram a Facebook [6].

V rámci tretej otázky sme pátrali po dôvodoch, prečo respondenti preferujú uvedené webové stránky. Dôvody respondenti uvádzali rôznorodé (Tab. 2.). Najčastejšie sa opakovali

odpovede ako ľahká dostupnosť cez sociálne siete, tým pádom aj rýchly prístup k najnovším informáciám. Často sa opakovala aj dôveryhodnosť zdrojov, pravdivosť informácií, ktoré stránky ponúkajú. Aspekt, ktorý respondenti brali do úvahy je taktiež skutočnosť, že za informácie, ktoré stránka poskytuje sa nemusí platiť. Prehľadnosť, ľahká orientácia a pútavá grafika sú hľadiská, ktoré u respondentov taktiež pri výbere zavážili.

Tab. 2. Prehľad respondentami najčastejšie uvádzaných dôvodov výberu webového portálu

<i>Odôvodnenie</i>	<i>Počet respondentov, ktorý dôvod uviedli</i>
Ľahká dostupnosť cez sociálne siete.	15 (34,1 %)
Dôveryhodnosť zdrojov.	12 (27,3 %)
Grafické hľadisko (prehľadnosť, ľahká orientácia, pútavá grafika).	12 (27,3 %)
Pravdivosť informácií.	5 (11,4 %)
Bezplatný prístup k informáciám.	3 (6,8 %)

Respondenti sa vyjadrovali aj k otázke toho či bol ich výber stránok ovplyvnený inými osobami. U väčšiny respondentov ich výber nebol ovplyvnený inými jednotlivcami. U štvrtiny respondentov mali na výber stránok vplyv kamaráti, rodina, spoločnosť a spolužiaci.

Štvrtá otázka bola venovaná stránkam, ktorým sa respondenti vedome vyhýbajú. Okrem konkrétnych stránok sme zisťovali aj dôvody, prečo respondenti uvádzajú práve vybrané webové stránky. 12 (27,3 %) respondentov uviedlo, že sa vedome nevyhýba žiadnym webovým stránkam a informácie nijakým spôsobom neselektuje. Cielene sa bulvárnym webovým portálom vyhýba 12 (27,3 %) respondentov. Stránky, ktoré respondenti ďalej uvádzali ako tie, ktorým obsahu vedome nevenujú pozornosť sú Wikipédia, Refresher, Startitup, Nový čas, Plus 7 Dní, Denník N, stránky s politickým a kresťanským obsahom a taktiež sa v tejto kategórii objavili aj sociálne siete. Zaujímavým zistením je, že stránky, ktoré respondenti uvádzajú ako najnavštevovanejšie sú zároveň stránkami, ktoré iní respondenti uvádzajú ako tie, ktorým sa vedome vyhýbajú. V tomto prípade, však nevieme bližšie špecifikovať zdôvodnenie, nakoľko sme nenašli súvislosti s vekom, najvyšším dosiahnutým vzdelaním respondentov ani miestom bydliska a početnosťou uvádzania konkrétnych webových portálov.

Sociálnym sieťam sa vyhýbajú respondenti nášho výskumu, ktorí boli starší ako 20 rokov. Naopak, respondenti mladší ako 20 rokov uvádzali sociálne siete a informácie z nich ako ich prvú voľbu pri výbere zdrojov pre novinky a posledné udalosti.

Ako dôvody, prečo respondenti obsah uvedených stránok odmietajú konzumovať sa

najčastejšie opakovali nedôveryhodnosť, ktorú uviedlo 5 respondentov, 7 respondentov uvádza šírenie dezinformácií, spoplatnený obsah je problémom pre 2 respondentov, zavádzajúce názvy článkov uviedli 2 respondenti, nespoľahlivý zdroj informácií a taktiež neoverené a nepravdivé informácie spomenulo 6 respondentov, neobjektívnosť redaktorov a jednostrannosť uverejňovaných informácií udávajú ako závažný dôvod 4 respondenti.

Záver

V rámci nášho výskumu sme riešili problematiku využívania digitálnych technológií mládežou označovanou ako „generácia Z“. Zaujímali nás ich aktivity súvisiace s vyhľadávaním informácií na webových stránkach. Zber dát sme uskutočnili metódou semištruktúrovaných rozhovorov.

Zistili sme, že respondenti nemali žiadne problémy súvisiace s dostupnosťou zariadení. Väčšina z nich využíva denne kombináciu viacerých digitálnych zariadení, najčastejšie mobilný telefón a notebook. Stránky, ktoré podľa nášho výskumu „generácia Z“ najčastejšie navštevuje a informácie z nich považuje za dôveryhodné sú Startitup a Refresher, pričom sú tieto stránky dostupné respondentom predovšetkým cez sociálne siete Instagram a Facebook. Uvedené stránky respondentom vyhovujú predovšetkým pre ich ľahkú a rýchlu dostupnosť cez už spomenuté sociálne siete. Pre respondentov bola taktiež dôležitým faktorom pri výbere ich pútavá grafika a fakt, že väčšina informácií, ktoré poskytujú nie je spoplatnených. Serióznosť, pravdivosť informácií a dôveryhodnosť spomínali v oveľa menšej miere a nemajú pre oslovených mladých ľudí z „generácie Z“ kľúčový význam. Podľa našich zistení až 27,3 % respondentov kriticky nehodnotí stránky, z ktorých informácie čerpá a vedome sa nezamýšľa nad skutočnosťou či informácie, ktoré prijíma sú overené, pravdivé a dôveryhodné.

Početnosť výskumného súboru nám nedovoľuje robiť významnejšie závery a zovšeobecnenia. Zistené údaje však preukázali, že v rámci schopnosti hodnotiť informácie na internete, ktorá patrí pod digitálnu kompetenciu, majú mladí ľudia určité nedostatky. Môžeme však konštatovať, že respondenti sú schopní vedome informácie získavať a časť z nich je schopná ich kriticky zhodnotiť. Aktívna práca s viacerými digitálnymi zariadeniami je u väčšiny respondentov samozrejmosťou. Sme názoru, že aj napriek snahe a aktívnemu rozvíjaniu digitálnej kompetencie vyučujúcimi, sú v rámci tejto oblasti u žiakov a študentov pozorované nedostatky. Mladí ľudia „generácie Z“ sú denne zahltení množstvom informácií, ktorých kritické hodnotenie im robí značné problémy.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Suchý A. (2007) Mediální zlo-mýty a realita: souvislost mezi sledováním televize a agresivitou u dětí. Triton, Praha, ČR, p. 168
- [2] Karasová M. (2014) Mediálna gramotnosť žiaka primárneho vzdelávania. Verbum, Ružomberok, SR, p. 173
- [3] Úradný vestník Európskej únie [Citované: 16. marec 2023] <[https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SK/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018H0604\(01\)&from=en](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SK/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018H0604(01)&from=en)>
- [4] Prokša M., Held L., Haláková Z., et al. (2008) Metodológia pedagogického výskumu. Univerzita Komenského, Bratislava, SR, p. 49
- [5] Dolot A. (2018) E-mentor. 74(2), p. 44
- [6] Janková M. (2020) Význam internetu a sociálnych sietí v živote žiakov základných a stredných škôl. Centrum vedecko-technických informácií SR, Bratislava, SR, p. 33

Teoretické znalosti a praktické skúsenosti žiakov gymnázia pri práci s mikroskopom na hodinách biológie ako predpoklad znovuzískania častí mikroskopu a ich funkcií

Gabriela Klimešová¹, Zuzana Haláková²

¹*Gymnázium Ladislava Novomeského v Senici, Dlhá 1037/12, 905 01 Senica, Slovenská republika; klimesova8@uniba.sk*

²*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra didaktiky prírodných vied, psychológie a pedagogiky, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika*

Abstract

Theoretical knowledge and practical experience of grammar school pupils working with a microscope in biology classes as a prerequisite for re-cognition of parts of the microscope and their functions

Teaching process is in connection with cognition and knowledge that are memorized, comprehended and further structured and profiled. The practical experience in laboratory help to develop not just manual skills in science teaching but in cognition and stepwise refinement. In this contribution there is tested and solved the pupils' previous experience with using a microscope in biology lesson, when it should be certainty for them.

Keywords: *skills; knowledge; microscope; microscopy; biology*

Úvod a formulácia cieľa

Učenie je proces, pri ktorom dochádza k zmene spôsobenej rozvojom novej zručnosti, pochopením vedeckého zákona, zmenou postoja a pod. Nejde len o náhodné zmeny v dôsledku osobnej skúsenosti v reálnom živote, ale aj o cieľavedomú činnosť, spojenú s vyučovacím procesom, počas ktorého sa poznatky zapamätávajú a osvojujú [1]. Jedinec ich nadobúda prostredníctvom počúvania, sledovania, čítania a v neposlednom rade aj prostredníctvom osvojovania si praktických zručností. Ako ukazujú niektoré práce [2 – 3], na Slovensku pozorujeme už dlhší čas klesajúce tendencie v záujme o prírodovedné predmety. Dôvodom je predovšetkým fakt, že vedomosti, ktoré si v priebehu vyučovacieho procesu žiaci osvojujú, sú založené predovšetkým na pasívnom prijímaní informácií od učiteľa a ich následnej reprodukcii bez bližšieho skúmania. Poznatky, ktoré sa takýmto spôsobom naučili, sú častokrát zabudnuté hneď po napísaní testu, alebo po ústnej skúške. Rovnako je tomu aj vtedy, ak ide o vykonávanie praktických cvičení bez hlbšieho zamýšľania sa nad dôvodom použitia konkrétnych bodov postupu, ktorý im vyučujúci poskytol. Praktické cvičenia sa zo strany učiteľov vnímajú predovšetkým ako prostriedok motivácie, prípadne na overenie platnosti teoretických zákonov, poučiek a definícií [4], v menšej miere ako prostriedok nadobúdania nových vedomostí. Avšak viacerí výskumníci [5 – 6] poukazujú na vplyv priamej skúsenosti

na dosahovanie lepších výsledkov v testoch vedomostí v porovnaní s „tradičnejším“ prístupom k vyučovaniu.

Zaujímalo nás, nakoľko sa teoretické poznatky a zručnosti žiakov gymnázia zachovali v pamäti žiakov po určitom čase. Za skúmanú oblasť sme si zvolili učivo *Mikroskopovanie, časti svetelného mikroskopu* preto, že ide o základný prístroj používaný na hodinách biológie pri pozorovaní malých objektov. Žiaci s ním pracujú takmer na každej hodine praktických cvičení. Prvýkrát sa so základnými časťami mikroskopu zoznamujú už na základnej škole v rámci 5. ročníka [7]. Následne svoje vedomosti prehľbujú na stredných školách. V súlade s inovovaným Štátnym vzdelávacím programom [8] má žiak gymnázia vedieť pripraviť mikroskopický preparát a používať správne postupy a techniky pri jeho pozorovaní pod mikroskopom. Avšak výkonové a obsahové štandardy iŠVP neuvádzajú, kedy má k sprístupneniu daného učiva dôjsť, jedine v prípade základných škôl. Na gymnázium je práca s mikroskopom súčasťou tematického celku *Laboratórne cvičenia v odbornej učebni*. Rovnako je možné využívať prácu s mikroskopom v ďalších tematických celkoch, ako napr. *Mikrosvet/laboratórne cvičenia z biológie bunky* a ďalšie. Pri prvom zoznámení sa s mikroskopom si zvyčajne žiaci na hodinách biológie zapamätávajú jeho časti, skúšajú, na čo slúžia a zväčša nemajú problém to zreprodukovat'. Až potom sa pristupuje k práci s mikroskopom, ktorá trvá dlhšie časové obdobie.

Cieľom nášho výskumného šetrenia bolo zistiť, nakoľko sa teoretické poznatky spojené s prácou s mikroskopom uchovávajú v dlhodobej pamäti v porovnaní so zručnosťami, ktoré žiaci nadobudli prostredníctvom praktických cvičení na hodinách biológie. Pri dosahovaní cieľov sme si položili nasledujúcu výskumnú otázku:

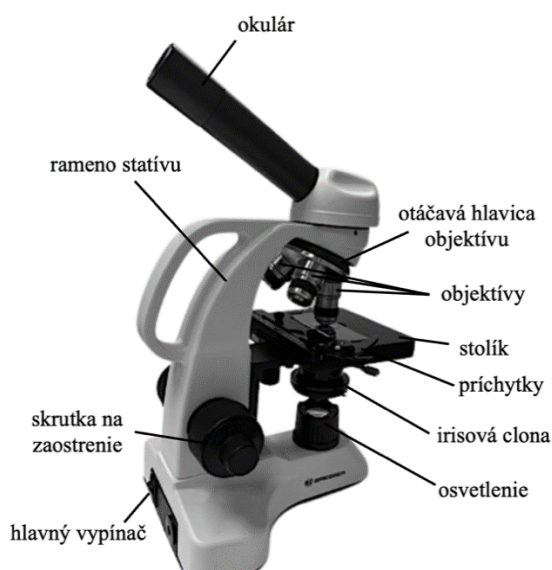
V akej miere žiaci znovuspoznajú časti mikroskopu a ich funkcie po oddialenej skúsenosti s prácou s mikroskopom?

Materiál a metódy

V snahe splnenia vytýčeného cieľa a odpovedania na nami stanovenú výskumnú otázku sme zrealizovali výskumné šetrenie kvalitatívneho charakteru na vybranom gymnázium. Zúčastnili sa ho siedmi študenti maturitného ročníka. Na začiatku druhého ročníka absolvovali hodinu na tému: *Časti mikroskopu*, v rámci ktorej sa zoznámili s časťami mikroskopu. Pracovali s učebnicou *Biológia pre gymnáziá – 1. časť* [9]. Pri učení sa jednotlivých častí vychádzali z Obrázku č.1, ktorý si prekresľovali za domácu úlohu do zošitov aj s popisom.

V nasledujúcich mesiacoch až do konca druhého ročníka absolvovali praktické cvičenia, na ktorých pracovali s mikroskopom, ďalší rok mikroskop na hodinách biológie

nepoužívali. Na začiatku štvrtého ročníka sme im rozdali obrázky svetelného mikroskopu (viď. Obr. 2).



Obr. 4. Časti svetelného mikroskopu
Domáca úloha žiakov na učenie sa častí mikroskopu



Obr. 5. Obrázok svetelného mikroskopu
Obrázok svetelného mikroskopu, ktorého časti žiaci pomenovávali

K obrázku dostali respondenti pokyn, aby pomenovali jednotlivé časti mikroskopu, ktoré sa na obrázku dajú identifikovať a súčasne, aby doplnili, na čo sa tieto časti používajú (t.j. aby uviedli funkcie týchto častí). Respondentov sme upozornili na možnosť uvedenia funkcie aj bez pomenovania časti mikroskopu. Na obrázku nebolo zámerne vyznačené, ktoré časti je potrebné pomenovať. Žiaci tak označili a pomenovali tie časti, ktoré považovali za dôležité. Vyznačovali ich priamo do obrázku. Časovo neboli obmedzovaní, práca netrvala nikomu viac ako 15 minút. Vypracované zadania zozbierali a metódou rozhovoru so žiakmi

zist'ovali príčiny neoznačenia niektorých častí mikroskopu. Následne sme všetky zozbierané dáta vyhodnotili.

Výsledky a diskusia

Žiaci v odovzdaných produktoch pomenovali tieto časti: *okulár*, *objektív(y)*, *príchytky* (event. *svorky*), *stolík*, *skrutku na posun* (event. *zaostrenie*), *osvetlenie*, *hlavný vypínač*. Zvyšné časti neoznačovali. Prostredníctvom rozhovoru sme zistili, že napr. statív, či otáčavú hlavicu objektívu nepovažovali za potrebné označiť. S irisovou clonou na hodinách nepracovali a preto ju neoznačili ani v pracovnom liste. Výsledky sme zhrnuli do nasledujúcej tabuľky 1.

Tab. 1. Prehľad častí a funkcií mikroskopu uvedených jednotlivými žiakmi

Legenda X_p pomenovanie časti mikroskopu (max 7b), X_f uvedenie funkcie časti mikroskopu (max 7b)
A_p okulár, A_f pozorovanie objektov; B_p objektívy, B_f zväčšovanie pozorovaných objektov; C_p príchytky (alebo svorky), C_f na prichytávanie pozorovaných objektov; D_p stolík, D_f na polozenie (umiestnenie) pozorovaného objektu; E_p skrutka na zaostrovanie (alebo mikroskrutka a makroskrutka); E_f na priblíženie, resp. oddiaľovanie objektu tak, aby sme objekt videli zreteľne; F_p osvetlenie (alebo žiarovka), F_f zdroj svetla (alebo na presvetlenie inak tmavého objektu); G_p hlavný vypínač, G_f na zapnutie osvetlenia; 1 (1b za správne uvedení pojem), 0 (0b za nesprávny alebo neuvedení pojem)

časť mikroskopu	uvedenie názvu a funkcie mikroskopu	respondenti							celkové skóre
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	
A	A _p	0	1	0	0	1	1	1	4
	A _f	1	0	1	1	1	0	0	4
B	B _p	0	1	0	0	1	0	0	2
	B _f	1	1	1	1	1	1	0	6
C	C _p	0	0	0	0	0	0	0	0
	C _f	1	1	1	0	1	0	1	5
D	D _p	0	1	0	0	0	0	0	1
	D _f	0	0	0	1	0	1	0	2
E	E _p	1	1	0	0	0	0	0	2
	E _f	1	1	1	1	1	0	1	6
F	F _p	0	1	0	0	1	0	1	3
	F _f	1	1	1	1	1	1	0	6
G	G _p	0	0	1	1	1	0	0	3
	G _f	1	0	0	1	1	1	0	4
celková úspešnosť žiaka	X _p	1	5	1	1	4	1	2	
	X _f	6	4	5	6	6	4	2	

Výsledky sme zosumarizovali podľa názvu danej časti mikroskopu a správneho pomenovania funkcie. Štyria žiaci zo siedmich pomenovali časť *okulár* a štyria uviedli správne jeho funkciu, že *služi na pozorovanie objektov*. Len jeden žiak uviedol aj správne pomenovanie, aj funkciu danej časti. Časť *objektív(y)* pomenovali dvaja žiaci, ktorí súčasne uviedli aj ich funkciu. K nim sa pridali štyria, ktorí uviedli len funkciu tejto časti. *Príchytky*

(alebo svorky), ktoré slúžia na prichytávanie pozorovaných objektov, nepomenoval správne nikto. Piaty respondent však uviedli, na čo slúžia. Len jeden žiak pomenoval *stolík* a len dvaja uviedli jeho funkciu, napriek tomu, že na túto časť študenti umiestňujú pozorované objekty. Na základe rozhovorov so žiakmi sme zistili, že ho žiaci považujú za samozrejmosť a neuvedomili si, že je tiež súčasťou mikroskopu. *Skrutku na zaostrovanie* spolu s funkciou uviedli dvaja žiaci. Ďalší štyria uviedli len, na čo slúži. Najčastejšie uvádzanou časťou bolo *osvetlenie*. V tejto položke sme uznávali za správne pomenovanie aj uvedenie pojmu *žiarovka*, nakoľko ho žiaci používali už pri predchádzajúcej práci s mikroskopom. Za správne uvedenú funkciu sme považovali odpovede: *zdroj svetla* a *presvietenie pozorovaného objektu*. Všetci respondenti túto časť na obrázku označili. Dôvodom je nutnosť zapnutia osvetlenia, nakoľko sa tmavý objekt nedá dobre pozorovať. Jeden žiak uviedol len pomenovanie, štyria funkciu a dvaja zvládli zadanie kompletne. Časť *hlavný spínač* pomenoval jeden žiak bez uvedenia funkcie. Dvaja žiaci pomenovali funkciu tejto časti: *služi na zapnutie osvetlenia*, bez uvedenia názvu. Dvaja žiaci uviedli aj pomenovanie tejto časti, aj jej funkciu a dvaja žiaci túto časť ani neoznačili.

Žiaci uviedli správne funkciu k určitej časti mikroskopu v 67,35%-tách a pomenovanie danej časti mikroskopu v 30,61%-tách. Najlepšie ovládaným pojmom bol okulár. Táto časť je často pomenovávaná aj pri praktických cvičeniach ako zo strany pedagóga, tak aj zo strany samotného žiaka (napr. „*Cez okulár môžete vidieť...*“). Najčastejšie uvádzané funkcie sa týkali častí mikroskopu: *objektívy*, *skrutka na zaostrovanie* a *osvetlenie* (alebo *žiarovka*). Pri práci s mikroskopom s nimi manipulujú najviac, okrem samotnej prípravy preparátu. Potrebujú objekt vidieť (preto potrebujú svetlo) zreteľne (preto zaostrujú na objekt) a v prípade, že ide o malý objekt, obraz zväčšujú. To môže byť dôvodom, prečo funkcie týchto častí ovládajú najlepšie.

Len 18,37% prípadov bolo úplne korektných (t.j. respondent uviedol správne pomenovanie časti mikroskopu, ako aj funkciu tejto časti). Časti mikroskopu neboli označené v 20,41%. Zvyčajne sa zabúdalo na stolík.

Záver

Skúmali sme vplyv teoretických znalostí a praktických skúseností žiakov pri práci s mikroskopom na trvácnosť nadobudnutých vedomostí pri znovupoznávaní častí mikroskopu a ich funkcií. Z výsledkov výskumného šetrenia vyplýva, že vykonávanie praktických cvičení na hodinách biológie malo za následok lepšie znovuspoznanie funkcií v porovnaní s pomenovaním častí mikroskopu. Vyplýva to z rozdielu v uvedení funkcií jednotlivých častí

mikroskopu, ktoré žiaci uviedli o 36,73% viac v porovnaní s množstvom zapamätaných teoretických pojmov. Z konkrétnych častí mikroskopu vedeli najčastejšie pomenovať tie, ktoré uvádzal počas praktických cvičení učiteľ alebo spolužiak.

Správne pomenovať časti prístroja, zariadenia, či aparatúry, s ktorými žiak pracuje a bude perspektívne pracovať vo svojom zamestnaní, je dôležité z pohľadu správneho používania i komunikácie s inými spolupracovníkmi v danej oblasti, aby nedošlo k omylom vo výskumných šetreniach, prácach, či k nebezpečným manipuláciám v dôsledku nesprávneho označenia a práce so súčasťami prístrojov a zariadení. Preto je potrebné dbať na dôsledné oboznámenie s akýmikoľvek dostupnými zariadeniami určenými na prácu na hodinách biológie, chémie, fyziky, atď. už v školských podmienkach a nepodceňovať overenie ich skutočných znalostí či pochopenia príslušných funkcií.

Ďalšou možnosťou upevňovania a fixácie tohto typu poznatkov je popis častí podľa fotografií, alebo priame pomenovanie častí prístroja a jeho funkcií priamo v laboratóriu. Následne by mal žiak deklarovať svoje vedomosti tým, že nielen dokáže napr. pripraviť mikroskopický preparát a mikroskop na použitie, ale vie aj primerane popísať, čo uskutočňuje.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Sequeira, Aloysius H. (2012) Introduction to Concepts of Teaching and Learning. SSRN. 18(9), p. 1
- [2] Fančovičová, J., Kubiato, M. (2015) sci.ED. 6(1), p. 2
- [3] Veselský, M., Hrubíšková, H. (2009) Pedagogická orientace. 19(3), p. 45
- [4] Ottander, C., Gresslsson, G. (2006) Journal of Biological Education. 40(3), p. 113
- [5] Hamilton-Ekeke, J.-T. (2007) International Journal of Science Education. 29(15), p. 1869
- [6] Fägerstama, E., Blom, J. (2013) Journal of Adventure Education and Outdoor Learning. 13(1), p. 56
- [7] iŠVP Biológia – nižšie stredné vzdelávanie. [Citované: 14. október 2022] <https://www.statpedu.sk/files/articles/dokumenty/inovovany-statny-vzdelavaci-program/biologia_nsv_2014.pdf>
- [8] iŠVP Biológia – gymnázium so štvorročným a päťročným vzdelávacím programom. [Citované: 14. október 2022] <https://www.statpedu.sk/files/articles/dokumenty/inovovany-statny-vzdelavaci-program/biologia_g_4_5_r.pdf>
- [9] Ušáková, K., Hudák, J., Krajčovič, J. et al. (2003) Biológia pre gymnáziá – 1. časť. Biológia bunky a rastlín. Slovenské pedagogické nakladateľstvo, Bratislava, p. 13

Analýza využívania školského dvora vo vyučovaní prírodovedných predmetov na stredoslovenských školách

Alexander Kmeť, Štefan Karolčík

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra didaktiky prírodných vied, psychológie a pedagogiky, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; kmet45@uniba.sk

Abstract

Analysis of schoolyard usage in natural sciences education at schools in central Slovakia

Outdoor education (OE) is a “hot topic” in current natural sciences-focused educational research. It offers obvious advantages compared to indoor teaching, e. g. opportunities for a variety of educational concepts; among others hands-on activities, place-based and experiential learning. Schoolyard is a convenient place for OE, since it is easily accessible, safe, and often already adapted for educational purposes. Only a few papers focus on schoolyard usage in natural sciences subjects in Slovakia, therefore we have decided to contribute by analysing the situation in central Slovakia, focusing on the Žilina region. Schoolyard OE at 9 schools has been analysed and the most common educational concepts identified. Two case studies were included to draw a better image of schoolyard OE in central Slovakia.

Keywords: *outdoor education; schoolyard; natural sciences; experiential learning*

Úvod a formulácia cieľa

Outdoorové vyučovanie (OV) je v súčasnosti horúcou témou prírodovedného vzdelávania. Nečudo – veď viaceré výskumy naznačujú, že presunutie vyučovania z klasickej školskej triedy vonku dokáže zlepšiť sociálne zručnosti, vzdelávacie výsledky, postoje k predmetom ako aj celkovú psychickú pohodu žiakov [1 – 5]. Rovnako sú veľmi široké možnosti využitia moderných foriem a koncepcií: medzi najčastejšie používané koncepcie vyučovania patria zážitkové, rovesnícke, kooperatívne, problémové, projektové a bádateľsky orientované vyučovanie [6, 7]. Hlavne biológia a geografia sú predmety, kde OV môže lepšie priblížiť obsah kurikula nakoľko žiakom umožňuje priamo pozorovať prírodu a krajinu [3]. V niektorých krajinách je OV pomerne dobre etablované, príkladom môže byť USA [2], alebo Škandinávia [8, 9]. V iných možno sledovať pokles využívania foriem OV vo vyučovaní, ako napríklad v Spojenom kráľovstve [10]. U nás údaje o využívaní OV chýbajú. Ako však dokážeme neskôr aj my, aj u nás nájdeme viacero príkladov dobrej praxe [11, 12].

Prírodné ekosystémy sú pre outdoorové vyučovanie prírodovedných predmetov, pochopiteľne, najvhodnejšie, preto sa ich zapojeniu do vyučovania venovala aj u nás pozornosť [11]. Hlavne v mestách sú však vhodné prírodné ekosystémy často horšie dostupné, čo je pre vzdelávanie vonku prekážkou. Jedným z riešení môže byť práve využitie *školského dvora*. Ten sa dá vo vyučovaní prírodných vied využiť rôzne, napríklad ako zdroj biologického

materiálu a priestor pre pozorovanie a bádanie [13]. O využití školských dvorov na slovenských školách literatúra chýba – príklady dobrej praxe možno spravidla nájsť len priamo na školách, prípadne ich webových stránkach. Preto je cieľom nášho výskumu aspoň čiastočne zistiť stav prírodovedného vzdelávania na školských dvoroch stredoslovenských škôl.

Materiál a metódy

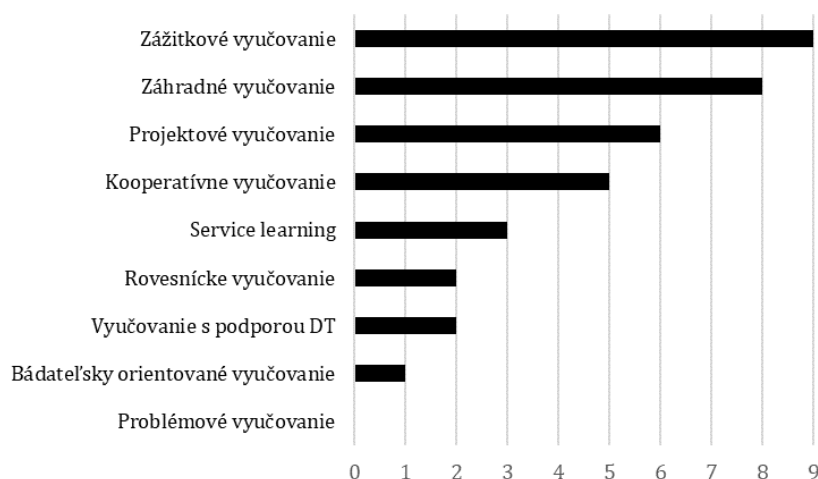
Za účelom výskumu boli kontaktovaní zamestnanci 64 základných škôl a gymnázií v Žilinskom samosprávnom kraji. Ako zdroj údajov poslúžili priame návštevy škôl, mailová komunikácia a informácie zverejnené na webových stránkach. Outdoorové aktivity, ktoré školy realizovali na školskom dvore sme následne rozdelili do kategórií (inšpirované [6], no zjednodušené, prispôbené potrebám výskumu aj slovenským realitám, Tab. 1.) a výsledky sme vyhodnotili.

Tab. 1. Najčastejšie formy a koncepcie vzdelávania realizované na školskom dvore.
Podľa [6], upravené

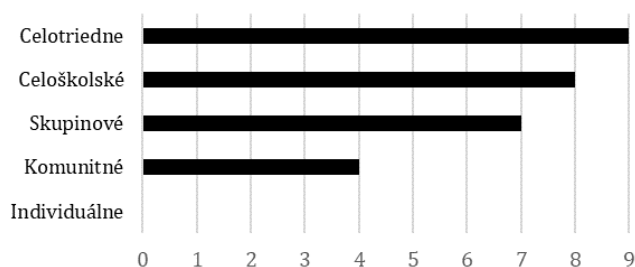
Formy	Koncepcie
	Vyučovanie s podporou DT
	Service learning
Individuálne	Projektové vyučovanie
Skupinové	Kooperatívne vyučovanie
Celotriedne	Bádateľsky orientované vyučovanie
Celoškolské	Problémové vyučovanie
Komunitné	Zážitkové vyučovanie
	Rovesnícke vyučovanie
	Záhradné vyučovanie

Výsledky a diskusia

Z oslovených základných škôl a gymnázií, sme počas výskumu zistili realizáciu OV prírodovedných predmetov na školskom dvore u 9. Z tohto počtu sa 5 škôl ozvalo s pozitívnou odpoveďou a u 4 škôl sme údaje získali z webovej stránky školy. OV na školskom dvore realizovali len *vidiecke základné školy*. Všetky uvedené školy realizovali OV na školskom dvore cez vzdelávacie programy – najčastejšie cez program Zelená škola. Prehľad najčastejšie používaných metód a foriem môžeme sledovať na Obrázkoch 1 a 2.



Obr. 1. Koncepcie vzdelávania používané skúmanými školami na školskom dvore



Obr. 2. Formy vzdelávania používané skúmanými školami na školskom dvore

Ako vidíme, najčastejšie sa na školskom dvore realizovalo *zážitkové vyučovanie*, nasledovalo vyučovanie *záhradné*, *projektové* a *kooperatívne*. Tieto koncepcie čitateľa nevelmi prekvapia: napokon, školský dvor je pre ne ako stvorený. Ostatné koncepcie sme sledovali menej často. Ak by sme porovnávali s výsledkami v podobne zameranom výskume [6] (ktorý však sledoval koncepcie v OV všeobecne, nielen na školskom dvore), tak hlavným rozdielom je väčšie využívanie zážitkového vyučovania na skúmaných školách.

Z pohľadu foriem možno sledovať zaujímavý jav: zatiaľ čo pri vyučovaní v školskej triede prevažujú formy skupinové a celotriedne, pri vyučovaní na školskom dvore sa omnoho častejšie zapojí celá škola, alebo dokonca komunita obce.

U viacerých škôl bola škála použitých koncepcií a foriem zaujímavá; pre lepšiu ilustráciu dopĺňame výsledky o dve kazuistiky, konkrétne zo základných škôl v Hornej Štubni (okres Turčianske Teplice) a Vavrečke (okres Námestovo).

Kazuistika zo ZŠ Horná Štubňa

Základná škola v Hornej Štubni realizuje OV na školskom dvore hlavne prostredníctvom zapojenia sa do programu *Zelená škola*. Priestor pred školou, zarastený predtým orgovánom a náletovými drevinami bol upravený, pričom na mieste ostala len jablňoň,

ktorú sa rozhodli zachrániť a primerane ošetriť. Na predtým ruderálnom stanovisku žiaci a zamestnanci školy vysadili asi 20 ovocných stromov (každá trieda dva stromy) a okolo 20 ovocných krov, pričom prevládajú domáce dreviny ako jablone, ríbezle a egreše. O dreviny sa žiaci starajú hlavne na hodinách techniky a biológie. Na kraji tohto stanoviska vznikla skalka s liečivými rastlinami a označeniami ich názvov. Škola okrem toho kompostuje, časť konárov a lístia necháva tiež ako úkryt pre ježkov. Pri dielňach vznikol samostatný priestor s lavičkami, kde sa v peknom počasí presunú von vyučovacie hodiny. Chystá sa ešte hmyzí hotel a kvetinová lúka, ďalej vtáacie búdky, krmidlá a pocitový chodník. Na školskom dvore sa vyučujú viaceré predmety, najviac však biológia, technika a geografia. V biológii sa najviac vyučujú tematické celky *Život s človekom a v ľudských sídlach* a *Život na poliach a lúkach*. Z geografie sa na školskom dvore zatiaľ realizovali hodiny o počasí (v rámci fyzickej geografie), konkrétne výroba prvkov meteorologickej stanice. Z foriem a koncepcií sa uplatňuje predovšetkým:

Zážitkové vyučovanie, kam možno zaradiť prírodovedné aktivity realizované na školskom dvore, ktoré zahŕňali kontakt s okolitým prostredím, napríklad tvorbu záhonu s bylinkami, sadenie ovocných drevín a starostlivosť o ne.

Rovesnícke vyučovanie, v rámci školy aj mimo nej žiaci organizovali „hodiny“, kde mladším spolužiakom rozprávali napríklad o dôležitosti kompostovania, či o účinkoch liečivých rastlín

Kooperatívne vyučovanie, žiaci v skupinách pozorujú život na školskom dvore, starajú sa o stromy, kry, či záhony, ktoré sú jednotlivým skupinám zverené.

Z aktivít osobitne vyberáme prácu so záhonom s liečivými rastlinami ako pekný príklad využitia OV na prepojenie rôznych tematických celkov, predmetov, ako aj voľnočasových aktivít. Celá aktivita začala na hodinách biológie v deviatom ročníku, kde žiaci v rámci tematického celku *Neživá príroda a jej poznávanie* navštívili miestny lom. Tam získali vápenec, ktorý bol následne prevezený na školský dvor. Na hodine techniky následne vytvorili z vápencových skál tvar špirály aj so zeminou, do ktorého členovia krúžku a šiestaci v rámci hodín o liečivých rastlinách vysadili semiačka a priesady nimi vybraných bylín. Na inej hodine technickej výchovy vytvorili zase tabuľky s názvami. Počas roka žiaci rastliny zberali a sušili, aby v novembri zorganizovali „Čajový deň“, počas ktorého sa konala ochutnávka rôznych bylinkových čajov pre celú školu. Žiaci šiesteho ročníka to spojili s prezentáciou účinkov vybraných liečivých rastlín pre prvostupniarov.

Kazuistika zo ZŠ Vavrečka.

Základná škola vo Vavrečke realizuje vyučovanie na školskom dvore už 4 roky,

prevažne v rámci programu *Zelená škola*, v ktorom sa zaviazala odučiť každý týždeň od marca do novembra aspoň jednu hodinu outdoorovo. Okrem prírodovedy sa na školskom dvore vystriedajú takmer všetky predmety, na čo sa používa outdoorová učebňa s pódium a lavičkami. Školská záhrada sa nachádza predovšetkým vo vyvýšených záhonoch, kde sa pestujú liečivé bylinky a zelenina. Žiaci a zamestnanci školy sa tiež starajú o niekoľko ovocných stromov a krov na školskom dvore – jablone sú pôvodné a kry, prevažne ríbezle sú zasadené v rámci hodín. Bylinky využívajú počas posedení v školskej „čajovni“ a na výrobu mydla. Každý rok žiaci zasadia na školskom dvore nový strom, ide o udalosť, ktorej sa zúčastní celá komunita obce. Celkovo možno hodnotiť, že komunita je do aktivít značne zapojená, žiaci sa podieľajú na starostlivosti o obecnú zeleň, kompostovaní a triedení odpadu v obci.

Viacero aktivít súvisí s pozorovaním hmyzu. Na školskom dvore si žiaci adoptovali samotárske včely rodu *Osmia*. Včely žijú v komerčne dostupných „úľoch“, pričom každá trieda sa stará o jeden. Podobne škola zabezpečila kukly motýľov, ktoré žiaci umiestnili do vhodných podmienok a pozorovali ich ďalší vývin. Cez zimu žiaci zabezpečovali prikrmovanie vtáctva, na jar zas stavbu vtáčích búdok.

V budúcnosti škola plánuje realizáciu jazierka s vodnými rastlinami a živočíchmi, ako aj bezzásahovej časti dvora s lúčnymi kvetmi. V rámci iného projektu škola vyhrala skleník, ktorý v čase výskumu (február 2023) čakal na jarné zmontovanie. Z praktických poznámok však stojí za spomenutie fakt, že záhrada musela byť po niekoľkých zlých skúsenostiach oplotená a stavby tam poistené.

Z metód, koncepcií a foriem sa na školskom dvore realizovali najmä:

Zážitkové vyučovanie, kam možno zaradiť takmer všetky prírodovedné aktivity realizované na školskom dvore, napríklad tie súvisiace so školskou záhradou.

Bádateľsky orientované vyučovanie, hlavne riadené bádanie. Vyučujúce vytvorili jednotný formát bádateľského listu, ktorý žiaci vyplňali počas vybraných aktivít. Stojí za zmienku, že žiaci museli pri každej aktivite identifikovať, či ide o pokus alebo pozorovanie. Všetky takéto úlohy aj s riešeniami tvoria portfólio – bádateľskú knihu školy.

Rovesnícke vyučovanie – v rámci školy aj mimo nej žiaci organizovali „hodiny“, kde rovesníkom prezentovali svoje činnosti, ako aj postupy pri niektorých aktivitách (napríklad pri výrobe mydla).

Záver

Využívanie školského dvora pre vyučovanie prírodných vied je na Slovensku zatiaľ v začiatkoch: vo všeobecnosti možno konštatovať, že sa realizuje zriedka. Možným dôvodom

je nedostatok prostriedkov a podkladov, nedostatočná motivácia učiteľov, ako aj absencia OV v ich pregraduálnej príprave. Potrebné podklady a finančné prostriedky školy získavajú predovšetkým prostredníctvom programov, akým je napríklad *Zelená škola*. Napriek tomu možno konštatovať, že aj v regiónoch nájdeme viacero príkladov dobrej praxe. Na školských dvoroch sa s úspechom realizuje celá škála moderných koncepcií a do vyučovania sa často zapája celá škola, alebo dokonca celá komunita. Najčastejšie identifikované vzdelávacie koncepcie boli zážitkové a záhradné vyučovanie, čo súvisí s možnosťami, ktoré školský dvor väčšinou ponúka. Vo využívaní školského dvora viedli vidiecke základné školy - dôvodom je s najväčšou pravdepodobnosťou blízkosť prírody, ako aj bližší vzťah s komunitou obce.

PodĎakovanie

Za možnosť zažiť OV na vlastnej koži priamo na školskom dvore ďakujeme pani riaditeľke ZŠ s MŠ Vavrečka Mgr. Dane Serdelovej a pánovi učiteľovi zo ZŠ v Hornej Štubni Mgr. Jánovi Kováčikovi. Za odborné rady a konzultácie ďakujeme kolegom z Katedry didaktiky prírodných vied psychológie a pedagogiky a za kontakty na učiteľov a prírodovedcov zo Žilinského kraja Mgr. Zuzane Bukovenovej a Mgr. Veronike Dériovej.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Munge B., Thomas G., Heck D. (2017) J. Exp. Educ. 41(1), p. 1
- [2] American Institutes for Research (2005) Effects of Outdoor Education Programs for Children in California. American Institutes for Research, Palo Alto, CA, USA, p. 15
- [3] Arıkan K. (2021) J. Biol. Educ. p. 1
- [4] Cooley S. J., Burns V. E., Cumming J. (2014) High. Educ. 69(4), p. 567
- [5] Fančovičová J., Prokop P. (2011) Environ. Educ. Res. 17(4), p. 537
- [6] Jeronen E., Palmberg I., Yli-Panula E. (2017) Educ. Sci. 7(1), p. 1
- [7] Behrendt M., Franklin T. (2014) Int. J. Environ. Sci. Educ. 9(3), p. 235
- [8] Bentsen P., Jensen F. (2012) J. Adventure Educ. Outdoor Learn. 12(3), p. 199
- [9] Fägerstam E., Blom J. (2013) J. Adventure Educ. Outdoor Learn. 13(2), p. 56
- [10] Lock R. (2009) J. Biol. Educ. 44(2), p. 58
- [11] Prokop P., Žoldošová K. (2006) J. Sci. Educ. Technol. 15(3), p. 304
- [12] Şen A. İ., Oktay Ö., Yüksel T., et al. (2021) Out-of-School Learning in European Countries: Cases from Turkey, Czechia, Slovakia, and Germany. Hacettepe University, Hacettepe, Turecko, p. 82
- [13] Howarth S., Slingsby D. (2006) School Sci. Rev. 87(320), p. 99

Stres a vyhorenie učiteľov prírodovedných predmetov počas pandémie COVID-19

Dominika Kunzová, Peter Ikhardt

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra didaktiky prírodných vied, psychológie a pedagogiky, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; vazanova11@uniba.sk

Abstract

Science teachers' stress and burnout during the COVID-19 pandemic

During the COVID-19 pandemic, teachers faced an unprecedentedly stressful situation. This study analysed possible correlations between perceived stress, burnout, preferred coping strategies, sense of coherence and teacher efficacy among Slovak teachers during the pandemic and described how selected socio-demographic characteristics affect those variables. The survey data were collected from 99 Slovak secondary school teachers, using an online questionnaire including 5 diagnostic methods. The results show a significant association between perceived stress and preferred avoidant coping strategies, burnout, and devaluation of teachers' self-efficacy and suggest no significant difference between science and non-science teachers in perceived stress and burnout. Nevertheless, relatively high detected figures in perceived stress, avoidant coping strategies and burnout imply that preventive measures are required to avoid future worsening.

Keywords: COVID-19 pandemic; stress; burnout; science teachers

Úvod a formulácia cieľa

Učiteľská profesia je jednou z najrizikovejších z hľadiska stresu a vyhorenia [1]. Pandémia COVID-19 a náhle zatváranie škôl po celom svete prinieslo učiteľom nové zdroje stresu spojené s dištančnou výučbou, na ktorú mnohé školy ani učitelia neboli pripravení [2].

Pred veľkou výzvou stáli učitelia prírodovedných predmetov. V nich sa nerozvíjajú len kognitívne schopnosti, ale i praktické zručnosti a spôsobilosti vedeckej práce. Viacerí autori poukázali na to, že pre praktické predmety je dištančné vzdelávanie obzvlášť limitujúce, nakoľko praktické zručnosti s prácou v teréne či v laboratóriu sa online získať nedajú [3, 4]. Zabezpečenie kvalitnej výučby prírodovedných predmetov si od učiteľov vyžadovalo prispôsobenie obsahu hodín dištančnej forme vyučovania, čo pri nedostatočnom technickom a materiálnom zabezpečení a absencii priameho kontaktu so žiakmi znamenalo i dlhší čas strávený prípravou [5].

Pre vyššie uvedené je potrebné predpokladať, že miera záťaže, stresu a vyhorenia u učiteľov v období pandémie COVID-19 výrazne stúpila. Viacero zahraničných štúdií naznačuje, že koronakríza zapríčinila výrazné zhoršenie v oblasti duševného zdravia a psychickej pohody učiteľov, pričom najčastejšie avizované boli príznaky úzkosti, depresie, stresu a vyhorenia [6, 7]. Nepanuje však všeobecná zhoda v tom, ktoré sociodemografické

charakteristiky so zvýšenou mierou stresu a vyhorenia súvisia. Napríklad Ozamiz-Etxebarria et al. [6] vo svojej metaanalýze uvádzajú, že v prežívaní stresu neboli nájdené významné rozdiely medzi mužmi a ženami, zatiaľ čo Silva et al. [7] zaznamenali výrazne vyššiu mieru prežívaného stresu u žien. Podobne sa rozchádzajú výsledky týkajúce sa veku či dĺžky pedagogickej praxe. Taktiež chýbajú štúdie, ktoré by monitorovali stav populácie slovenských učiteľov, a preto sme sa v našej práci rozhodli venovať pozornosť práve tejto problematike.

Cieľom našej práce je analyzovať možné vzájomné vzťahy medzi stresom, vyhorením, preferovanými copingovými stratégiami, zmyslom pre integritu a vnímanou zdatnosťou u slovenských učiteľov a popísať, ako vybrané sociodemografické charakteristiky ovplyvňujú skúmané premenné.

Materiál a metódy

Výskumný súbor tvorilo 99 učiteľov ZŠ a SŠ z rôznych obcí (13), okresných (36) a krajských (50) miest Slovenska vo vekovom rozmedzí 26 - 66 rokov a s praxou 0 - 40 rokov. Z nich bolo výrazne viac žien (87) ako mužov (12), čo však odráža reálne pomery na ZŠ a SŠ u nás. Aprobáciu aspoň s 1 prírodovedným predmetom malo 57 z nich a skúsenosť s online vyučovaním pred pandémiou iba 12.

Výskum bol realizovaný prostredníctvom online dotazníka prístupného cez aplikáciu Google Forms od júla do novembra 2022. Respondentom bol zasielaný prostredníctvom linku (emailom, soc. sieťami). Dotazník pozostával z nasledovných 5 metód: Škála vnímaného stresu (PSS-10), Brief COPE (bCOPE), Škála zmyslu pre integritu (SOC-13), Dotazník vnímanej zdatnosti učiteľa (OSTES) a Škála vyhorenia pre učiteľov (TBS). Zo sociodemografických charakteristík sme sledovali pohlavie, vek a dĺžku pedagogickej praxe, aprobácia (prírodovedné vs. neprírodovedné predmety), predošlé skúsenosti s online vyučovaním a vlastnosti školy spojené s prostredím (veľkomestské, okresné mesto resp. obec, ktorá nie je mestom).

Dotazník PSS-10 je jednodimenzionálny a meria vnímaný stres. Brief COPE má 14 parciálnych (aktívne zvládanie, pomoc od iných, plánovanie, pozitívne nastavenie, emocionálna podpora, zdieľanie sa, sebaobviňovanie, humor, akceptácia/prijímanie, náboženstvo, rozptýlenie sa, popieranie, konzumácia návykových látok, vzdanie sa) a 3 celkové premenné (na problémy zamerané stratégie, na emócie zamerané stratégie, vyhýbavé stratégie). Dotazník SOC-13 má 3 parciálne premenné (zrozumiteľnosť, zvládateľnosť, zmysluplnosť) a 1 celkovú premennú (zmysel pre integritu). Zdatnosť viesť žiakov, zdatnosť využívať vyučovacie postupy, zdatnosť riadiť triedu sú parciálne premenné a celková vnímaná

zdatnosť je celková premenná dotazníka OSTES. Kariérna (ne)spokojnosť, (chýbajúca) podpora od nadriadených, (ne)zvládanie pracovného stresu, vzťahy k študentom (devalvácia) a celkové vyhorenie sú premenné merané prostredníctvom dotazníka TBS. Deskriptívne vlastnosti empirických premenných a výsledky testovania normality distribúcie premenných (Tab. 1) nás viedli k rozhodnutiu preferovať v ďalších analýzach neparametrické postupy.

Tab. 1. Deskriptívne charakteristiky skúmaných premenných a výsledky testov normality
(n=99; Lilleforsova korekcia hodnoty signifikancie testu Kolmogorova – Smirnova; Shapiro – Wilkov test; oba pre hladinu významnosti $\alpha=0,05$)

empirická premenná	vnímaný stres	rozptýlenie	akt. zvládanie	popieranie	užív. náv. látok	emocion. podpora	pomoc iných	vzdanie sa	zdieľanie sa	pozit. nastavenie	plánovanie	humor	akceptácia	náboženstvo	sebaobvinenie	stratégie zamer. na problémy
mean	19,27	3,04	3,25	1,83	1,37	2,80	2,90	1,66	2,85	3,17	3,25	2,47	3,10	2,25	2,30	3,14
mod	20,00	3,00	3,50	2,00	1,00	3,00	3,00	1,50	3,00	3,00	3,50	2,50	3,00	2,00	2,00	3,25
mdn	22,00	3,00	3,00	2,00	1,00	3,00	3,00	1,00	2,50	3,00	3,00	2,00	3,00	1,00	2,00	3,13
stdev	7,108	0,713	0,644	0,708	0,723	0,673	0,696	0,782	0,599	0,769	0,612	0,801	0,570	1,153	0,836	0,467
min	0	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	2
max	36	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
norm	NA	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
empirická premenná	stratégie zamer. na emócie	vyhýbavé stratégie	zrozumiteľnosť	zvládateľnosť	zmyslupnosť	zmysel pre integritu	zdat. viesť žiakov	zdat. využívať vyuč. postupy	zdatnosť riadiť triedu	celková vnímaná	kariérna (ne)spokojnosť	(chýbajúca) podpora	(ne)zvládanie pracovného	vzťahy - študenti	vyhorenie	
mean	2,63	1,98	21,41	15,98	20,58	57,97	7,06	7,74	7,35	7,38	13,60	14,72	17,70	10,81	56,82	
mod	2,58	1,88	21,00	16,00	21,00	58,00	7,13	7,88	7,63	7,58	13,00	14,00	18,00	11,00	56,00	
mdn	2,50	1,75	23,00	17,00	17,00	57,00	7,13	8,00	8,50	7,25	16,00	6,00	14,00	11,00	54,00	
stdev	0,351	0,441	4,901	3,040	3,959	8,521	1,118	0,899	1,192	0,995	6,245	6,492	6,595	3,765	17,829	
min	2	1	6	9	7	39	4	5	4	4	5	6	6	4	21	
max	3	3	32	25	28	78	9	9	9	9	30	32	33	20	109	
norm	AA	NN	AA	NA	AN	NA	NN	NN	NN	NN	NN	NN	AA	AA	AA	

vysvetlivky: mean = aritmetický priemer empirickej premennej; mod = modus e.p.; mdn = medián e.p.; stdev = smerodajná odchýlka e.p., min = minimálna hodnota e.p., max = maximálna hodnota e.p.; norm = výsledok testovania hypotézy o normálnosti distribúcie početností empirickej premennej (prvý znak: test podľa Kolmogorova – Smirnova, druhý znak: test podľa Shapira – Wilka, A = splnené; N = nesplnené štatistické kritérium)

Pre analýzu asociačných vzťahov sme využili výpočet Spearmanovho koeficientu poradovej korelácie ρ . Rozdiely v sociodemografických charakteristikách sme zisťovali prostredníctvom neparametrických testov: U-test Manna – Whitneyho (pre premenné pohlavie, aprobácia a skúsenosť s online vyučovaním), resp. H-test Kruskala – Wallisa (pre premenné vek, dĺžka pedagogickej praxe, prostredie školy).

Výsledky a diskusia

Ako vyplýva z Tab. 2, so stúpajúcou mierou vnímaného stresu preferujú učitelia vyhýbavé copingové stratégie (vzdanie sa, sebaobviňovanie, popieranie), zatiaľ čo stratégie zamerané na riešenie problému učitelia preferujú menej.

Tab. 2. Signifikantné korelácie medzi vnímaným stresom (PSS-10) a preferovanými copingovými stratégiami učiteľov (bCOPE)

(n=99; Spearmanov koeficient poradovej korelácie ρ ; * - $p = 0,05$, ** - $p = 0,01$)

	rozptýlenie sa	aktívne zvládanie	popieranie	konsumácia návykových	emocionálna podpora	pomoc od	vzdanie sa	zdíeľanie sa	pozit. nastavenie	plánovanie	humor	akceptácia	náboženstvo	sebaobviňovanie	stratégie - na problémy	strateg. - na emócie	vyhýbavé stratégie
PSS-10		-0,266**	0,268**				0,534**		-0,475**	-0,250*	-0,288**			0,490**	-0,405**		0,416**

Silná pozitívna súvislosť medzi stresom a vyhorením (Tab. 3.; $\rho = 0,596^{**}$) naznačuje, že čím viac stresu učitelia prežívajú, tým vyššie je u nich riziko vyhorenia. K riziku vyhorenia pri prežívaní stresu výrazne prispieva jeho nezvládanie ($\rho = 0,597^{**}$ - silná pozitívna súvislosť) a chýbajúca podpora od nadriadených ($\rho = 0,450^{**}$ - stredne silná pozitívna súvislosť). Aj medzi vnímaným stresom a kariérnou nespokojnosťou ($\rho = 0,364^{**}$) ako aj devalváciou vzťahu k študentom ($\rho = 0,352^{**}$) nachádzame stredne silný pozitívny vzťah. Ďalej sme zistili, že zvýšená miera vnímaného stresu u učiteľov silno negatívne koreluje s ich zmyslom pre integritu ($\rho = -0,622^{**}$), čo znamená, že učitelia prestávajú rozumieť svojej práci (premenná zrozumiteľnosť: $\rho = -0,627^{**}$) a do určitej miery im prestáva dávať zmysel (premenná zmyslupnosť: $\rho = -0,463^{**}$). Zaujímalo nás aj to, ako sa pod vplyvom prežívaného stresu menia učiteľove presvedčenia o svojich schopnostiach. Vnímaná zdatnosť vo všetkých jej dimenziách stredne silno negatívne korelovala s prežívaným stresom (zdatnosť viesť žiakov: $\rho = -0,433^{**}$; zdatnosť využívať vyučovacie postupy: $\rho = -0,337^{**}$; zdatnosť riadiť triedu $\rho = -0,306^{**}$; celková vnímaná zdatnosť: $\rho = -0,396^{**}$).

Tab. 3. Signifikantné korelácie medzi vnímaným stresom (PSS-10) a SOC-13, OSTES, TBS

(n=99; Spearmanov koeficient poradovej korelácie ρ ; * - $p = 0,05$, ** - $p = 0,01$)

	Zrozumiteľnosť	zvládateľnosť	zmyslupnosť	zmysel pre integritu	zdatnosť viesť žiakov	zdatnosť využívať	zdatnosť riadiť triedu	celk. vnímaná zdatnosť	kariérna (ne)spokojnosť	(chýbajúca) podpora od	(ne)zvládanie prac. stresu	vzťah k študentom (devalvácia)	vyhorenie
PSS-10	-0,627**		-0,463**	-0,622**	-0,433**	-0,337**	-0,306**	-0,396**	0,364**	0,450**	0,597**	0,352**	0,596**

Tab. 4. Signifikantné rozdiely medzi výbermi súboru (pohlavie, skúsenosť s dištančným vyučovaním) v niektorých dotazníkových premenných
(n = 99, alpha = 0,05)

soc.-demograf. charakteristiky	pohlavie				skúsenosť s online vyučovaním			
dotazníková premenná	zdieľanie sa (bCOPE)		zrozumiteľnosť (SOC-13)		plánovanie (bCOPE)		vzdávanie sa (bCOPE)	
Podskupina výberu	muži	ženy	muži	ženy	skúsení	neskúsení	skúsení	neskúsení
Medián	2,50	3,00	24,00	21,00	3,50	3,00	1,00	1,50
Mann-Whitney U	254,5		343,0		314,0		350,0	
p	0,003		0,054		0,002		0,012	

Analýza vplyvu vybraných sociodemografických premenných na dotazníkové premenné preukázala, že ženy signifikantne viac pri strese preferujú zdieľanie sa ako copingovú stratégiu a menej vnímajú stresovú situáciu ako zrozumiteľnú. Podobne učitelia, ktorí už aj pred pandémiou mali skúsenosť s dištančným vyučovaním z copingových stratégií viac preferujú plánovanie a menej sa vzdávajú, ako tí, u ktorých skúsenosť s dištančným vzdelávaním pred pandémiou absentovala. Pri ostatných sociodemografických vplyvoch (vek, dĺžka pedagogickej praxe, vlastnosti školy spojené s prostredím) na dotazníkové premenné rozdiely neboli signifikantné.

Za závažné zistenie považujeme súvislosti medzi vnímaným stresom a vyhorením a medzi stresom a vyhýbavými stratégiami. Niektoré práce [8] poukazujú na to, že pri uprednostňovaní vyhýbavých stratégií si učitelia nemusia uvedomiť, že v konečnom dôsledku znásobujú vnímanú intenzitu stresora tým, že anticipujú obavu z toho, že mu budú čeliť, a tým zvyšujú aj riziko nástupu vyhorenia. Slabý zmysel pre integritu naznačuje chýbajúce zdroje zvládania, čo môže taktiež viesť k zhoršeniu zdravia [9].

Silný pozitívny vzťah medzi stresom a vyhorením tiež vysvetľuje, prečo je učiteľstvo jednou z najrizikovejších profesií z hľadiska vyhorenia [1]. Pandémia tento účinok ešte znásobila [10], a preto je viac ako nutné venovať sa psychickému zdraviu učiteľov. Zvýšená miera stresu má totiž okrem samotného učiteľa nepriamo dopad i na žiakov a môže mať za následok zhoršené akademické výsledky a nízku motiváciu [11]. S narastajúcim stresom totiž klesá u učiteľov zdatnosť viesť žiakov, čo sa môže prejaviť na zníženom sebavedomí a pochybnostiach o vlastnej schopnosti vykonávať učiteľskú profesiu.

Záver

Vzhľadom na zistené súvislosti medzi vnímaným stresom a vyhorením a aj medzi stresom a vyhýbavými stratégiami sa nám do budúcnosti javí ako potrebné skúmať možné

súvislosti medzi preferovanými copingovými stratégiami (adaptívnymi aj maladaptívnymi, resp. vyhybavými) a učiteľským vyhorením.

Napriek tomu, že zvýšená miera stresu so sebou prináša ťažkosti s jeho zvládaním, negatívne ovplyvňuje vnímanú zdatnosť, zmysluplnosť a zvyšuje riziko vyhorenia, nedá sa vo všeobecnosti povedať, že by ním niektorá z hodnotených skupín učiteľov bola ohrozená viac ako iná. Ani učitelia prírodovedných predmetov neboli počas pandémie COVID-19 vystavení vyššej miere stresu a vyhorenia.

Hodnoty stresu a vyhorenia u sledovaných participantov sú pomerne vysoké a i na základe výsledkov iných prác [6, 12] by bolo potrebné vykonať preventívne opatrenia (v rovine primárneho i sekundárneho stupňa preventívnych aktivít), aby sa stav duševného zdravia a schopnosť kvalitatívne realizovať svoje povolanie u učiteľov nezhoršili natoľko, že jeho následky budú nezvratné.

PodĎakovanie

Práca je súčasťou projektu KEGA č. 016UK-4/2022: *Metodická príručka s návrhmi preventívnych programov voči vyhoreniu a podľaľhnutiu pracovnej záťaži s copingovými technikami a stratégiami riešenia pre učiteľov.*

Zoznam použitej literatúry

- [1] Kebza V., Šolcová I. (2003) Syndrom vyhoření. Státní zdravotní ústav, Praha, ČR, p. 8
- [2] Bednárík M., Čokyna J., Ostertágová A., et al. (2020) Ako v čase krízy zabezpečiť prístup k vzdelávaniu pre všetky deti (Komentár 01/2020). IVP, Bratislava, SR, p. 4
- [3] Babosová R., Bartková A., Langraf V., et al. (2022) Educ. Sci. 12(5), p. 293
- [4] Babinčáková M., Bernard P. (2020) J. Chem. Educ. 97(9), p. 3297
- [5] Babosová R., Bartková A., Langraf V., et al. (2022) Educ. Sci. 12(5) p. 297
- [6] Ozamiz-Etxebarria N., Idoiaga Mondragon N., Bueno-Notivol J., et al. (2021) Brain Sci. 11(9), p. 1181
- [7] Silva D. F. O., Cobucci R. N., Lima S. C. V. C., et al. (2021) Medicine 100(44), p. 6
- [8] Foley M., Murphy M. (2015) Teach. Teach. Educ. 50, p. 53
- [9] Holmefur M., Sundberg K., Wettergren L., et al. (2015) Qual. Life Res. 24, p. 1456
- [10] Gutentag T., Asterhan C. S. (2022) Front. Psychol. 13, p. 3
- [11] Madigan D. J., Kim L. E. (2021) Int. J. Ed. R. 105, p. 9
- [12] Herman K. C., Reinke W. M., Eddy C. L. (2021) J. School Psychol. 36(6), p. 492

Názory a hodnotenie realizácie outdoorového vyučovania učiteľmi prírodovedných predmetov

Denisa Marcinková, Zuzana Haláková

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra didaktiky prírodných vied, psychológie a pedagogiky, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; collakova05@gmail.com

Abstract

Opinions and assessment of realization of outdoor learning by science teachers

Outdoor education is an innovative approach to science education, in which there has been a long talk of the need of reorganization of the knowledge requirements as well of skills of pupils, increasing their interest, too. This is also linked to the emphasis on the inclusion of interactive forms of teaching, appropriately complemented with traditional lectures. Outdoor learning offers more space for active involvement of pupils who can, for example, participate in the mapping of a different natural phenomenon or participate in solving specific problems. The main aim of this study was to find out how teachers perceive outdoor education. Using semi-structured interviews with six teachers, we analysed the most frequently mentioned positive and negative aspects of its implementation and looked for similarities and differences in teachers' perceptions of outdoor education.

Keywords: *outdoor education; science education; interview; evaluation*

Úvod a formulácia cieľa

Outdoorové vyučovanie tvorí špecifickú zložku vzdelávania a nachádza svoje široké uplatnenie vo vyučovaní prírodovedných predmetov. Jeho cieľom je umožniť žiakom skúmať základné prírodné procesy a javy, vrátane ich rozmanitostí a sprostredkovať im lepšie pochopenie ich špecifik. V každodennom živote sa väčšina prírodných javov odohráva vonku. Prírodovedné predmety sa v školskom prostredí napriek tomu zväčša vyučujú v interiéri. Aj keď sa môže zdať prepojenie outdoorového vyučovania s učením chémie na prvý pohľad nezlučiteľné, viacerí autori [1, 2, 3] sa zhodli v tom, že v záujme zvýšenia autenticity školských aktivít by mali učitelia zvážiť možnosť vyučovať prírodovedné predmety vonku, minimálne okruhy a témy, ktoré to umožňujú. Experimentovanie v prírode predstavuje netradičný spôsob ako u žiakov vzbudiť záujem o štúdium prírodných vied, pri špecifickejšom zameraní konkrétnejšie napr. o štúdium chémie. Aby však naplnilo výchovno-vzdelávacie ciele, musí byť efektívne začlenené do vyučovania, starostlivo pripravené, premyslené a zorganizované.

Outdoorové aktivity, vrátane experimentovania, umožňujú prepojiť prax s teóriou, stimulujú kreatívne myslenie, podnecujú žiakov k zvedavosti a záujmu o tému, preto je možné ich zaradiť v úvode prístupňovania témy, ale aj v rámci upevňovania učiva. Študenti, ktorí sa učili vonku, vykazovali lepšie dlhodobé uchovávanie vedomostí [4]. Učenie v prírodnom prostredí zvyšuje motiváciu a radosť žiakov z učenia [1]. Takýto spôsob vyučovania však stále

nie je na školách bežný. Slovensko nie je výnimkou a situácia je podobná v mnohých krajinách na celom svete. Tento trend pretrváva napriek snahám o predĺženie času stráveného učením mimo triedy [5]. Jedným z dôležitých rozdielov medzi učením sa v triede a vonku je rozšírené viacmyslové vnímanie. Kým tradičné aktivity na vyučovacej hodine v triede stimulujú najmä zrakové a sluchové vnímanie, vyučovanie vonku žiakom umožňuje zapojiť hmat, čuch či pohybovú aktivitu [6]. Využívanie rôznych foriem vyučovania, didaktických metód a prostriedkov je potrebné pre všestranný rozvoj žiakov. S ohľadom na fixáciu učiva má ich obmieňanie a používanie rôznych prostriedkov zásadný význam. Ak zmeníme spôsob, akým si žiaci upevňujú nový poznatok, naučia sa ho rýchlejšie ako opakovaním rovnakého konania [7]. Zmena prostredia je jedným z faktorov, ktorý ovplyvňuje zmysluplné učenie a v konečnom dôsledku aj dlhodobejšie zapamätanie.

Hlavným cieľom nášho výskumu bolo zistiť, ako vnímajú outdoorové vyučovanie učitelia. Zaujímalo nás, s ktorými formami sa na školách stretávajú, ako naň reagujú žiaci (akú dávajú spätnú väzbu). Pýtali sme sa tiež na vnímané pozitíva a negatíva pri organizovaní outdoorového vyučovania. Naším cieľom bolo tiež zachytiť hlavné motívy a zistiť príčiny či limity, prečo stále nie je bežnou súčasťou vyučovacieho procesu.

Materiál a metódy

Na naplnenie cieľa výskumu sme sa rozhodli uskutočniť kvalitatívny výskum. Bola aplikovaná metóda individuálneho rozhovoru výskumníka s jednotlivými učiteľmi. Pre účely tohto skúmania bol využitý pološtruktúrovaný rozhovor, ktorý zahŕňal osnovu 12 základných otázok, ale poskytol tiež priestor pre doplňujúce otázky vyplývajúce z priebehu rozhovoru [8].

Rozhovory boli nahrávané a následné detailne prepísané do digitálnej podoby. Pri analýze odpovedí sme kladli dôraz na hľadanie rovnakých, alebo podobných odpovedí. Zaujímali nás aj špecifické odpovede, ktoré nekorešpondovali s ostatnými výpoveďami.

Úlohou učiteľov v rozhovoroch bolo vyjadriť sa k nasledujúcim okruhom: súčasný stav outdoorového vyučovania; jeho pozitíva a negatíva; faktory, ktoré motivujú/odrádzajú od jeho organizovania; časová a organizačná náročnosť; administratíva; bezpečnosť a disciplína žiakov počas realizácie outdoorového vyučovania.

Rozhovorov sa zúčastnilo 6 učiteľov. Ich aprobáciu, pohlavie a dĺžku praxe uvádzame v tabuľke (Tab. 1.). Všetci dotazovaní učitelia sa v nejakej podobe zúčastnili outdoorového vyučovania a svoje odpovede formulovali na základe teoretických poznatkov o tejto forme vyučovania, ale tiež na základe osobnej skúsenosti s organizovaním a následným realizovaním outdoorového vyučovania so žiakmi v teréne.

Tab. 1. Základné charakteristiky respondentov

respondent č.	aprobácia	pohlavie	dĺžka praxe
1	biológia - chémia	žena	4 roky
2	biológia - chémia	žena	2 roky
3	biológia - chémia	žena	7 rokov
4	biológia - geografia	žena	21 rokov
5	biológia– telesná výchova	žena	29 rokov
6	biológia – anglický jazyk	muž	14 rokov

Výsledky a diskusia

V odpovediach učiteľov odznali pozitívne ohlasy na outdoorové vyučovanie. Ocenili presun vyučovacieho procesu mimo školskú triedu. *„Veľmi pozitívne vnímam presun na čerstvý vzduch. V skupine prevláda synergický efekt, lepší vzťah k predmetu.“* Iná učiteľka uviedla *„už pri presune na miesto konania sa žiaci zdali byť viac nadšení, ako pri práci v triede.“*

Prvou otázkou sme sa snažili zistiť, ako učitelia vnímajú súčasný stav outdoorového vyučovania a s akými formami tohto vyučovania sa na škole stretávajú. Od všetkých sme sa dozvedeli, že outdoorové vyučovanie stále nie je bežnou súčasťou vyučovacieho procesu. V princípe mu nikto nebráni, ale taktiež nie je zabezpečená žiadna podpora, či pomoc pri jeho realizácii. *„Na outdoorové vyučovanie nie sú vytvorené podmienky a neráta sa s ním pri tvorbe výchovno-vzdelávacích cieľov. Škola síce umožní ísť so žiakmi mimo triedu, no celá organizácia spadne na učiteľa a častokrát je to vo finále nerealizovateľné z dôvodu časového, aj materiálneho (nemáme učebné materiály usposobené na výučbu vonku).“* Iná učiteľka uviedla *„naša aprobácia teoreticky umožňuje vyučovanie vonku, no nie je to zohľadnené pri časovej dotácii hodín a na 45 minút sa mi so žiakmi neoplatí nikam ísť. Stále u nás nie je bežná bloková výučba, ktorá by bola vhodnejšia na outdoorové vyučovanie.“* V rámci foriem outdoorového vyučovania, s ktorými sa učitelia najčastejšie stretávajú uviedli exkurziu, geografické terénne cvičenia, biologické poznávanie druhov a chemické experimentovanie.

Respondenti nachádzali mnoho pozitív, ktoré prezentovali vo svojich výpovediach. Kladne hodnotili, že žiaci vidia všetko to, o čom sa teoreticky učia a vnímajú výučbu aj ďalšími zmyslami. *„Veľmi oceňujem, keď môžem žiakom ukázať rastliny, alebo živočíšne druhy priamo v prírode, oproti obrázkom v učebniciach sa živé objekty dosť líšia (farbou, tvarom, veľkosťou) a žiaci aspoň spoznajú ich rôznorodosť.“* Sami si vyskúšajú praktické činnosti (používanie atlasov, meranie, realizáciu pokusov), lepšie si uvedomujú využiteľnosť naučených poznatkov. Zážitkové učenie sa pokladá za ďalšie pozitívum. Jedna učiteľka uviedla *„outdoorové vyučovanie ponúka priestor na integráciu medzipredmetových vzťahov a tiež ponúka priestor*

na diskusiu o voliteľných témach, na ktoré bežne počas hodiny nie je čas.“ Ďalšia uviedla aj ekologický rozmer *„môžeme žiakov upozorniť na to, že po outdoorovom vyučovaní po nás v prírode nesmie nič zostať a všetok použitý materiál je potrebné z prírodného prostredia odnieť, v prírodnom prostredí je vhodné otvoriť (okrem iného) aj tému ochrany prírody.“*

Relatívne jednotné bolo zo strany učiteľov vnímanie negatív. Všetci sa zhodli na tom, že najzásadnejším negatívnym aspektom je veľmi náročná organizácia počnúc administratívou, končiac prípravou materiálov. Ďalšou nevýhodou je časová náročnosť, výber vhodného miesta či získavanie súhlasov rodičov, nakoľko žiaci opúšťajú budovu školy. V rámci negatív bol uvedený aj netolerantný prístup ostatných pedagógov voči tejto forme vyučovania. *„Žiaci musia byť naozaj zaujatí témou a aktivitami, inak hrozí zhoršená disciplína.“* Správanie žiakov učitelia považovali za limitujúci faktor. Ak nie sú disciplinovaní, nemusí sa naplniť ani cieľ vzdelávania a v horšom prípade to môže viesť k zvýšenému riziku úrazov. *„Mňa výrazne odrádza zvýšené riziko úrazu a zníženej bezpečnosti oproti hodine v triede“*, znel jeden z výrokov respondenta. Posledným zmieňovaným negatívom bolo finančné zabezpečenie outdoorového vyučovania, najmä v prípade, ak ide o viacdňové aktivity.

Učitelia sa zhodli v tom, že od žiakov nezachytili negatívnu spätnú väzbu, skôr naopak, takúto formu vyučovania si žiaci veľmi chválili, privítali by ju častejšie, optimálne raz za mesiac. Realistickejší je však pohľad učiteľov, ktorí tvrdili, že vzhľadom na náročnosť, ako časovú, tak administratívnu, si outdoorové vyučovanie dokážu predstaviť raz až dvakrát za polrok. Jednou z uvádzaných nevýhod bola nestabilita počasia, ktoré môže narušiť priebeh takéhoto vyučovania.

V poslednom okruhu otázok sme sa venovali motívom, ktoré vedú učiteľov k organizovaniu outdoorového vyučovania a tiež faktorom, prečo outdoorové vyučovanie nezaraďujú do vyučovania častejšie. *„Učenie prostredníctvom zážitkovej formy väčšinou vždy prinesie svoje ovocie vo forme nadšenia žiakov. Žiaci si následne lepšie pamätajú (lepšia a trvácnejšia fixácia), to všetko ma motivuje prichádzať s ďalšími formami zážitkového učenia (napr. aj vo forme outdoorového vyučovania).“* Iná učiteľka ako motivujúci faktor uviedla *„zmena prostredia môže vyvolať väčší záujem žiakov, aktívne pracujú, je to príjemná zmena oproti školským laviciam.“* Učiteľ poznamenal *„vo vzdelávaní niet nad praktickú ukážku.“* Učitelia sa vyjadrili aj k limitujúcim faktorom, ktoré ich často odrádzajú. *„Čas na prípravu outdoorového vyučovania je oveľa dlhší, ako keď si mám pripraviť klasickú vyučovaciu hodinu a zo žiadnej strany neprichádza podpora, či lepšie finančné ohodnotenie.“* *„Do outdoorového vyučovania sa snáď nikdy nepustí jeden učiteľ sám, vždy musí mať na dozore minimálne jedného ďalšieho kolegu v závislosti od počtu žiakov v skupine. To sa častokrát ale nepáči*

vedeniu. “ Jeden z dôvodov, prečo sa učitelia nepúšťajú do tejto formy vyučovania, je aj už spomínaná administratíva a tiež obava z nepredvídateľných okolností. Stručnú sumarizáciu výpovedí prinášame v tabuľke (Tab. 2.).

Tab. 2. Prehľad pozitív, negatív, motivujúcich a limitujúcich faktorov z pohľadu učiteľov

Pozitíva	Negatíva
• presun vyučovania mimo triedu • praktické ukážky • dlhodobejšie zapamätanie • ekologický rozmer • zapojenie viacerých zmyslov • uvoľnenejšia atmosféra • žiacka kooperácia	• administratíva • časová náročnosť prípravy aj realizácie • materiálne zabezpečenie • správanie žiakov • možnosť úrazov
Motivujúce faktory	Limitujúce faktory
• zážitkové učenie • nadšenie žiakov • aktívnejšia práca žiakov • názornosť	• čas na prípravu aj realizáciu • zabezpečenie pomocného dozoru • viac rušivých elementov pre žiakov • nepredvídateľnosť počasia

Výsledky realizovaného výskumu do veľkej miery zodpovedajú našim osobným predpokladom, ale tiež poznatkom autorov, ktorí sa touto tematikou zaoberali. Výskum realizovaný na švédskej strednej škole sa zameriaval na to, aké sú dlhodobé účinky vyučovania v prírode a aké sú postoje stredoškolákov k vyučovaniu vo vonkajšom prostredí oproti interiéru. Jedným z hlavných zistení bolo, že výučba vonku mala jasný vplyv na to, čo si žiaci pamätali o päť mesiacov neskôr. Žiaci vyučovaní v triede mali problémy zapamätať si, o čom vlastne vyučovacie hodiny boli. Pre mnohých z nich bol obsah toho, čo čítali a písali, rozptýlený. Žiaci zo skupiny učiacej sa vonku v prírode bohatšie opísali svoje zážitky počas vyučovania. Vonkajší kontext mal veľký vplyv na ich dlhodobú pamäť a jasne si zapamätali a integrovane diskutovali o činnostiach aj obsahu [4]. Podobne ako učitelia z nášho výskumu, aj iné výskumy upozornili na to, že outdoorové vyučovanie predstavuje pre učiteľa výzvu ohľadom organizácie takejto výučby, času a vzdialeného miesta realizácie [9]. Zhoda medzi názormi našich učiteľov a iných vedcov nastala aj v otázke lepšieho pochopenia sprístupňovaného učiva. Vyučovanie prírodných vied mimo triedy zlepšuje pochopenie teoretického vedeckého obsahu vyučovaného v triede. Žiaci však majú len zriedka možnosti ísť sa učiť von [10].

Záver

Outdoorové vyučovanie patrí preukázateľne k metódam vyučovania, ktoré vedú

k aktívnejšiemu zapojeniu žiakov; motivuje žiakov a vzbudzuje v nich záujem o prírodné vedy. Napriek náročným administratívnym procesom, časovej dotácii či zvýšeným rizikám úrazov si dotazovaní učitelia v plnej miere uvedomujú význam takejto formy vyučovania. Medzi hlavné pozitíva učitelia zaradili praktické ukážky, pobyt na čerstvom vzduchu, zapojenie viacerých zmyslov, zvýšenú aktivitu žiakov či lepšiu spoluprácu ako pri práci v triede.

Tiež skonštatovali, že pri komplexnej a premyslenej príprave môže byť takáto forma vyučovania naozaj plnohodnotnou náhradou, alebo alternatívou klasického vyučovania v triede, ako ho poznáme. Pre tých, ktorí outdoorové vyučovanie so žiakmi realizovali, ale aj pre všetkých pedagógov, ktorí nad takouto formou vyučovania uvažujú, je dobrou správou, že väčšina žiakov hodnotí outdoorové vyučovanie absolútne kladne a priklonili by sa k jeho častejšiemu realizovaniu.

PodĎakovanie

Chcela by som sa poďakovať učiteľom, ktorí pomohli prostredníctvom vyjadrenia svojich názorov a postrehov týkajúcich sa outdoorového vyučovania uchopiť problematiku aj z ich uhla pohľadu a ďakujem tiež za čas, ktorý nám venovali pri relatívne dlhých a detailných rozhovoroch.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Fägerstam E. (2014) J. Adventure Educ. Outdoor Learn. 14(1), p. 56
- [2] Waite S. (2011) Int. Online J. Prim. Educ. 39(1), p. 65.
- [3] Braund M., Reiss M. (2006) Int. J. Sci. Educ. 28(12), p. 1378
- [4] Fägerstam E., Blom J. (2012) J. Adventure Educ. Outdoor Learn. 13(1), p. 56
- [5] Smith D. (2004) J. Biol. Educ. 39(1), p. 6
- [6] Auer M. (2008) Int. Res. Geogr. Environ. Educ. 17(1), p. 6
- [7] Mears L. (2021) Zázračná planéta 6, p. 13
- [8] Miovský M. (2006) Československa Psychologie 51(1), p. 100
- [9] Forest K., Rayne S. (2009) J. Chem. Educ. 86(11), p. 1290
- [10] Höper J., Jegstad, K. M., Remmen K. B. (2022) Chem. Educ. Res. Pract. 23, p. 361

Identifikácia mylných predstáv žiakov o vybraných orgánových sústavách človeka prostredníctvom štvorúrovňového testu

Dominik Šmida, Elena Čipková

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra didaktiky prírodných vied, psychológie a pedagogiky, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; smida8@uniba.sk

Abstract

Identification of pupils' misconceptions in selected human organ systems using four-tier diagnostic test
In biology education, pupils should understand various biological processes and phenomena. However, if this process did not take place correctly, pupils can develop misconceptions, the subsequent elimination of which is quite difficult. For this reason, the aim of the research is to identify the occurrence of misconceptions among primary school pupils in topics related to the human digestive, respiratory, circulatory, and excretory systems using four-tier diagnostic test. The results showed that, on average, misconceptions occur among 22.5 % pupils, while they were most often identified in topics related to the human respiratory system and indicate a lack of understanding of the breathing and respirating process. In addition, a more detailed analysis of the pupils' answers showed the presence of other misconceptions associated with these systems, and therefore it is necessary to pay more attention to them in education process and thus eliminate the risk of their occurrence.

Keywords: *biology; four-tier diagnostic test; misconception; primary school pupils*

Úvod a formulácia cieľa

Už od detstva si vytvárame rôzne predstavy o svete a jeho fungovaní, ktoré sú často naivné a chýba im logika. Takéto predstavy sú ale u žiaka zvyčajne v priebehu vzdelávacieho procesu konfrontované s vedecky platnými vysvetleniami, čím dochádza k ich korekcii. Poznatky z biológie predstavujú komplexný celok a žiak musí hlbšie porozumieť rôznym abstraktným dejom [1], preto ak nedôjde ku konceptuálnej rekonštrukcii, vytvárajú sa u neho rôzne mylné predstavy (miskoncepce), ktoré vedú k dezinterpretácii vedeckých poznatkov [2]. Odstrániť už vytvorené mylné predstavy žiakov je pomerne náročné, a preto je nevyhnutné ich pravidelne diagnostikovať, aby sme im mohli v budúcnosti predchádzať a eliminovať tak riziko ich vzniku [3].

Z dôvodu časovej úspory pri administrovaní a vyhodnocovaní výskumných nástrojov sa na identifikáciu žiackych miskonceptí zvyčajne používajú rôzne testy [4]. Literatúra poskytuje pomerne široký diapazón rôznych typov testov, ktorých použitie je však sprevádzané určitými ťažkosťami. Jedným z nich sú testy s otvorenými úlohami, ktoré môžu znevýhodňovať žiakov so slabším písomným prejavom, sú časovo náročné a žiaci zvyčajne nie sú ochotní podrobnejšie rozpisovať svoje odpovede [5]. Ako vhodná alternatíva sa preto začali

používať jednoúrovňové testy s možnosťou výberu z viacerých odpovedí, avšak neskôr sa stali kritizované kvôli vysokej pravdepodobnosti uhádnutia správnej odpovede [4]. Spomínaný nedostatok mali odstrániť dvojúrovňové testy, kde si žiaci v prvej úrovni vyberajú správnu odpoveď na otázku a v druhej úrovni si vyberajú zdôvodnenie svojho rozhodnutia [6], čím sa výrazne redukuje možnosť uhádnúť odpoveď. Pri ich vyhodnocovaní však nevieme s istotou určiť, či žiaci disponujú miskoncepciou alebo len nedostatkom vedomostí o danej téme [2, 4, 6]. Z toho dôvodu sa pridala k dvojúrovňovému testu tretia úroveň, tzv. úroveň istoty, v ktorej žiaci vyjadrujú mieru vlastnej istoty s riešením celej položky, čím sa zvyšuje spoľahlivosť získaných výsledkov [4]. Napriek tomu pri vyhodnocovaní trojúrovňových testov nie je jasné, či žiaci disponujú rovnakou mierou istoty pri výbere odpovede v prvej a aj v druhej úrovni položky [3], pretože obe úrovne sa líšia z hľadiska nárokov na vedomosti žiakov [6]. To môže viesť až k nadhodnoteniu frekvencie mylných predstáv žiakov a ku skresleniu výsledkov [5]. Na odstránenie prípadnej nepresnosti bol preto vytvorený štvorúrovňový test, v rámci ktorého žiaci vyjadrujú nie len mieru istoty s výberom odpovede, ale aj s výberom vhodného zdôvodnenia [7], čím dokážeme zistiť, do akej hĺbky žiaci porozumeli jednotlivým konceptom [8]. Ak odpovedia na obe vedomostné úrovne správne, pričom sú si istí svojím výberom, rozumejú danému konceptu. Naopak, ak odpovedia na obe úrovne nesprávne, pričom sú si ale istí svojimi odpoveďami, disponujú miskoncepciou. V ostatných prípadoch sa jedná buď o nevedomosť, alebo o pozitívne či negatívne falošné miskoncepcie, ktoré vznikajú kvôli nepozornosti či hádaniu [5, 9]. Na základe literárneho prehľadu je preto cieľom predloženého výskumu identifikovať výskyt mylných predstáv žiakov základných škôl o tráviacej, dýchacej, obehovej a vylučovacej sústave človeka práve prostredníctvom štvorúrovňového testu.

Materiál a metódy

Na identifikáciu miskoncepcií žiakov sme použili štvorúrovňový test vlastnej konštrukcie, ktorý pozostával z 15 položiek zameraných na zistenie pochopenia funkcie a významu tráviacej (TS), dýchacej (DS), obehovej (OS) a vylučovacej sústavy (VS) človeka. Každá položka pozostávala zo štyroch úrovní – v prvej úrovni si žiaci mali vybrať správne tvrdenie spomedzi štyroch ponúknutých možností, v druhej úrovni pomocou štvorstupňovej Likertovej škály vyjadriť mieru istoty s označeným tvrdením, v tretej úrovni si mali vybrať správne zdôvodnenie spomedzi štyroch ponúknutých možností a v štvrtej úrovni opäť vyjadriť mieru istoty s označeným zdôvodnením.

Validitu testu sme stanovili expertným posúdením siedmimi odborníkmi v danej oblasti [9]. Reliabilitu testu sme určili prostredníctvom Cronbachovo alfa [6], pričom jeho hodnoty

pre položky merajúce úroveň vedomostí žiakov ($\alpha = 0,73$) a aj pre položky merajúce mieru istoty žiakov s výberom odpovede ($\alpha = 0,94$) preukázali, že test môžeme považovať za reliabilný výskumný nástroj [10].

Pri vyhodnocovaní položiek v teste sme za správne tvrdenie v prvej úrovni udelili žiakom 1 bod a za správne zdôvodnenie v tretej úrovni rovnako 1 bod (max. 30 bodov v celom teste). Mieru istoty sme vyhodnocovali pomocou tzv. škály sebaistoty, čiže ak žiak označil, že si je výberom danej možnosti úplne alebo skôr istý, považovali sme to za dôkaz sebavedomého výberu a naopak, ak žiak označil, že si je danou možnosťou skôr neistý alebo úplne neistý, považovali sme to za nesebavedomý výber [11]. Následne sme získané výsledky podrobili kvantitatívnej analýze spočívajúcej v stanovení základných opisných charakteristík testu (priemer, medián, modus, smerodajná odchýlka a pod.). Shapiro-Wilkov test preukázal, že dáta nie sú normálne rozložené ($p < 0.05$), a preto sme na zisťovanie štatisticky významnej závislosti medzi vybranými položkami použili Spearmanov korelačný koeficient. Pri jednotlivých položkách sme zároveň vypočítali index obtiažnosti a citlivosti (ULI).

Charakteristika výskumného súboru:

Výskumu sa zúčastnilo 105 žiakov (57,1 % chlapcov; 42,9 % dievčat) 8. ročníka štyroch základných škôl situovaných v rôznych oblastiach Slovenska. Priemerná známka participantov na poslednom vysvedčení z biológie predstavovala hodnotu 1,42.

Výsledky a diskusia

Žiaci dosiahli v štvorúrovňovom teste priemerné skóre 14,1 bodov ($SD = 5,1$), čo predstavuje 47,0 % (Tab. 1.). Priemerná hodnota indexu citlivosti položiek bola 0,5 a priemerná hodnota indexu obtiažnosti 35,2 %, čo naznačuje, že test bol pre žiakov pomerne náročný. Nižšia hodnota indexu obtiažnosti je však pochopiteľná, pretože tieto testy hlbkovo diagnostikujú žiacke porozumenie vedeckých konceptov, čím je pre nich zložitejšie odpovedať na jednotlivé položky [12].

Tab. 1. Základná opisná charakteristika štvorúrovňového testu

Počet žiakov N	Aritmetický priemer $\bar{x}$	Medián	Modus	Rozptyl	Variačný koeficient
105	14,1	14	12	26,0	36,2 %
Štandardná odchýlka	Variačné rozpätie	Maximum	Minimum	Štandardná šikmosť	Štandardná špicatosť
5,1	21	25	4	0,7	- 1,5

Detailnejšia analýza položiek preukázala, že správne vedecké koncepty o tráviacej,

dýchacej, obehovej a vylučovacej sústave si v priemere osvojilo 29,4 % žiakov. Nevedomosť sa prejavila v priemere u 37,8 % žiakov a falošne pozitívne či negatívne miskoncepce zapríčinené tipovaním alebo nepozornosťou [5] sa objavili u 10,3 % žiakov. Miskoncepce boli v priemere diagnostikované u 22,5 % žiakov, pričom najčastejšie nimi žiaci disponovali v témach spojených s dýchacou sústavou (Tab. 2.).

Tab. 2. Analýza odpovedí žiakov na jednotlivé položky testu

(číslo položky) zameranie položky		osvojenie si konceptu [%]	falošne pozitívna miskonceptia [%]	falošne negatívna miskonceptia [%]	nevedomosť [%]	miskonceptia [%]
T S	(1) trávenie potravy	57,1	8,6	1,0	25,7	7,6
	(2) získavanie energie	6,7	6,7	3,8	52,3	30,5
	(3) žlč	1,0	14,3	1,0	48,5	35,2
	(4) vstrebávanie živín	24,8	11,3	4,8	52,4	6,7
	priemerný počet [%]	22,4	10,2	2,7	44,7	20,0
D S	(5) proces dýchania	2,9	1,0	1,9	38,0	56,2
	(6) vdychovaný vzduch	54,2	2,9	1,9	22,9	18,1
	(10) vydychovaný vzduch	15,2	5,7	0,0	41,0	38,1
	(7) dýchacie plyny - CO ₂	1,9	2,9	2,9	55,2	37,1
	(8) dýchacie plyny - O ₂	23,8	17,1	2,9	50,5	5,7
	priemerný počet [%]	19,6	5,9	1,9	41,5	31,0
O S	(9) funkcia srdca	62,9	5,7	7,6	18,1	5,7
	(11) žily a tepny	23,7	1,0	1,0	42,9	31,4
	(12) krv	36,2	5,7	1,9	29,5	26,7
	(13) prepojenie s DS	25,7	15,3	5,7	40,0	13,3
	priemerný počet [%]	37,1	6,9	4,1	32,6	19,3
V S	(14) vylučovanie	64,6	2,9	6,7	22,9	2,9
	(15) obličky	41,0	2,9	7,5	26,7	21,9
	priemerný počet [%]	52,8	2,9	7,1	24,8	12,4
Kritériá podľa Prayitno a Hidayati [9] ^a :		S-I-S-I	S-I-N-I	N-I-S-I	S-I-S-P/S-P-S-I/S-P-S-P/ S-I-N-P/S-P-N-I/S-P-N-P/N-I-S-P/N-P-S-I/N-P-S-P/ N-I-N-P/N-P-N-I/N-P-N-P	N-I-N-I

^a S = správna odpoveď, N = nesprávna odpoveď, I = s odpoveďou som si istý/-á, P = pri odpovedi mám pochybnosti. Kritériá sú uvedené v poradí jednotlivých úrovní v teste.

Najvyšší výskyt miskonceptí žiakov (56,2 %) sme zaznamenali v položke 5 dopytujúcej sa na proces dýchania (Tab. 2.). Žiaci najčastejšie uvádzali, že pri tomto procese dochádza k premene dýchacích plynov, pretože sa kyslík v pľúcach zmení na oxid uhličitý, ktorý je následne vydychovaný. Táto mylná predstava je u žiakov pomerne silno zakorenená, čo potvrdzuje aj ďalšia miskonceptia identifikovaná v položke 7. Žiaci si častokrát myslia, že oxid uhličitý sa v ľudskej krvi vôbec nenachádza, pretože pri dýchaní je nevyhnutná len prítomnosť kyslíka, ktorý je v pľúcach nahradený oxidom uhličitým. Medzi miskonceptami

v položke 5 a 7 navyše Spearmanov korelačný koeficient preukázal slabú štatisticky významnú koreláciu ($r_s = 0,28$; $p < 0,05$), čo naznačuje, že žiaci majú pomerne značné nedostatky týkajúce sa komplexnejšieho pochopenia procesu dýchania. Toto tvrdenie podporuje aj identifikovaná miskoncepcia v položke 10, že vo vydychovanom vzduchu sa nachádza iba oxid uhličitý, pretože pri dýchaní sa spotrebuje všetok kyslík, avšak Spearmanov korelačný koeficient nepotvrdil štatisticky významnú koreláciu medzi položkami 5 a 10 ($r_s = 0,2$; $p > 0,05$) či položkami 7 a 10 ($r_s = 0,2$; $p > 0,05$). Výskyt obdobných miskoncepcií však rovnako potvrdzujú aj iné výskumy realizované v tejto oblasti [napr. 1, 13].

V rámci tráviacej sústavy sme najvyšší počet miskoncepcií u žiakov (35,2 %) identifikovali v položke 3, v ktorej žiaci uvádzali, že žlč je produkovaná žľezou. Túto miskoncepciu identifikoval aj Dry [14]. Pri obehovej sústave sa najviac miskoncepcií vyskytovalo pri položke 11 (31,4 %), pretože žiaci nesprávne uvádzali, že žily a tepny nie sú nijako prepojené. Manokore [15] zistil, že žiaci si zvyčajne túto mylnú predstavu odôvodňujú tým, že by pri ich vzájomnom prepojení došlo k zmiešaniu okysličenej a odkysličenej krvi, čo však v našom prípade bolo až druhé najčastejšie označované zdôvodnenie. Žiaci sa skôr prikláňali k tomu, že žily a tepny nemôžu byť vzájomne prepojené, pretože v nich prúdi čistá a znečistená krv. Podľa Deshmukh [16] by však žiaci ani učitelia pre okysličenú a odkysličenú krv nemali takéto pojmy používať, pretože to môže viesť k nesprávnej predstave o samotnom zložení krvi.

Pri vylučovacej sústave sme najvyšší počet miskoncepcií žiakov zaznamenali v položke 15 (21,9 %), pretože žiaci nesprávne označovali filtrovanie moču ako primárnu funkciu obličiek. Obdobnú miskoncepciu žiakov potvrdil aj Dry [14], čo naznačuje, že žiaci nesprávne chápu samotnú podstatu funkcie obličiek.

Záver

Jedným z primárnych cieľov vzdelávania v oblasti prírodných vied je viesť žiakov k osvojovaniu si rôznych vedeckých konceptov, ktoré im umožnia porozumieť prírode a svetu okolo nás. Nie vždy je však tento proces úspešný a u žiakov vznikajú rôzne mylné predstavy, ktoré môžu viesť až k dezinterpretácii vedeckých poznatkov. Výsledky nášho výskumu poukazujú na pomerne vysoký výskyt miskoncepcií žiakov základných škôl spojených s tráviacou, dýchacou, vylučovacou či obehovou sústavou človeka. Ukazuje sa, že mnohí žiaci majú problém najmä s komplexnejším porozumením procesu dýchania a limitujú ho len na úroveň výmeny alebo premeny dýchacích plynov odohrávajúcich sa v pľúcach. Pri tráviacej sústave dominuje miskoncepcia o žlči, ktorá sa podľa žiakov nevytvára v pečeni, ale v žľezách.

Pri obehovej sústave sa zase ukazuje, že žiaci okysličenú a odkysličenú krv v žilách a tepnách mylne považujú za čistú a znečistenú, čo môže viesť až k nesprávnej predstave o samotnom zložení krvi. Pri vylučovacej sústave žiaci disponujú častou mylnou predstavou, že obličky filtrujú moč, čo vedie k predpokladu, že nesprávne chápu proces filtrácie krvi v obličkách. Je však potrebné uviesť, že výskum bol realizovaný na pomerne malom výskumnom súbore žiakov, preto jeho výsledky nie je možné zovšeobecniť na celú populáciu. Identifikované miskoncepcie však môžu poslúžiť ako východisko pre návrhy rôznych učebných stratégií, ktoré sa budú cielene zameriavať na predchádzanie ich vzniku, čím môžeme v budúcnosti eliminovať ich výskyt u žiakov nižšieho sekundárneho vzdelávania.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Čolláková D., Čipková E., Haláková Z. (2021) BICHEZ 30(1), p. 15
- [2] Nagy T., Vincurská I. (2017) BECH 21(4), p. 36
- [3] Kaniawati I., Fratiwi N. J., Danawan A., et al. (2019) J. Turk. Sci. Educ. 16(1), p. 110
- [4] Milenković D. D., Hrin N. T., Segedinac D. M., et al. (2016) J. Chem. Educ. 93, p. 1514
- [5] Gurel D. K., Eryilmaz A., McDermott C. L. (2015) Eurasia J. Math. Sci. & Tech. Ed. 11(5), p. 989
- [6] Caleon S. I., Subramaniam R. (2010) Res. Sci. Educ. 40, p. 313
- [7] Kurniawati M. D., Ermawati U. F. (2020) J. Phys.: Conf. Ser. 1491, p. 1
- [8] Tumanggor R. M. A., Supahar, Ringo S. E., et al. (2020) J. Ilmu. Pend. 9(1), p. 21
- [9] Prayitno A. T., Hidayati N. (2022) Int. J. Educ. Res. 3(1), p. 1
- [10] Heale R., Twycross A. (2015) Evid. Based Nurs. 18(3), p. 66
- [11] Diani R., Alfin J., Anggraeni M. Y., et al. (2019) J. Phys.: Conf. Ser. 1155, p. 1
- [12] Putica B. K. (2022) Res. Sci. Educ., p. 1
- [13] Mann M., Treagust F. D. (1998) Aust. Sci. Teach. J. 44(2), p. 55
- [14] Dry A. H. (1998) Student misconceptions in science: the human digestive system. (Diplomová práca) State University of New York
- [15] Manokore V. (2014) J. Educ. Soc. Behav. Sci. 3(7), p. 186
- [16] Deshmukh D. N. (2015) Why Do School Students Have Misconceptions About Life Processes? In: Gnanamalar E., Daniel S. (eds.) Biology Education and Research in a Changing Planet. Springer, Singapur, p. 31

Pochopenie bunkových základov dedičnosti žiakmi gymnázií

Hilda Vaněková, Elena Čipková

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra didaktiky prírodných vied, psychológie a pedagogiky, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; vanekova33@uniba.sk

Abstract

High school students' understanding of the cellular foundations of the inheritance

This study focuses on the high school students' understanding of the cellular foundations of the inheritance. The aim of the study was to identify the depth of students' understanding of the concepts of the cellular inheritance, just as to identify any acquired alternative beliefs based on an inefficient understanding or clearness of the taught curriculum. These alternative beliefs are significantly resistible against any other pedagogical influence and thus may alternate during the whole life, inhibiting any acquiring of other knowledge. To reach our aim we constructed a two-tier test consisting of ten items, focusing on the conceptual understanding of the chosen topic. Based on the collected data, our results propone, that high school students have issues with explaining some genetic concepts. The most of the acquired concepts are fixed on the level of rote learning, which cause misconceptions that are contradictory to any scientific knowledge.

Keywords: *genetics; misconception; cell; inheritance; DNA; gene; allele; chromosome; trait*

Úvod a formulácia cieľa

Genetika predstavuje pomerne mladú, ale dynamicky sa rozvíjajúcu vednú disciplínu, ktorá zasahuje prakticky do všetkých oblastí nášho každodenného života. Jej nesmierny význam sa premietol aj do zavedenia pojmu genetická gramotnosť, ktorá predstavuje istý rozsah vedomostí o genetických fenoménoch a princípoch [1 – 4]. Geneticky gramotný jedinec by mal rozumieť základným pojmom a princípom genetiky, princípom ľudskej variability a diverzity [5], interakciám a vzťahom medzi jednotlivými génmi, ako aj vzťahu medzi jedincami a prostredím tak, aby sa dokázal kriticky zamýšľať nad rôznymi súčasnými výzvami a dilemami súvisiacimi s genetikou [6, 7]. Geneticky gramotný jedinec by mal mať povedomie o využívaní poznatkov genetiky [8], mal by sa zúčastňovať na spoločenských úvahách o genetických otázkach a robiť informované rozhodnutia v situáciách, ktoré súvisia s genetikou [6, 9].

Zahraničné štúdie [7, 10 – 12] poukazujú na nízku úroveň genetickej gramotnosti respondentov, ktorá nie je dostatočná pre súčasné potreby a výzvy.

Výsledky výskumov [13 – 15] naznačujú, že žiaci už na jednotlivých stupňoch vzdelávania majú problémy s porozumením kľúčových konceptov genetiky, nakoľko ich pochopenie od žiakov vyžaduje značné abstraktné myslenie a hypoteticko-deduktívne uvažovanie [16, 17]. Správne porozumenie genetických konceptov ovplyvňuje nie len

kognitívny vývin jedinca, ale aj vyučovacie metódy a prístupy, ktoré by mali rozvíjať u žiakov schopnosť uvažovať a zároveň ich podnecovať k zmysluplnému učeniu [18, 13]. Na druhej strane, rýchle napredovanie genetiky so sebou nesie aj zvyšujúcu sa potrebu zaradiť do vyučovania nové pojmy a rozšíriť ho o niektoré aktuálne riešené (celosvetové) problémy [2, 4]. Otázne je, či takéto rozširovanie učiva je postačujúce alebo či je potrebná zásadná obnova a reštrukturalizácia časti kurikula z genetiky [19]. Cieľom predloženého výskumu je preto zistiť hĺbku pochopenia bunkových základov dedičnosti žiakmi gymnázia, ako aj identifikovať alternatívne predstavy získané v dôsledku ich nedostatočného porozumenia. Tieto alternatívne predstavy sú značne rezistentné voči ďalšiemu pedagogickému pôsobeniu, môžu preto pretrvávajúť po zvyšok života jednotlivca a brániť tak ďalšiemu učeniu sa žiakov.

Materiál a metódy

Predstavy žiakov o bunkových základoch dedičnosti sme zisťovali prostredníctvom dvojúrovňového didaktického testu vlastnej konštrukcie, ktorý okrem zisťovania úrovne vedomostí žiakov, umožňuje aj hlbšie preniknúť do predstáv žiakov o skúmanom učive [20].

Obsah testu neprekračoval učivo stanovené v obsahovom štandarde inovovaného Štátneho vzdelávacieho programu [21]. Obsahovú validitu testu sme stanovili expertným posúdením tromi expertami z oblasti didaktiky biológie. Reliabilitu testu sme určili prostredníctvom Cronbachovho koeficientu alfa, ktorý dosiahol hodnotu 0,73. Výskumný nástroj teda možno považovať za reliabilný.

Test pozostával z desiatich položiek, pričom každá položka bola zostavená z dvoch úrovní. V prvej úrovni žiaci vyberali jedno správne tvrdenie, ktoré následne v druhej úrovni položky museli zdôvodniť. V prvej úrovni položky mali žiaci na výber z piatich ponúknutých možností. V druhej úrovni sme využili polouzavreté položky. Žiaci mohli svoje zdôvodnenie odpovede vybrať zo štyroch ponúknutých tvrdení alebo v poslednej možnosti mohli vyjadriť vlastné predstavy. Za správne tvrdenie v prvej úrovni mohli žiaci získať 1 bod a za správne zdôvodnenie v druhej úrovni rovnako 1 bod (max. 20 bodov v celom teste).

Dvojúrovňový test vlastnej konštrukcie bol administrovaný 125 žiakom gymnázií, ktorým už bolo sprístupnené učivo z genetiky. Celkovo sa výskumu zúčastnilo 70 dievčat, 49 chlapcov a 6 pohlavne neidentifikovaných respondentov. Test bol anonymný a jeho administrácia medzi žiakov nebola časovo limitovaná. Žiaci boli upozornení, že test nie je klasifikovaný známku, aby sme ich odbremenili od prípadného stresu.

Výsledky a diskusia

V rámci administrovaného testu mohli žiaci získať 20 bodov. Na základe deskriptívnej štatistiky (Tab. 1.) môžeme konštatovať, že celkovo percentuálna úspešnosť testu bola 58,6%. Priemerný počet získaných bodov bol 11,7. Zistená priemerná hodnota obtiažnosti predstavuje 58,56% a priemerná hodnota citlivosti 0,55.

Tab. 1. Deskriptívna štatistika údajov získaných z dvojúrovňového testu

Počet respondentov	Priemer	Medián	Modus	Št. odchýlka	Koeficient rozptylu
125	11,7	12	15	4,06	34,6%
Minimum	Maximum	Rozpätie	Št. šikmost'	Št. špicatosť	Úspešnosť
3	20	17	-0,551	-2,398	58,6%

Najúspešnejšou položkou testu bola položka 2 (Tab. 2.) s úspešnosťou až 87,2%, v rámci ktorej 101 žiakov z celkového počtu 125 správne označilo, že počet chromozómov je druhovo špecifický a počas života sa nemení. Na druhej strane, najobťažnejšou položkou testu s úspešnosťou iba 34% (Tab. 2.), bola položka 5 zameraná na vysvetlenie procesu mitózy. Až 40 žiakov má miskoncepciu, že mitóza je priame delenie, pretože sa jadro priamo rozdelí na dve polovice. Otázkou rozdielu priameho a nepriameho delenia sa venovali aj obdobné výskumy, ktoré tiež identifikovali predstavu žiakov, že mitóza je priame delenie. Svoju odpoveď ale zdôvodňovali tým, že dcérske bunky sú identické s materskou [22, 23].

Nízku úspešnosť (37,2%) dosiahli žiaci aj v položke 3 zameranej na alely génov. Až 60 žiakov síce označilo správne tvrdenie, že alela je jedna z viacerých foriem génu, avšak svoje tvrdenie nedokázali správne prepojiť s odôvodnením, že alely súvisia s fenotypovým prejavom. Žiaci majú totiž častokrát problém so správnym porozumením a prepojením pojmov genotyp, fenotyp, alela a znak, pričom sa podľa dostupných výskumov často objavujú aj miskoncepcie ako alela je iné pomenovanie pre znak alebo že alela je miesto na molekule DNA, kde sa nachádza gén, či fenotyp je súbor všetkých znakov bunky [15, 22]. Medzi ďalšie identifikované miskoncepcie patrí aj predstava, že jeden gén predstavuje jeden chromozóm a jeden chromozóm predstavuje jeden znak alebo že jeden gén tvorí úsek niekoľkých alel [15].

Úspešnosť len 41,6% (Tab. 2.) žiaci dosiahli v položke 4, v ktorej, paradoxne, 57 žiakov správne zvolilo odôvodnenie, že genotyp sa prejavuje vo forme fenotypu, avšak v prvej úrovni až 33 žiakov zvolilo nesprávnu možnosť, že genotyp je označenie pre skupinu génov. Žiaci majú častokrát problém rozlíšiť tieto pojmy, pričom následne vznikajú miskoncepcie ako

napríklad, že genotyp je označenie pre konkrétny gén, ktorý vedie k vyvolaniu fenotypu alebo že genotyp je celkový genetický materiál bunky a fenotyp je súbor všetkých znakov v bunke [22, 24].

Tab. 2. Kľúčové koncepty jednotlivých položiek a ich úspešnosť

Položka	Kľúčový koncept	Úspešnosť	Položka	Kľúčový koncept	Úspešnosť
1	štruktúra DNA	68,0%	6	mutácie	65,2%
2	počet chromozómov	87,2%	7	genetická informácia	54,4%
3	alela	37,2%	8	pohlavné chromozómy	68,0%
4	genotyp	41,6%	9	poradie nukleotidov	62,4%
5	mitóza	34,0%	10	S fáza bunkového cyklu	67,6%

Žiaci majú tiež problém s pochopením rozdielu medzi gonozómami a autozómami, ktoré často nerozlišujú [15]. V položke 8 nášho testu sme sa aj my venovali dedičnosti pohlavných chromozómov, pri ktorej žiaci dosiahli úspešnosť 68%. 86 žiakov zo 125 označilo správne tvrdenie v prvej úrovni položky a iba 4 z týchto žiakov odôvodnili svoje tvrdenie nesprávne. Nesprávne pochopenie žiakov bolo identifikované aj pri hierarchickom usporiadaní DNA [15]. Na rozdiel od týchto zistení, v položke 1 zameranej na hierarchické usporiadanie DNA sme zaznamenali úspešnosť 68%, pričom z 86 žiakov, ktorí určili správnu hierarchickú postupnosť z ponúknutých možností, až 25 žiakov zvolilo nesprávne odôvodnenie svojej odpovede. Podľa výskumu Vlčkovej et al. [15] žiaci vedia definovať jednotlivé pojmy z genetiky, ale majú problém vysvetliť ich funkciu a dôležitosť. K obdobným výsledkom sme dospeli aj v rámci nášho výskumu.

Záver

Pochopenie jednotlivých konceptov a postupov v genetike vyžaduje hypoteticko-deduktívne uvažovanie a viacúrovňové myslenie na úrovni makroskopickej (úroveň organizmov), mikroskopickej (úroveň bunky), molekulovej (biochemická úroveň) a symbolickej (reprezentačná úroveň) [25, 26], preto je pre žiakov mimoriadne náročné. Na základe výberu jednotlivých tvrdení a následne ich zdôvodnení žiakmi môžeme konštatovať, že žiaci zapojení do výskumu mnohým konceptom nerozumejú a nedokážu s nimi operovať na viacerých úrovniach. Častokrát je pochopenie genetických pojmov len na úrovni pamäťového učenia, čím sa u žiakov vytvárajú miskoncepce, ktoré odporujú vedeckému poznaniu. Na

základe získaných výsledkov môžeme teda konštatovať, že ak žiaci zapojení do výskumu správne označili jednotlivé pojmy a tvrdenia, nedokázali ich v dostatočnej miere vysvetliť. Je preto potrebné u žiakov rozvíjať viacúrovňové myslenie tak, aby dokázali jednotlivé koncepty spájať do zmysluplných celkov a využívať ich pri riešení problémov spojených s každodenným životom. Podľa Bowling et al. [6] a Hott et al. [27] je porozumenie genetiky dôležité, nakoľko umožňuje robiť informované rozhodnutia v súčasne preberaných genetických otázkach, ako napríklad génové testovanie, geneticky modifikované potraviny a pod. [28].

Zoznam použitej literatúry

- [1] Ashida S., Goodman M., Pandya C., et al. (2011) Public health genomi, 14(4-5), p. 307
- [2] Institute of Medicine. (1994) Assessing Genetic Risks: Implications for Health and Social Policy. Washington, DC: The National Academies Press, p. 352
- [3] Kaye C., Korf B. (2013) Pediatrics, 132(3), p. 224
- [4] McInerney J. D. (2002) J. Med. Philos. 27(3), p. 369
- [5] Oliveri S., Mainetti R., Gorini A., et al. (2018) JMIR Research Protocols. 2018; 7(12), p. 14
- [6] Bowling B. V., Acra E. E., Wang L., et al. (2008) Genetics, 178(1), p. 15
- [7] Cebesoy Ü., Tekkaya C. (2012) Procedia Soc. Behv. 31, p. 56
- [8] Duncan R. G., Rogat A. D., Yarden A. (2009) J. Res. Sci. Teach, 46, p. 655
- [9] Kampourakis K., Reydon T. A., Patrinos G. P., et al. (2014) Sci. Ed. 23, p. 251
- [10] Gallop L. Chapman R., Selita F., et al. (2017) Eur. Proc. Soc. Behav. 33(13), p. 121
- [11] Chapman R., Likhanov M., Selita F., et al. (2019) J. Community Genet. 10, p. 73
- [12] Swandayani Y. M., Cayami F. K., Winarni T. I., et al. (2021) BMC Med. Educ. 21(524) p. 10
- [13] Kılıç D., Sağlam N. (2014) J. Biol. Educ, 48(2), p. 63
- [14] Oztas H., Oztas F. (2016) JIEP. 7(30), p. 128
- [15] Vlčková J., Kubiato M., Usak M. (2016) J. Balt. Sci. Educ. 15(6), p. 738
- [16] Baker W. P., Lawson A. E. (2001) Sci. Edu. 85(6), p. 665
- [17] Knippels M. C. P., Waarlo A. J., Boersma K. T. (2005) J. Biol. Educ. 39(3), p. 108
- [18] Banet E., Ayuso E. (2000) Sci. Edu. 84(3), p. 313
- [19] Boerwinkel D. J., Yarden A., Waarlo A. J. (2017) Sci. Educ-Netherlands. 26, p. 1087
- [20] Čipková E., Danišková M. (2009) Technology of Education. 12(1), p. 14
- [21] Inovovaný Štátny vzdelávací program pre gymnáziá v slovenskej republike (2015)

Biológia – gymnázium so štvorročným a päťročným vzdelávacím programom. Štátny pedagogický ústav. p. 12

- [22] Kleinová L. (2021) Genetická gramotnosť žiakov gymnázií. (Diplomová práca) Univerzita Komenského v Bratislave
- [23] Osman E., BouJaoude S., Hamdan H. (2017) Int. J. Sci. Math. Educ. 15, p. 1257
- [24] Browning M. E., Lehman J. D. (1988) J. Res. Sci. Teach. 25(9), p. 747
- [25] Johnstone A. H. (1991) J. Comput. Assist. Lear. 7(2), p. 75
- [26] Kapteijn M. (1990) The functions of organizational levels in biology for describing and planning biology education. In: Lijnse, P. L., Licht, P., de Vos, W., et al. (ed.) Relating macroscopic phenomena to microscopic particles. CD- β Press, Utrecht, p. 139
- [27] Hott A. M., Huether C. A., McInerney J. D., et al. (2002) BioScience. 52(11), p. 1024
- [28] Freidenreich H. B., Duncan R. G., Shea N. (2011) Int. J. Sci. Ed. 33(17), p. 2323

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA**



**eŠVK
PRIF UK
2023**

ENVIRONMENTALISTIKA

**ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2023
ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV**

Organický uhlík v pôde a jeho odozva na antropogénny zásah

Monika Balogová

*Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra pedológie, Ilkovičova 6, 842 15
Bratislava, Slovenská republika; benkova68@uniba.sk*

Abstract

Soil organic carbon and its response to anthropogenic intervention

According to the amount of soil carbon we can deduce the soil quality. The subject of the study was monitoring of soil organic carbon near to the former Šobov quarry, where the surrounding soil environment is affected by acidification ($\text{pH H}_2\text{O} = 3,1 - 4,9$). There is an unprotected pile of waste material, from under which an acid mine drainage pours out and it is further released into the environment by precipitation. Different areas are formed on the bow under the heap: Š1 - erosion, without vegetation cover, Š2 - presence of acidophilic plant species and Š3 – area with full vegetation. We monitored all these negative factors on the mentioned areas during the growing season of spring, summer and autumn. The amount of carbon increased in the direction Š1, Š2 and Š3. The amount of carbon during the growing season increased in the direction from spring, summer and to autumn. Acidification of the environment and associated degradation factors had a significant impact on the soil environment, which was also confirmed in our measurements.

Keywords: *soil organic carbon; biological activity; acidification; soil degradation*

Úvod a formulácia cieľa

Kolobeh uhlíka patrí medzi najdôležitejší cyklus látok v ekosystéme Zeme. Za najväčšiu zásobáreň uhlíka je považované pôdne prostredie, kde je uhlík viazaný v telách pôdných mikroorganizmov. Pôdne mikroorganizmy sú súčasťou pôdnej mikrobiálnej biomasy (PMB), ktorá sa vyznačuje výraznou citlivosťou na meniace sa ekologické podmienky životného prostredia, čím je schopná sa pomerne rýchlo prispôsobiť či už pozitívnym alebo negatívnym prejavom prostredia [1]. V dnešnej dobe pôsobí vo veľkom rozsahu na kolobeh uhlíka ľudská činnosť a to v negatívnom zmysle. Máme na mysli využívanie pôdy na poľnohospodárstvo, priemysel, banská činnosť, doprava a mnoho ďalších [2]. Takéto antropogénne zásahy majú za následok znižovanie kvality a úrodnosti pôdy, čo sa prejavuje aj úbytkom množstva organického uhlíka v PMB. Preto výpočet množstva organického uhlíka v PMB je vhodným nástrojom pri monitorovaní pôdy z hľadiska jej kvality [3].

Lokalita Šobov (Banská Štiavnica) je známa svojou banskou činnosťou, kde v minulosti prebiehala ťažba sekundárneho kremenca. Výsledkom je na kopci nechránená halda nahromadeného pyritizovaného materiálu a potenciálne toxických prvkov. V dôsledku toho je v okolítom pôdnom prostredí výrazná acidifikácia ($\text{pH H}_2\text{O} = 3,1 - 4,9$, ultra až veľmi silne kyslá). Acidifikácia pôdy je spôsobená kyslou banskou vodou vytekajúcou spod haldy vplyvom zrážkovej činnosti, čím sa rozlieva ďalej do okolitého prostredia aj do niekoľkých

kilometrov. Rozlievanie kyslej banskej vody podmieňuje vznik erózie, degradáciu pôdy, vznik plôch bez vegetačného krytu, čím dochádza ku znižovaniu úrodnosti pôdy [4].

Predmetom skúmania bolo sledovanie obsahu pôdneho organického uhlíka PMB, v priebehu vegetačného obdobia (jar, leto, jeseň) v kambizemi kultizemnej a jej varietach na lúke pod haldou lomu Šobov, kde sme sa zamerali na tri plochy s rôznym stupňom degradácie a rôznym vegetačným krytom [5].

Materiál a metódy

Lokalita Šobov sa nachádza severne 1 km od Banskej Štiavnice. Vzorky pôdy sme odoberali z lúky pod haldou z pôdneho A-horizontu z hĺbky 0 – 15 cm. Odbery sa konali počas vegetačného obdobia - na jar (apríl), v lete (júl) a na jeseň (október). Odobrané pôdne vzorky sme v laboratóriu preosiali cez sito a vyčistili od organických zvyškov.

Množstvo organického uhlíka pôdnej mikrobiálnej biomasy (C_{mic}) sme stanovili fumigačno-extrakčnou metódou [6]. Preosiate pôdne vzorky sme najskôr podrobili fumigácii parami chloroformu. Ako kontrola slúžili vzorky neošetrované parami chloroformu. Následne sa všetky vzorky extrahovali síranom draselným. Po premiešaní a prefiltrovaní sme pridali do každej vzorky chrómsírovú zmes a takýto extrakt sme dali spaľovať. Obsah uhlíka sme následne stanovili titráciou Mohrovou soľou.

Výsledky a diskusia

Pôdnym typom na skúmanej lokalite (Obr. 1) je kambizem s rôznymi varietami podľa plochy odberu (Obr. 2). Tri plochy odberu sú od seba vzdialené približne 10 metrov. Plocha Š1 ($pH\ H_2O = 3,12$ extrémne kyslá) je kambizem kultizemná var. kontaminovaná forma erodovaná, bez vegetácie s vysokým stupňom erózie. Na ploche Š2 ($pH\ H_2O = 3,8$ ultra kyslá) je kambizem kultizemná var. kontaminovaná, ktorá je porastená acidofilnými druhmi rastlín. Na ploche Š3 ($pH\ H_2O = 4,9$ veľmi silne kyslá) je kambizem kultizemná var. nasýtená, acidifikáciou najmenej zasiahnutá plocha s plným vegetačným krytom [7].

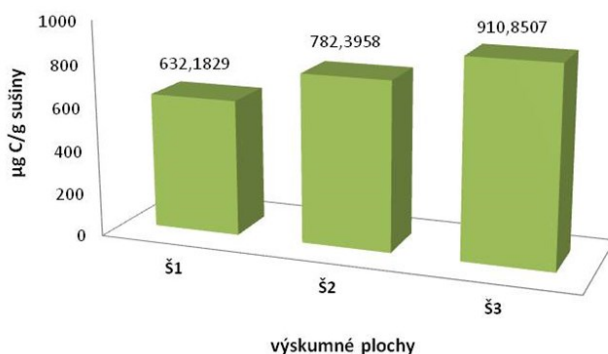


Obr. 1. Lokalita Šobov - halda, záchytný bazén a tri plochy odberu [5]



Obr. 2. Plochy odberu Š1, Š2 a Š3

Hodnoty organického uhlíka PMB (C_{mic}) sme zisťovali v roku 2022 počas celého vegetačného obdobia. Priemerné hodnoty za celé obdobie sa zvyšovali v smere $\text{Š1} < \text{Š2} < \text{Š3}$ (Obr. 3). Plocha Š1 je značne ovplyvnená vytekaním kyslej banskej vody, ktorá spôsobila vznik erózie, následnú degradáciu pôdy, čo viedlo ku vzniku plochy bez vegetácie. Ani tie najodolnejšie druhy rastlín neboli schopné sa uchytiť v takýchto podmienkach. Tieto aspekty majú dopad na obsah a aktivitu PMB, aj hodnoty C_{mic} na ploche Š1 boli preto najnižšie $632,1829 \mu\text{g C/g}$ sušiny. O niečo vyššiu hodnotu sme zaznamenali na ploche Š2 = $782,3958 \mu\text{g C/g}$ sušiny, kde sú prítomné acidofilné druhy rastlín, ktoré sú schopné odolávať zvýšenej acidifikácii pôdného prostredia. Vďaka prítomnosti rastlín sa do pôdy dostáva väčšie množstvo živín potrebné pre aktivitu mikroorganizmov, čím sa zvýšila aj hodnota organického uhlíka. Najvyššia hodnota C_{mic} bola na ploche Š3 = $910,8507 \mu\text{g C/g}$ sušiny, ktorá je najmenej z výskumných plôch ovplyvnená acidifikáciou. Plocha má plný vegetačný kryt s pestrým lúčnym porastom, čo sa odrazilo aj na hodnote organického uhlíka.



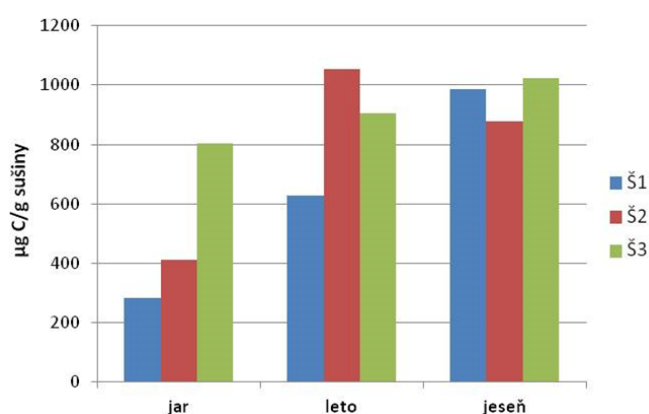
Obr. 3. Priemerné hodnoty uhlíka PMB - celé vegetačné obdobie

Hodnoty organického uhlíka PMB uvádzajú schopnosť pôdy viazať živiny a transformovať organickú hmotu. Jeho pokles môže signalizovať nevhodné podmienky v pôde, čo značí zníženú kvalitu pôdy. Je všeobecné pravidlo, že čím je vyšší obsah PMB, tým

je kvalita pôdy lepšia [8]. Tento trend sa potvrdil aj na našich skúmaných plochách a vzorkách.

Okrem priemerných hodnôt uhlíka sme sa zamerali aj na jednotlivé ročné obdobia jar, leto a jeseň a porovnávali sme hodnoty uhlíka vzhľadom na vegetačné obdobie (Obr. 4). Priemerné hodnoty za obdobie sa zvyšovali v smere jar (500,1297 $\mu\text{g C/g}$ sušiny) < leto (862,4893 $\mu\text{g C/g}$ sušiny) < jeseň (962,8104 $\mu\text{g C/g}$ sušiny). Jarné hodnoty boli o 1,7-krát menšie ako letné a takmer o polovicu menšie ako jesenné. Súvisí to so začínajúcim vegetačným obdobím, kedy po predchádzajúcej zime sa rastlinné, ale aj živočíšne spoločenstvo len začína obnovovať. Taktiež je to obdobie výdatných zrážok, čo podmieňuje vytekanie kyslej banskej vody spod haldy a následnú acidifikáciu pôdneho prostredia. Pôdna mikrobiálna biomasa nemala prístup ku potrebným živinám, jej aktivita sa znížila, s tým aj schopnosť viazať uhlík bola menšia.

Letné a jesenné vzorky mali hodnoty bližšie ku sebe. Rozdiel priemerných hodnôt bol 100,3211 $\mu\text{g C/g}$ sušiny. Aktivita mikroorganizmov na plochách Š1 a Š3 sa zvyšovala s nástupom jesene, kedy končí vegetačné obdobie. Rastlinné spoločenstvo na jeseň v dôsledku stále nižších teplôt a sezónnych zmien začína opadávať a odumierať, čím sa do pôdy dostáva veľké množstvo rastlinných zvyškov ako zdroj energie pre mikroorganizmy a ich aktivita sa zvyšuje [7]. Rozdiel sme namerali na ploche Š2, kedy hodnoty uhlíka PMB boli vyššie v lete (1055,302 $\mu\text{g C/g}$ sušiny) ako na jeseň (879,4917 $\mu\text{g C/g}$ sušiny). Môže to súvisieť so zníženou zrážkovou činnosťou na začiatku júla, kedy acidofilné druhy rastlín museli odolávať okrem acidifikácie aj dlhému suchému obdobiu, čím dochádzalo k ich skoršiemu odumieraniu a rozkladaniu v pôdnom prostredí.



Obr. 4. Hodnoty uhlíka PMB – jar, leto a jeseň

Záver

Po 50-tich rokoch od ukončenia banskej činnosti na lokalite Šobov, sa kyslá banská

voda neustále vylieva spod haldy pyritizovaného materiálu do okolitých ekosystémov. Aj napriek tomu, že sa tu v minulosti vykonávali viaceré revitalizačné opatrenia, hodnoty acidifikácie sú do dnešného dňa stále alarmujúce. Na skúmanej lokalite sa časom v dôsledku kyslej banskej vody vytvorili rozdielne plochy, s rôznymi varietami kambizeme kultizemnej, rôznou pôdnou reakciou od extrémne kyslej až po veľmi silne kyslú a s rôznym vegetačným krytom. To všetko vplýva na obsah a aktivitu pôdnej mikrobiálnej biomasy, teda množstvo uhlíka v pôde.

Na troch uvedených plochách sme zistili rozdielne hodnoty organického uhlíka PMB. Plochy Š1 a Š2 boli viac ovplyvnené vytekajúcou banskou vodou, čo malo za následok nižšie hodnoty uhlíka. Najvyššie priemerné hodnoty aj hodnoty v rámci vegetačného obdobia mala plocha Š3, ktorá je pokrytá plným vegetačným krytom aj napriek silne kyslej pôdnej reakcie pôdy. Tým sa potvrdila hrozba acidifikácie spojená s haldou lomu, čo výrazne ovplyvňuje pôdne a ekologické prostredie v okolí.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla za finančnej podpory grantu VEGA 1/0194/21.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Šimonovičová A., Machariková M., Pelechová Drongová Z., et al. (2016) Diverzita pôdných mikroskopických vláknitých húb a nižších rastlín. Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava, p. 194
- [2] Barančíková G., Gömöryová E., Tobiášová E. (2019) Pôdny organický uhlík a jeho odozva na využívanie krajiny Slovenska. NPPC – Výskumný ústav pôdoznalectva a ochrany pôdy, p. 17
- [3] Vjatráková J. (2001) Biomasa mikroorganizmov a dynamika premien dusíka pri alternatívnom spôsobe obhospodarovania pôdy. (Dizertačná práca) Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
- [4] Frankovská J., Kordík J., Slaninka I., et al. (2010) Atlas sanačných metód environmentálnych záťaží. Štátny geologický ústav Dionýza Štúra, p. 360
- [5] Nosalj S., Šimonovičová A., Pauditšová E., et al. (2021) Biologia. 76, p. 2123
- [6] Vance E. D, Brookes P. C., Jenkinson D. S. (1987) Soil Biol. Biochem. 19, p. 703
- [7] Balogová M. (2022) Journal of Soil Science. 21, p. 6
- [8] Tobiášová E., Barančíková E., Gömöryová E. (2016) Pôdna organická hmota. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, p. 215

Can lower microbial decomposition be the reason for the decline of reclamation in limestone quarry?

¹Marcela Burnog, ¹Aleš Kučera, ¹David Juříčka, ²Vítězslav Vlček

¹*Mendel University in Brno/Faculty of Forestry and Wood Technology/Department of Geology and Pedology/Zemědělská 3, 613 00 Brno, Czech Republic; m.burnog@seznam.cz*

²*Mendel University in Brno/Faculty of AgroSciences/Department of Agrochemistry, Soil Science, Microbiology and Plant Nutrition/Zemědělská 1665/1, 613 00 Brno, Czech Republic*

Abstract

This paper presents research of forestry reclaimed areas within limestone quarry Mokrá, Czech Republic. The article follows on from previous pedological research dealt with physical and chemical properties of soil. Research is focuses on the biological properties of soils of decline forest reclamations in the Mokrá limestone quarry. The tea bag index method was used to determine the intensity of organic matter in the soil. During the research, soil temperature and humidity were measured on prosperous (Pr) and decline (D) forest reclamation. The results showed that the Pr areas had a much better decomposition of tea biomass than the D areas. The daily average values of soil moisture and temperature showed significantly higher volume humidity values on D area. Based on the results, we cannot determine, if the low intensity of decomposition of organic matter and lack of moisture could be reason of the decline forest reclamation. Following studies will focus on the depth of soil and water within it.

Keywords: *tea bag index; humidity sensor; soil moisture; abandonment area*

Introduction and Objectives

The contribution follows on from the previous pedological research. The first article [1], dealing with the unsuccessful of the forest decline reclamation in the Mokrá limestone quarry (Czech Republic), was focused only on the physical and chemical properties of the soil. Based on the research results, it was not possible to clearly explain the reasons for the decline in forest recultivation. All soil samples showed strong water holding capacity, middle values of porosity and low minimal aeration. Statistically significant soil properties were: content of available potassium, clay and sand contents when compared declined (D) and prospering (Pr) reclamations. Soil analysis showed a deficiency of some elements (N, P, and C) and a significant surplus of calcium and magnesium. Contents of soil organic carbon (SOC) and total nitrogen (Nt) were evaluated as low to moderate and C/N ratio had favorable values (between 8 – 18). The pH/KCl was neutral, reaching values over 6.5 pH/KCl in D and Pr areas. The soil textural classes were very similar according to the USDA triangle diagram with dominance of silty clay loam.

This article focuses on the soil microbial decomposition of decline forest reclamations within the Mokrá limestone quarry. The quarry Mokrá is among the largest limestone quarries

in the Czech Republic (it has an area of 150 ha). Quarry is still under mining process in two open pits - West and Central. Last East part is mined sporadically and large areas have been restored. Restoration here started approximately 30 years ago [1, 2, 3].

This quarry is situated about 17 km from Brno to the NE on the transition of the Moravian Karst and Drahany Upland (the south of Moravia, Czech Republic). Altitude of the studied area is 350–440 m. Average annual temperature is 9.4 °C (measured directly in a quarry Mokrá, years 2012 and 2013) and average annual rainfall during these years reached 461,7 mm [4, 5].

Soil substrates on post-mined areas of limestone quarries are referred to Technosols according to [6], azonal soils which usually absence of topsoil A horizon, completely created by human within quarry reclamation. The substrate is usually compacted and nutrient depleted, so this may cause problems for plant growth [6, 7]. The depth of the soil substrate is around 0.6 m in the forestry recultivated parts of the quarry [8]. Overall, the area has been successfully reforested, but there are places, where seedlings repeatedly die. Limiting soil conditions have just been found in these places [1].

This is the reason, why these areas were repeatedly pedologically studied in order to clarify the possible causes of the decline. Main goals of the research are to verify: 1) if the low intensity of decomposition of organic matter in the soil is the reason of decline recultivation or 2) if the lower intensity of decomposition is caused by a lack of moisture.

Materials and methods

The research was carried out on forest reclamation in the eastern part of the quarry Mokrá, coordinates N 49°13'38,43048 E 16°46'18,84144. Forest reclamations are applied dominantly on internal deposited materials and autochthonous tree species are usually used. The study [2] reports soil properties for the Pr and D areas. Average values in Pr area: pH/KCl – 6.67, total organic carbon – 1.83 %, total soil nitrogen 0.17 %, C/N ratio – 12, < 0.002 – 31.36 %, 0.002-0.05 – 53.57 %, 0.05-2 – 15.07 %, skeleton 4.16 %. Average values in D area: pH/KCl – 6.92, total organic carbon – 1.77 %, total soil nitrogen 0.18 %, C/N ratio – 10.67, < 0.002 – 25.95 %, 0.002-0.05 – 51.78 %, 0.05-2 – 22.27 %, skeleton 4.16 % [2]. The most common tree species used for reclamations are *Tilia cordata*, *Quercus robur*, *Acer pseudoplatanus*, *Pinus sylvestris* and *Larix decidua*. Forest reclamation, on the studied part of the quarry, was approximately 20 years old. After a preliminary botanical and dendrometrical survey, 30 sampling sites were defined (predominant tree species - *Tilia cordata*, rarely occurring tree species - *Pinus sylvestris*). Fifteen sampling sites were

represented by prosperous forest stands; fifteen sampling sites were represented by dead trees or trees at high risk of mortality. Trees have a low growth rate, very often have defective or damaged branches and dry branches in decline forest reclamation. Tree trunks have the presence of cavities, cracks and occasionally rotten bark.

The experiment was carried out with commercially available tetrahedron shaped synthetic tea bags, based on methods [9]. Green tea - Lipton Green tea bag (EAN: 8710908903595) and rooibos tea - Lipton Rooibos tea bag (EAN: 8722700188438).

Totally were used 30 tea bags of each kind. All teabags were buried in separate 8 cm-deep holes. The incubation time was 90 days in soil. After 90 days incubation (21st May – 18th August 2019), the tea bags were removed from the soil, they were cleaned of adhering soil particles. Tea bags were dried in a laboratory stove for 48 hours at 70°C [9, 10]. Finally, the tea bags were repeatedly increased (to 0.001 g) and the results were processed using the program STATISTICA 12.

Soil moisture (VIRRIB) and soil temperature (DS18B20) sensors were installed on prosperous and decline forest recultivation in the depth 0.15 m. Soil moisture was measured, because soil moisture and acidity are important factors, that can play a role in the decomposition of organic matter. On a large scale, temperature is also important factors that can affect other environmental parameters (e.g. soil moisture, microbial activity, litter composition) [11]. Soil moisture and soil temperature were measured every day during the experiment

(24 measurement/day). Daily measurement values were obtained by averaging twenty-four measured values per day. The data on the sensors was read after 90 days.

Results and discussion

Statistically significantly among themselves were in the parameters of microbial decomposition (stability index "S" $p = 0.0061$; "k" index, which indicates the rate of decomposition $p = 0.0001$) in Pr areas and D areas of recultivation.

The values of TBI are shown in Fig. 1a and 1b. The stability index (S) had an average value of 0.376 ± 0.042 and a range of variation from 0.289 to 0.482 for Pr areas.

The D areas had a mean value of 0.331 ± 0.084 with a range of variation from 0.131 to 0.493. The decomposition index (k) had an average value of 0.018 ± 0.001 with a range of variation from 0.007 to 0.044 in the Pr areas. Decline areas had mean values of 0.09 ± 0.0016 with a range of variation of 0.002 to 0.024.

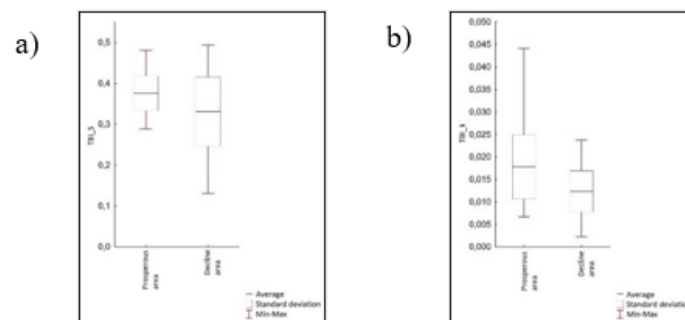


Fig. 1. (a) Index of decomposition in Pr and D areas; (b) index of stability in Pr and D areas.

The lowest value of the decomposition constant „k“ was obtained in D area (0.002) and the highest value in Pr area (0.044). The lowest „S“ was observed in decline area (0.13) and the highest value was in decline area (0.49).

According to [9] the S value is an indication of green tea mass loss and decomposition constant “k” is calculated from the rooibos tea mass loss using an exponential decomposition model. In comparing the two areas D and Pr, Pr area had much better decomposition of tea biomass than with D area. Pr areas showed much better results decomposition of tea biomass than D areas.

Some studies [11, 12, 13, 14, 15] state that constant “S” and “k” are significantly influenced by environmental factors (e.g. pH, soil moisture, temperature, altitude). According to study [12] index stabilization decreases with increasing soil reaction and soil moisture. Based on the soil reaction [3], the average value of the “S” index was higher in Pr area, where the pH value was lower. However, the difference between the pH values (in Pr and D areas) was negligible. Higher values of total organic carbon, ratio C/N were found in the Pr area, where the average values of the index “S” and “k” are higher. Another study [13] states that the effects of temperature on decomposition rate were dependent on soil moisture. The stabilization factor was strongly dependent on temperature, but the effect of temperature varied with vegetation. The daily average values of soil moisture and soil temperature (Fig. 2a and 2b) during the TBI experiment showed significantly higher volume humidity values on D area. The average value of soil moisture was 32.96 vol.% (Tab. 1) during the monitored period in the decline area. Prosperous area had lower an average soil moisture of 6.79 vol. % than D area. Maximum soil moisture was recorded the 10th of June in Pr areas (34.94 vol. %) and the 9th of June in decline areas (41.88 vol. %). Value of minimum soil moisture was recorded on the same day on 12th July in the Pr areas (16.95 vol. %) and on 9th June in the D areas (24.78 vol. %). The table no. 1 shows the min., max. and average soil temperature in the research areas.

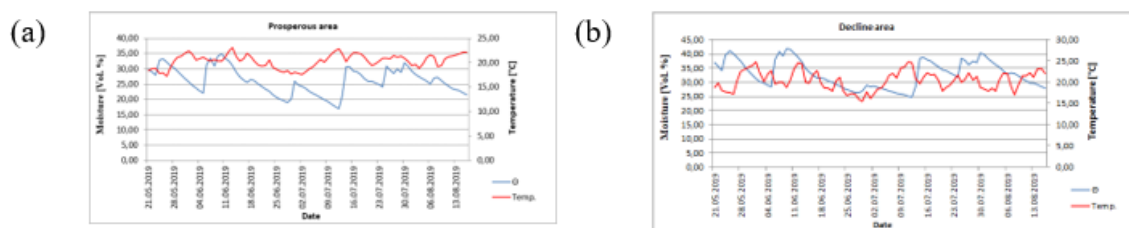


Fig. 2. Soil volume moisture and soil temperature in Pr area (a) and D area (b).

We cannot say as study [13] that the lowest decomposition rates were found in locations with low soil temperature. The average soil temperature is almost identical in the Pr (20.35 °C) and D areas (20.37 °C). We can lean towards the theory [11], the presence of groundwater or heavily saturated soil may slow down the degradation of organic matter. A different opinion is taken by the study [16] showed (in wetlands) that the rate of decomposition of organic matter depends more on the type of organic material than other environmental factors (e.g. water content). Value of soil moisture were compared with hydrolimits according to [2]. Research reports: point of decreased availability (BSD) - 24.09, point of decreased availability of water (LB) - 20.24 vol. % and wilting point (WP) -12.72 % for Pr area; BSD - 23.62, LB - 19.92 vol. % and WP -12.74 % for D area [2]. Based on the hydrolimits, the Pr area was found a total of 25 times in BSD and 7 times in LB. No hydrolimit was set in the decline area.

Tab. 1. Values of soil volume moisture and soil temperature in Pr area and D area

Values during the experiment	Prosperous area	Decline area
Minimum soil volume moisture [vol. %]	16.95	24.78
Maximum soil volume moisture [vol. %]	34.94	41.88
Average of soil volume moisture [vol. %]	26.17	32,96
Minimum soil temperature [°C]	17.28	15.53
Maximum soil temperature [°C]	23.06	24.80
Average of soil temperature [°C]	20.35	20.37

Conclusion

Analyzes showed the decomposition of organic matter was statistically significantly different between variants (“S” index $p = 0.0061$; “k” index $p = 0.0001$). The Pr (average values of “S” – 0.38; average values of “k” – 0.018) areas had much better decomposition of tea biomass than D area (average values of “S” – 0.33; average values of “k” – 0.012). The daily average values of soil moisture showed significantly higher volume humidity values on D area.

Based on the results, we cannot determine, if the low intensity of decomposition of organic matter and lack of moisture could be reason of the decline forest reclamation. Following studies will focus on the depth of soil and water within it.

Acknowledgement

This research was supported by mining company Českomoravský cement, a.s.

References

- [1] Burnog M., Kučera A., Cihlářová H., et al. (2022) SilvaNet - WoodNet 2022: Proceedings Abstracts of Student Scientific Conference, Possible causes of forest reclamation decline in limestone quarry Mokrá, Brno: Mendel University in Brno, Czech R., p. 20
- [2] Cihlářová (2017^a) Vliv půdních vlastností na genezi vegetačních typů spontánně regenerovaných a lesnický rekultivovaných ploch ve vápencovém lomu Mokrá (Disertační práce), Mendelova univerzita v Brně, Brno
- [3] Cihlářová H., Koutecký T., Hladký J., et al. (2017^b) Environ. Eng. Sci. 34(9), p. 638
- [4] Jeglová H. (2013) Microclimate monitoring within Mokrá quarry (report for the year 2012) Internal materials of mining company Českomoravský cement a.s.
- [5] Jeglová H. (2014) Microclimate monitoring within Mokrá quarry (report for the year 2013) Internal materials of mining company Českomoravský cement a.s.
- [6] IUSS Working Group WRB (2022) World Reference Base for Soil Resources. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. International Union of Soil Sciences (IUSS), Vienna, Austria, p. 21
- [7] Cohen-Fernández A.C., Naeth M. A., Wilkinson S.R. (2013) Can. J. Soil Sci. 93, p. 555
- [8] Burnog M., Juříčka D., Vlček V. et al. (2018) Výsadba dřevin s použitím hydrogelu a zhodnocení jeho účinnosti ve vztahu k běžnému způsobu výsadby (Závěrečná zpráva za rok 2018) Interní materiály těžební společnosti Českomoravský cement a.s.
- [9] Keuskamp J.A., Dingemans B. J. J., Lehtinen T. et al. (2013) Methods Ecol. Evol. 4(11), p. 1070
- [10] Mori T. (2022) Ecol. Indic. 141, article 109077
- [11] Saint-Laurent D., Arsenault-Boucher L. (2020) Geoderma 358, article 1 13976
- [12] Elumeeva T. G., Onipchenko V. G., Akhmetzhanova A. A. et al. (2018) J. Mountain Sci. 15(8), p. 1633
- [13] Petraglia A., Cacciatori C., Chelli S. et al. (2019) Plant Soil 435, p. 189
- [14] Pino V., McBratney A., O'brien E. et al. (2021) Soil Secur. 5, artical 100016
- [15] Naeth M. A., Archibald H. A., Nemirsky C. L., et al. (2012) Can. J. Soil Sci. 92, p. 7
- [16] Mueller P., Schile-Beers L., Mozdzer T. J. et al. (2018) Biogeosci. 15(10), p. 3189

Odstraňovanie ropného znečistenia z pôd prostredníctvom elektrokineticky indukovaného premývania pôd so surfaktantom Tween-80

Claudia Čičáková¹, Roman Tóth^{1,2}, Hana Horváthová^{1,2}, Veronika Špirová¹, Tomáš Faragó¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra geochémie, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; cicakova13@uniba.sk

²Centrum environmentálnych služieb, s.r.o., Kutlíkova 17, 852 50, Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Removal of oil pollution from soils through electrokinetic induced washing of soils with Tween-80 surfactant

Electrokinetically induced transport of surfactants solves the problem of low-efficient soil washing in low-permeability soils. Tween-80, a non-ionic surfactant, is suitable due to its non-environmental impact and main transport by electroosmotic flow (EOF). During the experiment, the content of petroleum hydrocarbons (PH) raised mainly in anolyte (test 1-A), reaching concentrations $C_{10-C_{40}}$ 93400 $\mu\text{g.l}^{-1}$ and 37000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ after 5 and 10 days, respectively; in the anode part of the soil reached 30300 mg.kg^{-1} . The experiment's results confirmed 30% removal efficiency of PH from the cathode- to the anode part of the apparatus and anolyte. The accumulation of PH near the anode was opposite to EOF, presumably due to reversed electroosmotic flow as the anolyte pH dropped to 1,4. The other explanation of the unexpected transport of PH could be also caused by the raised hydraulic gradient (a result of inappropriate apparatus).

Keywords: *electrokinetic remediation; Tween-80; petroleum hydrocarbons; soil contamination*

Úvod a formulácia cieľa

Surfaktanty alebo povrchovo aktívne látky sú skupinou molekúl, ktorých hlavnou charakteristikou je ich schopnosť znižovať povrchové a medzifázové napätie medzi vodou a surfaktantom, čím podporujú desorpciu a rozpustnosť hydrofóbných organických látok, napr. PAU (polycyklické aromatické uhľovodíky), PCB (polychlórované bifenyly) alebo ropných látok (RL) prostredníctvom procesu nazývaného micelárna solubilizácia [1]. Surfaktanty obsahujú hydrofóbnu aj hydrofilnú skupinu, ktoré majú tendenciu tvoriť micely v koncentráciách vyšších ako kritická micelárna koncentrácia (CMC) [2]. Solubilizačné činidlá sú bežne používané pri odstraňovaní organického znečistenia v pôdach/horninovom prostredí s nízkou priepustnosťou v kombinácii s elektrokinetickými procesmi. Počas procesu elektricky indukovaného transportu sa tieto činidlá môžu pridávať priamo do pôdy alebo do roztokov elektródových komôr a následne sa zavádzajú do pôdy elektroosmózou a/alebo elektromigráciou v závislosti od typu použitého surfaktantu.

Pri aplikácii elektrokinetickej remediácie sa využíva jednosmerný elektrický prúd (DC – angl. *direct current*) s nízkou intenzitou a s vhodným usporiadaním elektród v znečistenej matrici [3]. Ropné látky (RL) predstavujú látky s nepolárnym charakterom, teda pre ich

úspešné odstránenie je potrebné dodatočné použitie surfaktantov, vplyvom ktorých sú ropné látky desorbované z pôdy do pôdneho roztoku. Elektroosmotickým transportom (EOF – angl. *electroosmotic flow*) sú následne dopravené do okolia elektródy; znečisťujúce látky sú tak odstránené transportom elektrolytu (pôdneho roztoku) [4]. Surfaktant s neiónovým charakterom (v tomto prípade nami zvolený Tween-80) neinterferuje s elektromigračným tokom látok prebiehajúcim v elektrickom poli, v porovnaní s aniónovými surfaktantami (napr. SDS – angl. *sodium dodecyl sulfate*) [5].

Cieľom práce bolo sledovať transport neiónového surfaktantu Tween-80 prostredníctvom EOF a zhodnotiť jeho účinnosť desorpcie RL zo vzorky zvodneného horninového prostredia (pieščitá štrka), indukovanú DC.

Materiál a metódy

Vzorka zvodneného horninového prostredia (pieščitá štrka) pochádzala z modelovej lokality potenciálnej environmentálnej záťaže. Vzorka pieščitého štrku bola umelo dokontaminovaná podľa [3], po čom ropné látky v nej obsahovali prevažne frakcie $C_{16} - C_{35}$ a $C_{12} - C_{16}$. Laboratórna aparátúra pozostávala z trojkomorového akvária predeleného perforovanými prepážkami, skonštruované podľa [5,6,7]. Ako elektródy boli použité grafitové tyče. Roztok 3% wt Tween-80 bol dodávaný do anolytovej časti a v katolytovej časti bol prítomný iba elektrolyt 0,1M roztok Na_2SO_4 [podobne ako v 6].

V tab. 1 je znázornený plán experimentu, jednotlivé čísla testov znázorňujú jedno samostatné akvárium. V texte uvádzané skratky 1-A, 1-K, 2-A, 2-K, 3-A, 3-K sa vzťahujú na túto tabuľku, pričom A-anóda, K-katóda prislúchajú k jednotlivým akváriám.

Tab. 1. Plán experiment

test	anolyt	vzorka	katolyt	napätie	čas
1 (DC)	3%wt Tween-80	Pôdna vzorka s RL, 0,1M Na_2SO_4	0,1M Na_2SO_4	30V	10 dní
2 (blank bez DC)	3%wt Tween-80	Pôdna vzorka s RL, 0,1M Na_2SO_4	0,1M Na_2SO_4	30V	10 dní
3 (blank bez DC)	0,1M Na_2SO_4	Pôdna vzorka s RL, 0,1M Na_2SO_4	0,1M Na_2SO_4	30V	10 dní

Charakteristiky vzorky pieščitého štrku sú definované nasledovne: TOC pred

dokontaminovaním cca 0,32% a po kontaminácii 1,37%. Vododržná kapacita pôdy 40% po dokontaminovaní 32%. Hlavné zastúpenie prvkov v pôdnej vzorke bolo: Si 17,2%, K 1,5%, Fe 1,6%, Ca, 7,8%, Al 1,49%, Na 0,372%.

Experiment bol vystavený vplyvu elektrického napätia 30V s výstupným prúdom 0,12A, ktorý sa v čase menil a klesal postupne na minimum 0,07A. Vo všetkých elektrolytoch bol stanovovaný parameter $C_{10} - C_{40}$ (na začiatku experimentu, pred aplikáciou DC, po 5 dňoch a po 10 dňoch s DC); v katolytoch bola sledovaná prítomnosť tenzidu (po 5 dňoch, po 10 dňoch). V vzorke piesčitého štrku bola stanovená iniciálna koncentrácia $C_{10} - C_{40}$ na 27500 mg.kg⁻¹ a po experimente boli vzorky piesčitého štrku ovzorkované v okrajových častiach (do 5 cm od elektrolytovej komory). Z fyzikálno-chemických parametrov boli v elektrolytoch sledované hodnoty pH, EC, ORP a T. V piesčitých štrkoch boli stanovené na konci experimentu parametre pH a EC podľa [8].

Samotné analytické práce boli realizované v akreditovaných laboratóriách ALS Česká republika v Prahe, kde boli stanovované koncentrácie $C_{10} - C_{40}$ v elektrolytoch a v pôde (metódou GC-MS s FID detekciou), prítomnosť tenzidov v elektrolytoch (spektrofotometricky s využitím kvetového testu HACH). Hodnoty TOC boli stanovené spektrofotometricky [8] a zloženie pôdy s XRF.

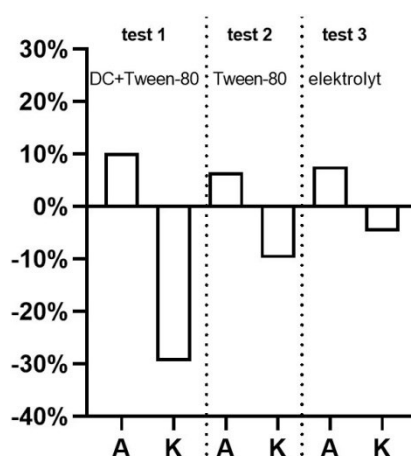
Výsledky a diskusia

Z výsledkov experimentu vyplýva, že k transportu surfaktantu Tween-80 vplyvom DC (v smere od anódy ku katóde) došlo už po 5. dňoch (37,7 mg.l⁻¹ v katolyte) a ďalej vzrástol po 10. dňoch (1500 mg.l⁻¹ v katolyte). EOF (kvapalina vytlačená vplyvom DC do katódovej komory) bol 87 ml za 10 dní. V prípade blanku bez DC (test 2) surfaktant nebol prítomný v katolyte.

Obsah ropných látok vzrástol hlavne v anolyte (test 1-A) (koncentrácie $C_{10} - C_{40}$ po 5 dňoch 93400µg.l⁻¹ a po 10.dňoch 37000µg.l⁻¹) a anódovej časti piesčitej vzorky (test 1-A) (30300mg.kg⁻¹) pravdepodobne v dôsledku reverzného toku elektroosmotického tlaku. Elektroosmotický tlak za štandardných podmienok prechádza v dôsledku pohybu elektrónov od anódy ku katóde, avšak v dôsledku výraznej zmeny pH (pokles pH v anolyte pri elektrolýze vody až na pH 1,4) dochádzalo pravdepodobne k reverzii EOF od katódy smerom ku anóde [3]. Malé množstvo $C_{10} - C_{40}$ bolo detekované aj v katolyte (test 1-K) (po 5. dňoch 1320 µg.l⁻¹ a po 10. dňoch 429 µg.l⁻¹). Teda, v okolí anódy sa akumulovali ropné látky. Ďalším možným vysvetlením tohto neočakávanej akumulácie RL môže byť prisúdené aj nevhodnej konštrukcii aparatury, kedy EOF samovoľne neodtekal do zbernej nádoby, ale bol v pravidelných

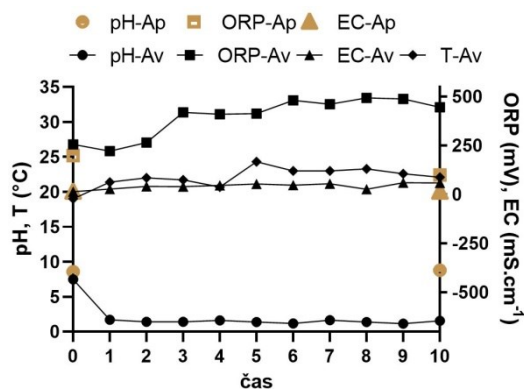
intervaloch odpipetovaný, čím sa medzi anolytovou a katolytovou výškou hladiny vytvoril výškový skok a hydraulickým tlakom mohli byť ropné látky tlačené k anódovej časti pôdy a následne do anolytu, kde sa zhromaždilo najväčšie množstvo RL.

Na obr. 1, ktorý reprezentuje zmeny koncentrácií uhl'ovodíkov $C_{10} - C_{40}$ v pôdnych vzorkách po experimente kladné čísla predstavujú nárast $C_{10} - C_{40}$ a naopak záporné hodnoty pokles koncentrácie $C_{10} - C_{40}$. Z tohto grafu vidíme značný 30% pokles koncentrácií $C_{10}-C_{40}$ z katódovej časti pôdy (test 1-K) pod vplyvom DC a použitia surfaktantu Tween-80.

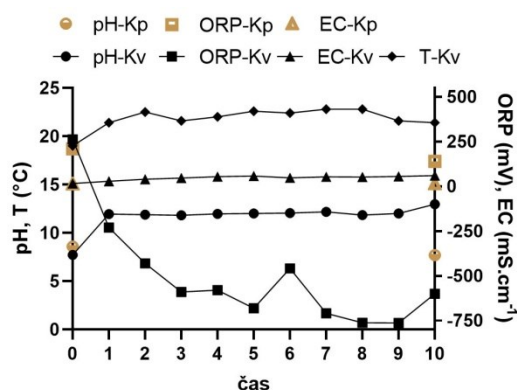


Obr. 1. Zmena koncentrácie uhl'ovodíkov $C_{10}-C_{40}$ v porovnaní s iniciálnou vzorkou pôdy. Označenie podľa tab.1; A-anóda, K-katóda.

Výrazné zmeny boli sledované vo fyzikálno-chemických parametroch v elektrolytoch – najmä pH, ORP a tiež teplota (vid'. obr 2 a obr. 3 znázornené čiernou farbou). V vzorkách pieščitého štrku (na obr. 2 a obr. 3 znázornené hnedou farbou) po experimente neboli pozorované výraznejšie zmeny v týchto parametroch.



Obr. 2 Fyzikálno-chemické parametre v anolyte (Av) a anodickej časti pôdy (Ap)



Obr. 3 Fyzikálno-chemické parametre v katolyte (Kv) a katódovej časti pôdy (Kp)

Podľa obr. 1 vidíme, že aj samotné dodávanie surfaktantu Tween-80 (test 2-A, K) prispelo k rozplavovaniu RL do elektrolytov, ale oveľa v menšej miere ako to bolo v prípade použitia DC + Tween-80 (test 1-A, K).

Záver

V závere treba konštatovať, že v katódovej časti vzorky piesčitého štrku sa podarilo znížiť, resp. transportovať ropné znečistenie o cca. 30% smerom k anódovej časti, kde bolo detekované síce navýšenie iba o cca 10%, avšak zvyšné množstvo ropných látok bolo vyplavené do anolytu.

Tento experiment potvrdil potenciál tohto prístupu pri remediácii pôd znečistených ropnými látkami a tiež potrebu ďalšieho výskumu v tejto oblasti.

PodĎakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt Zvýšenie kapacít a kompetencií Univerzity Komenského vo výskume, vývoji a inováciách, ITMS2014+: 313021BUZ3, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a vďaka Grantu mladých vedeckých pracovníkov UK, č.311/2022 a tiež projektom APVV-21-0212.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Saichek R. E., Reddy K. R. (2005) Cril Rev Envirol Sci Technol, 35(2), p. 1
- [2] Choi H.-D., Park S., Ryu B., et al. (2009) Environ. Eng. Res., 14(3), p. 153
- [3] Li Y., Jiang L. (2021) J. Environ. Chem. Eng. 9(4), p.105190
- [4] Pazos M., Rosales E., Alcántara T., et al. (2010). J. Hazard. Mater. 177(1–3), p. 1

- [5] Estabragh A. R., Lahoori M., Javadi A. A., et al. (2019) J. Environ. Chem. Eng. 7(5), p.103298
- [6] Boulakradeche M. O., Akretche D. E., Cameselle C., et al. (2015). Electrochim. Acta, 174, p. 1057
- [7] Gidudu B., Chirwa E. (2020). Sustain. Sci. 12(14), p. 5613
- [8] Fiala K., Barančíková G., Brečková V., et al. (1999). Čiastkový monitorovací system – pôda. Záväzné metody rozborov pôd. Výskumný ústav pôdoznamectva a ochrany pôd, Bratislava, p. 95

Vývoj fragmentov jelšových lesov v čase a priestore pomocou diaľkového prieskumu Zeme

Lucia Demovičová¹, Mária Šibíková², Michaela Michalková², Ivan Jarolímek², Simona Klačanová², Lucia Čahojová², Šimon Opravil³

¹*Univerzita Komenského Bratislava, Prírodovedecká fakulta, Katedra environmentálnej ekológie a manažmentu, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; polcicova12@uniba.sk*

²*Centrum biológie rastlín a biodiverzity Slovenskej akadémie vied, v. v. i, Dúbravská cesta 9, 845 23 Bratislava, Slovenská republika*

³*Geografický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Štefánikova 49, 814 73 Bratislava, Slovenská republika*

Abstract

Development of alder forest fragments in time and space using remote sensing
Alder forest remnants, highly valuable habitats, may be negatively influenced by fragmentation, whether it is changes in land-use due to agricultural and water management progress or spreading alien species etc. In our research we focus on explaining the fragmentation effect on plant species composition. Besides how fragmentation and edge effect decrease the quality of forest fragments herbaceous layer by changing fragmentation indices. These results were obtained by using remote sensing techniques such as NaturaSat software and compared within the time period of 1949 -2022.

Keywords: alder forest; fragmentation; remote sensing

Úvod a formulácia cieľa

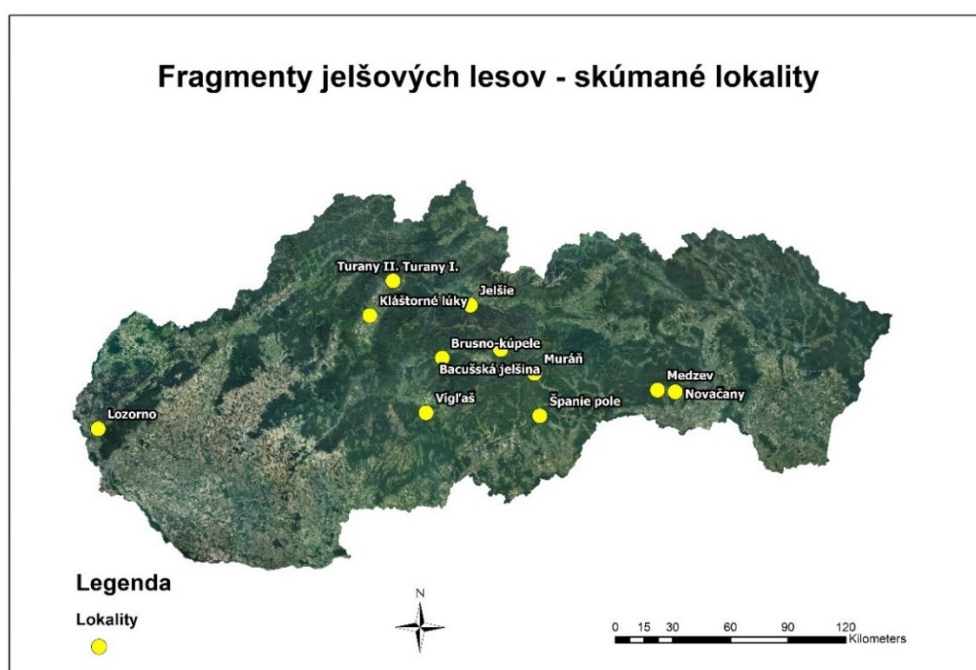
Pod pojmom fragmentácia je možné si predstaviť rôzne druhy rozdelenia, avšak z pohľadu prírodných vied a nami skúmanej problematiky, pod týmto termínom rozumieme rozdelenie väčších súvislých biotopov na menšie časti obklopené takou krajinou pokrývkou, ktorá je odlišná oproti pôvodným podmienkam. Fragmentácia v takej miere, ako je v súčasnosti zapríčinená vplyvom antropogénnej činnosti je veľkou hrozbou pre biotopy a v nich ukryté prírodné bohatstvo. Najčastejšie k nej dochádza, či už zvýšenou mierou urbanizácie a s ňou súvisiacou výstavbou sídiel, infraštruktúry, alebo zmenou využívania územia, za účelom získania poľnohospodárskej pôdy [1].

Takéto zásahy do biotopov, konkrétne v našom prípade do lesných porastov, vážne narúšajú prirodzené mikroklimatické podmienky. Predlžovaním ekotonových, teda okrajových, oblastí vystavujú porast zvýšeným vplyvom stresových faktorov, ako sú napr. škodcovia, invázne organizmy, alebo synantropné druhy. Dôsledkom zväčšovania okrajových oblastí smerom k jadru porastu a rozširovaním tzv. okrajového efektu (*angl. edge effect*), môže dôjsť k zníženiu populácií typicky lesných druhov a naopak k zvýšeniu pokryvnosti a výskytu druhov invázných [2].

Výrazne negatívne na porasty vplýva aj izolácia jednotlivých fragmentov, keďže nemôže dôjsť k výmene genetických informácií medzi populáciami. Spomínanými zmenami podmienok sú ovplyvnené hlavne druhy pôvodne sa vyskytujúce v poraste, ich prirodzená biodiverzita, ktorá sa takýmito negatívnymi vplyvmi výrazne znižuje, čo môže viesť k vážnemu narušeniu biotopu, v určitých prípadoch vedúcemu až k jeho zániku [3]. V rámci nášho výskumu sme sa zamerali na zachytenie vplyvu fragmentácie jaseňovo-jelšových podhorských lužných lesov, na priestorové charakteristiky fragmentov, ako aj na druhové zloženie rastlinstva. A to konkrétne porovnaním druhovej skladby v jadrovej a okrajovej časti, ako aj ich súvislosti s priestorovými charakteristikami porastov a ich zmenami v priestore a čase.

Materiál a metódy

Pomocou Informačného systému lesného hospodárstva a satelitných snímok za použitia programu NaturaSat bolo vybraných 12 lokalít s fragmentmi jelšových lesov v rozmedzí 1 až 40 ha (Obr. 1) [4,5]. V každej z nich boli určené 2 plochy o rozmeroch 20 x 20m, na ktorých sme vytvorili fytocenologický zápis podľa metodiky Zürišsko-Montpelliarskej školy, pričom vždy jedna z plôch bola situovaná v jadrovej časti porastu a druhá v okrajovej oblasti, rozumej 10 m od okraja porastu [6, 7]. Získané údaje boli následne zapísané do databázy TURBOVEG a spracované v programe JUICE [8, 9].



Obr. 1 Fragmenty jelšových lesov - skúmané lokality [10]

Pre zefektívnenie hodnotenia jednotlivých oblastí porastov sme druhy začlenili do funkčných kategórií ako sú apofyty, archeofyty, neofyty, lesné druhy a bližšie lesné druhy jelšových lesov, ako aj druhy nachádzajúce sa v Červenom zozname výtrusných a kvitnúcich rastlín Slovenska [11]. Pomocou diaľkového prieskumu Zeme, využitím programu NaturaSat, konkrétne poloautomatickej segmentácie, sme určili priestorové charakteristiky fragmentov, ako je rozloha fragmentu, obvod a následne výpočtom index tvaru [12]. Historické údaje boli získané prostredníctvom historickej ortofotomapy z obdobia 40-tych a 50-tych rokov, na základe ktorej bol zaznamenaný vývoj priestorových charakteristík v čase [13].

Získané údaje boli spracované pomocou programu R-software a následne výsledky GLM analýz zaznamenané pomocou grafického zobrazenia [14].

Výsledky a diskusia

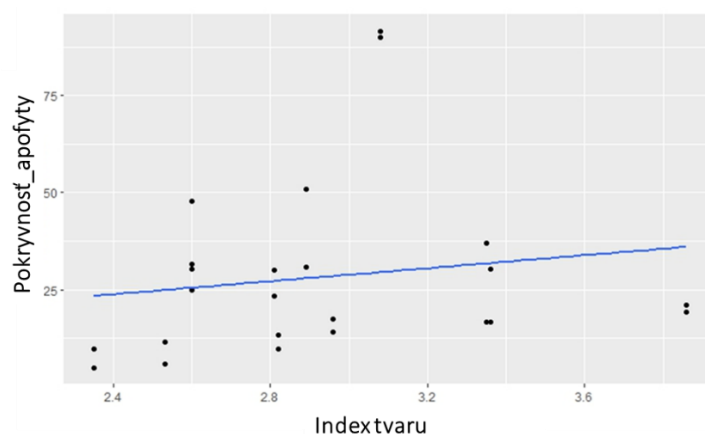
Na 12 lokalitách (Obr. 1) a teda 24 fytocenologických zápisoch bolo celkovo zaznamenaných 172 rastlinných druhov, z toho bolo 117 zatriedených do jednej z kategórií funkčných druhov. Najpočetnejšiu kategóriu predstavovali lesné druhy, kde bolo zaradených 55 druhov. Konkrétne pri 7 lokalitách bol zaznamenaný vyšší výskyt týchto druhov v jadrovej oblasti než v okrajovej. Čo sa týka druhového zastúpenia, najčastejšie sa vyskytovali druhy *Acer pseudoplatanus*, *Fraxinus excelsior*, *Athyrium filix-femina*, *Brachypodium sylvaticum* a *Circaea lutetiana*.

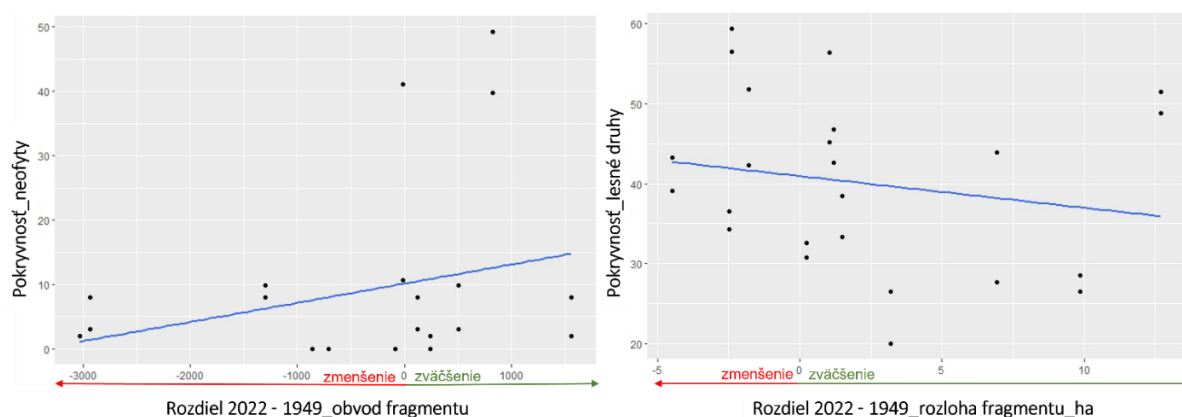
V rámci lesných druhov typických pre jelšiny bolo vyčlenených 20 druhov, tieto disponovali výraznými hodnotami frekvencie výskytu. Okrem druhu *Alnus glutinosa* so zastúpením vo všetkých fragmentoch, mali pomerne hojné zastúpenie druhy *Prunus padus*, *Crataegus monogyna*, *Caltha palustris*, *Dryopteris carthusiana*, *Geum urbanum*, *Impatiens noli-tangere* a *Urtica dioica*.

Pričom je potrebné zdôrazniť, že prevažné množstvo druhov tejto funkčnej skupiny sa vyskytovalo častejšie v jadrových oblastiach porastov než v okrajových. Čím môžeme predpokladať ústup druhov typických pre daný biotop, v našom prípade jaseňovo-jelšové podhorské lužné lesy, z okrajových oblastí a sústrednie v jadrových, respektíve zachovalejších častiach porastov. Tento jav môžeme pripísať práve negatívnym vplyvom disturbancií, pôsobiacich na fragment z okolitého prostredia, teda z obklopujúcej krajiny pokrývky, keďže práve fragmentáciou a predlžovaním okrajov sa vystavenie porastu daným vplyvom zvyšuje [15].

K tejto skutočnosti napovedá aj zaznamenaný vzťah medzi indexom tvaru a pokryvnosťou apofytov, teda pôvodných druhov, avšak rozširujúcich sa na človekom

pozmenených stanovištia. Vzhľadom na zvyšujúce miery indexu tvaru, teda členitejší tvar porastu a predĺžené okrajové oblasti, dochádza k väčšiemu výskytu apofytov (Obr. 2). Tieto boli zastúpené 30 druhmi a to početnejšie v jadrovej oblasti iba v 4 prípadoch z 12 skúmaných lokalít. V najväčšom počte fragmentov sa vyskytovali *Aegopodium podagraria*, *Galium aparine*, *Geranium robertianum*, *Glechoma hederacea*, *Rubus caesius* a *Stachys sylvatica*.





Obr. 3 Vľavo pokryvnosť neofytov vzhľadom k zmenám rozlohy porastu v čase, pri náraste obvodu bol zaznamenaný aj nárast pokryvnosti neofytov; Vpravo vzájomný vzťah medzi pokryvnosťou lesných druhov a zmeny rozlohy fragmentu, pri väčších rozdieloch v rozlohe medzi minulosťou a súčasnosťou bola zaznamenaná menšia pokryvnosť lesných druhov.

Avšak okrem nepôvodných druhov, okrajového efektu a ďalších účinkov, výrazne negatívny vplyv na druhové zloženie porastu môže mať aj fragmentáciou spôsobená izolovanosť porastu. Práve izolovanosť by sme mohli označiť za príčinu nižšej pokryvnosti lesných druhov na lokalitách, na ktorých v priebehu času došlo k zvýšeniu ich rozlohy (Obr. 3) [3].

Záver

Zo zaznamenaných výsledkov fytoecologických zápisov, zaradením určených druhov do funkčných kategórií a vytýčením ich vzájomných vzťahov so zmenami priestorových charakteristík, sme poukázali na negatívny vplyv fragmentácie lesných porastov. Pričom ide predovšetkým o zvýšenú mieru šírenia nepôvodných druhov a ústup pôvodných do jadrových oblastí, ako aj negatívne vplyvy izolácie fragmentov. Najväčšie rozdiely medzi fragmentmi sme zaznamenali vo funkčnom rozdelení rastlín a indexom tvaru fragmentu. Ostrovy so zložitejším indexom tvaru mali stúpajúcu krivku pokryvnosti apofytov, podobne aj neofytov. Tiež fragmenty s väčšou celkovou rozlohou, avšak stále s vysokým indexom tvaru fragmentu mali zasa klesajúcu pokryvnosť typických jelšových druhov. Dôležité je preto zohľadňovať nielen samotnú rozlohu fragmentu, ale aj premenlivosť okraja, ktorý je práve príčinou prieniku invázných druhov a apofytov.

Podakovanie

Tento príspevok bol spolufinancovaný grantom VEGA 2/0119/19.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Forman R. T. T. (1995) The ecology of landscapes and regions, Cambridge University Press, p. 632
- [2] Laurance W. F., Ferreira L. V., Rankin-de Merona J. M. et. al. (1998) Ecology 79, p. 2032
- [3] Opdam P., (1991) Landscape Ecology vol. 5/2, p. 93
- [4] ISLHP, 2022, [cit. 3.5.2022] <<https://gis.nlcsk.org/islhp/mapa>>
- [5] Mikula K., Šibíková M., Ambroz M. et. al. (2021) NaturaSat - A Software Tool for Identification, Monitoring and Evaluation of Habitats by Remote Sensing Techniques, Remote Sens. 13, p. 3381.
- [6] Braun-Blanquet J. (1964) Pflanzensoziologie, Springer Verlag, Wien, Grundzüge der Vegetationskunde
- [7] Westhoff V., Maarel E. (1973) The Braun-Blanquet approach, In: Whittaker R. H., 1973, (ed) Classification of Plant Communities, Dr. W. Junk, p. 617
- [8] Hennekens S., Schaminée J. H. J. (2001) J. Veg. Sci., 12, p. 589
- [9] Tichý L. (2002) Journal of Vegetation Science, 13, p. 451
- [10] ZBGIS 2022, Ortofotomozaika, [cit. 5.6.2022] <https://zbgisws.skgeodesy.sk/zbgis_ortofoto_wms/service.svc/get>
- [11] Eliáš P., Díte D., Kliment J. et. al. (2015) Biologia, 70(2), p. 218
- [12] Mikula K., Urbán J., Kollár M. et al. (2021) Discrete & Continuous Dynamical Systems - S 14(3), p. 1033
- [13] Historická ortofotomapa © GEODIS SLOVAKIA, s.r.o. a Historické LMS © Topografický ústav Banská Bystrica. (ed.) Mgr. Šimon Opravil, Geografický ústav SAV, v. v., [cit. 5.9.2022] <<http://mapy.tuzvo.sk>>
- [14] R Core Team, 2021, R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, [cit. 12.11.2022] <<https://www.r-project.org/>>
- [15] Byers J. (2002) Oikos 97 (3), p. 449

Stopové kovy a polokovy v komunitných záhradách Bratislavy: koncentrácie, bioprístupnosť a hodnotenie zdravotných rizík

Zuzana Pilková, Edgar Hiller

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra geochémie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; pilkova13@uniba.sk

Abstract

Trace metals and metalloids in community gardens of the city of Bratislava: concentrations, bioaccessibility and health risk assessment

Urban community gardens are green spaces, which serve the main purpose of providing an alternative source of vegetables for inhabitants of the city. Gardening in urban environment has its risks, which need to be investigated in order to assure the safety of participants. Concentration of urban metal(loid)s (Cu, Zn, Pb and Sb) in garden soils exceeded the legislation limits for agricultural soils significantly in two community gardens. There was a decreasing trend in bioaccessibility of trace elements during intestinal phase of the SBET test. Potential health risk assessment was done by comparing tolerable daily doses (TDD) with estimated trace element intake from soil and vegetable ingestion using intestinally bioaccessible concentrations. Estimated trace element intake did not exceed the TDD values for any of the elements, which means there are no health risks associated with gardening practices and consumption of tomatoes and lettuce grown in community gardens.

Keywords: *metals; metalloids; community gardens; bioaccessibility; health risk assessment*

Úvod a formulácia cieľa

Mestské komunitné záhrady predstavujú verejné priestory, využívané skupinou obyvateľov, najčastejšie susedov, ktoré primárne slúžia na pestovanie zeleniny [1]. Komunitné záhrady plnia aj ďalšie vedľajšie funkcie a výhody, ako napríklad rekreácia, budovanie medziľudských vzťahov, environmentálna výchova a celkové zlepšenie životného štýlu prostredníctvom fyzickej aktivity v záhrade a zvýšenej konzumácie zeleniny. Okrem uvedených benefitov sa s komunitnými záhradami v mestách spájajú aj potenciálne zdravotné riziká v podobe prítomnosti znečisťujúcich chemických prvkov a zlúčenín, ktoré môžu prestupovať z pôdy do pestovaných plodín [2]. Obyvatelia môžu byť týmto vystavení zdravotnému riziku v dôsledku zvýšených koncentrácií polutantov aj dermálnou a alimentárnou cestou.

Bioprístupnosť predstavuje frakciu celkovej koncentrácie látky v matrici, ktorá je pôsobením fyziologických procesov vstrebateľná pre organizmus [3]. Poznanie bioprístupnej frakcie približuje reálnu expozíciu organizmu škodlivým látkam, pričom je ďalej možné približne stanoviť potenciálne zdravotné riziká plynúce z kontaktu so skúmanými znečistenými matricami.

Sledovanie koncentrácií stopových kovov a polokovov v pôdach komunitných záhrad

a pestovanej zelenine poskytuje obraz o rizikovosti komunitných aktivít v mestách.

Cieľmi tejto práce sú: i) získanie prehľadu o koncentráciách stopových prvkov v pôdach a zelenine komunitných záhrad, ii) stanovenie gastrickej a gastrointestinálnej bioprístupnosti vybraných prvkov v pôdach a zelenine, a iii) výpočet zdravotných rizík plynúcich z konzumácie z náhodnej ingescie pôdy a konzumácie dopestovanej zeleniny, pre deti a dospelých.

Materiál a metódy

Spolu bolo z desiatich komunitných záhrad odobraných 33 pôdných vzoriek z hĺbky 0–10 cm, deväť vzoriek plodov paradajok a tri vzorky šalátových listov. Všetky vzorky boli voľne vysušené, pôdy presitované na <2 mm a <250 µm a zelenina rozdrvená na prášok. Frakcia <250 µm sa vyznačuje vysokou priľnavosťou k pokožke, čo je aj dôvodom k jej využitiu na účely testovania bioprístupnosti. Vzorky boli podrobené totálnemu rozkladu v HClO₄ a HF, a analyzované pomocou hmotnostnej spektrometrie s indukčne viazanou plazmou (ICP-MS). Test bioprístupnosti v gastrickej fáze bol realizovaný premiešavaním 0,5 g vzorky po dobu jednej hodiny pri 37°C v 50 ml 0,4 M roztoku glycínu okyslenom na pH 1,5 pomocou HCl, čo predstavuje simuláciu žalúdočného trávenia. Pre simuláciu intestinálneho trávenia bol roztok zneutralizovaný pomocou práškového NaHCO₃, a ďalej bol premiešavaný po dobu troch hodín pri zachovanej teplote [4]. Výpočet denného príjmu (DP) prvkov bol realizovaný podľa metodiky US EPA [5], ktorá zohľadňuje koncentráciu (C) daného prvku v zelenine a pôde, denný príjem zeleniny (DPZ), mieru ingescie pôdy (MIP) a telesnú hmotnosť dieťaťa a dospelého človeka (TH) podľa vzorcov [I.] a [II.].

$$DP_{zelenina} = \frac{C_{zelenina} DPZ}{TH} \quad [I.]$$

$$DP_{pôda} = \frac{C_{pôda} MIP}{TH} \quad [II.]$$

Vypočítané hodnoty denného príjmu z pôdy a zeleniny boli po sčítaní porovnané s tolerovateľnými dennými dávkami (TDD) prvkov [6].

Výsledky a diskusia

Mediánové koncentrácie skúmaných prvkov vo frakciách <2 mm (<250 µm) v pôde sú nasledovné: 8,05 (9,12) mg/kg pre As; 0,11 (0,16) mg/kg pre Cd; 7,07 (8,36) mg/kg pre Co;

37,2 (43,65) mg/kg pre Cr; 25,7 (30,52) mg/kg pre Cu; 20 (21,86) mg/kg pre Ni; 25,2 (23,53) mg/kg pre Pb; 1,47 (1,8) mg/kg pre Sb; 53,2 (59,87) mg/kg pre V a 101 (118,24) mg/kg pre Zn. Vo väčšine prípadov nedošlo k prekročeniu koncentrácií stopových prvkov v pôdach (<2 mm) na základe Vyhlášky č. 59/2013 Z. z. [7], no boli zaznamenané aj anomálne hodnoty viažuce sa na konkrétne záhrady. Vo vinici a mobilnej záhrade na Pionierskej boli stanovené zvýšené koncentrácie Cu v pôvodnej pôde (medián 148,06 mg/kg), čo môže byť dôsledkom dlhoročnej tradície pestovania viniča, a s tým spojené používanie fungicídov na báze medi. Vo Vodárenskej záhrade boli namerané zvýšené koncentrácie Pb (161 mg/kg), Sb (2,56 mg/kg) a Zn (357 mg/kg) v skleníku, ktorý bol v minulosti zavážaný odpadovým popolom zo spaľovania hnedého uhlia.

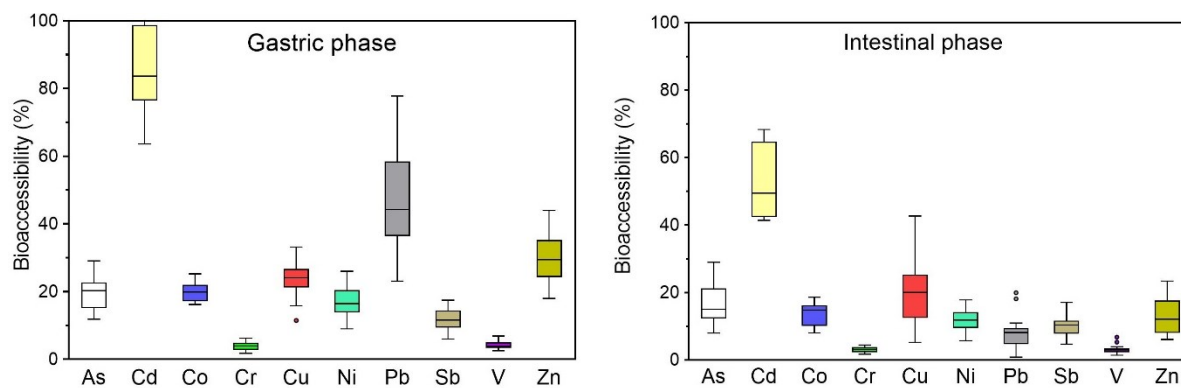
Mediánové koncentrácie stopových prvkov v *paradajkách* a *šaláte* vo vysušenom stave boli nasledovné: 0,02 a 0,17 mg/kg pre As; 0,05 a 0,19 mg/kg pre Cd; 0,02 a 0,07 mg/kg pre Co; 0,12 a 0,81 mg/kg pre Cr; 4,85 a 6,48 mg/kg pre Cu; 0,15 a 0,58 mg/kg pre Ni; 0,06 a 0,41 mg/kg pre Pb; 0,01 a 0,04 mg/kg pre Sb; 0,26 mg/kg pre V (v paradajkách pod detekčným limitom), a 17,68 a 50,26 mg/kg pre Zn. V šalátových listoch boli zistené rádovo vyššie koncentrácie niektorých prvkov v porovnaní s plodmi paradajok, čo môže byť vysvetlené viacerými faktormi. Obsah prvkov v tele rastliny má klesajúci trend v smere koreň > nadzemné časti > plody. Ďalšími pôsobiacimi faktormi je vysoká miera evapotranspirácie rastlín z čeľade *Brassicaceae*, a tým aj intenzívnejšia miera akumulácie prvkov v listoch, a v poslednom rade aj akumulácia znečisťujúcich látok na povrchu listov a ich prestup do vnútra listov cez kutikuly.

Koncentrácie stopových prvkov v zelenine boli posudzované na základe limitov Cd a Pb podľa rozhodnutí Európskej komisie [8, 9], nakoľko pre ostatné prvky neboli stanovené limity pre ich obsah v zelenine. Koncentrácie Cd a Pb v čerstvom stave neprekročili najnovšie stanovené limity (limit pre Cd v listovej/plodovej zelenine 0,1/0,02 mg/kg v čerstvom stave, a pre Pb 0,3/0,05 mg/kg v čerstvom stave).

Test bioprístupnosti ukázal klesajúci trend miery bioprístupnosti stopových prvkov v pôdach v poradí: Cd (85,2%) > Pb (47,9%) > Zn (29,8%) > Mn (26,4%) = Cu (24,1%) > Co (19,8%) = As (19,4%) > Ni (16,8%) > Sb (11,7%) > V (4,14%) = Cr (3,84%) > Fe (3,09%) v gastrickej fáze a Cd (52,2%) > Cu (19,8%) > As (17,1%) > Co (13,8%) = Zn (13,4%) > Ni (11,9%) > Sb (10,1%) > Mn (8,67%) = Pb (8,17%) > V (3,11%) = Cr (3,01%) > Fe (1,09%) v intestinálnej fáze (Obr. 1).

Kvôli nízkym koncentráciám ostatných prvkov v zelenine bolo možné stanoviť bioprístupnosť iba pre Cu, Fe, Mn a Zn. Gastrická a intestinálna bioprístupnosť klesala v

rovnakom poradí: Cu (51,3%/42,4%) > Mn (42,2%/21,6%) = Zn (41%/22,5%) > Fe (32,8%/12,8%). Bioprístupnosť kadmia bolo možné stanoviť iba v šaláte, kde malo najvyššiu mieru bioprístupnosti zo všetkých prvkov (90%/79,4%).



Obr. 1 Miera bioprístupnosti (%) stopových prvkov v pôde (<250 µm) v gastrickej (vľavo) a intestinálnej fáze (vpravo)

Mobilitu kovov a polokovov významne ovplyvňuje pH prostredia, oxidy Fe/Mn a obsah ílovitých častíc v pôde. Významný pokles miery bioprístupnosti kovov pri prechode z gastrickej na intestinálnu fázu je dôsledkom neutralizácie kyslého pH žalúdočnej kyseliny, pri čom dochádza k opätovnému vyzrážaniu kovov na oxidoch Fe/Mn pôdnej matrice. Polokovy As a Sb sa správajú geochemicky odlišne, pri nízkom pH sa ich mobilita znižuje. Zvýšenú mobilitu pri neutrálnom pH ovplyvňuje adsorpcia na oxidoch Fe/Mn. Významne nezmenená bioprístupnosť Cr a Cu v oboch fázach môže byť následkom tvorby komplexov s glycínom, ktoré sú pri neutrálnom pH mobilné [10].

Vyhodnotenie potenciálnych nekarinogénnych zdravotných rizík vyplývajúcich z náhodnej ingescie pôdy a konzumácie dopestovanej zeleniny bolo realizované pomocou maximálnych tolerovateľných denných dávok (TDD) pre všetky skúmané prvky. Vyhodnotenie denných príjmov vypočítaných z totálnych a bioprístupných koncentrácií prvkov je uvedené v Tab. 1.

Tab. 1 Vypočítané denné dávky kovov a polokovov z príjmu zeleniny a náhodnej ingescie pôdy v porovnaní s TDD; DP_T – denný príjem z totálnej koncentrácie, DP_{BIO} – denný príjem z intestinálnej fázy biopristupnosti. Prvky písané kurzívou boli hodnotené iba v súvislosti s ingesciou pôdy kvôli hodnotám pod detekčným limitom pre biopristupnosť v zelenine

Prvok	TDD (mg/kg·d)	Dospelí		Deti	
		DP _T	DP _{BIO}	DP _T	DP _{BIO}
<i>As</i>	2.10×10^{-3}	1.07×10^{-4}	4.43×10^{-6}	3.24×10^{-4}	2.40×10^{-5}
<i>Cd</i>	3.60×10^{-4}	1.17×10^{-4}	6.30×10^{-6}	2.56×10^{-4}	1.56×10^{-5}
<i>Co</i>	2.30×10^{-4}	5.59×10^{-5}	2.05×10^{-6}	2.03×10^{-4}	1.76×10^{-5}
<i>Cr</i>	0.3	5.70×10^{-4}	1.38×10^{-5}	1.65×10^{-3}	4.41×10^{-5}
<i>Cu</i>	0.5	4.62×10^{-3}	1.60×10^{-4}	1.08×10^{-2}	4.63×10^{-4}
<i>Fe</i>	0.8	9.66×10^{-2}	1.76×10^{-3}	0.404	6.29×10^{-3}
<i>Mn</i>	0.16	2.57×10^{-2}	7.51×10^{-4}	6.13×10^{-2}	2.13×10^{-3}
<i>Ni</i>	1.30×10^{-2}	3.92×10^{-4}	4.24×10^{-6}	1.07×10^{-3}	3.65×10^{-5}
<i>Pb</i>	3.60×10^{-3}	3.13×10^{-4}	6.41×10^{-6}	1.19×10^{-3}	5.52×10^{-5}
<i>Sb</i>	8.60×10^{-4}	3.27×10^{-5}	3.29×10^{-7}	8.85×10^{-5}	2.83×10^{-6}
<i>V</i>	2.50×10^{-2}	2.13×10^{-4}	2.83×10^{-6}	9.86×10^{-4}	2.43×10^{-5}
<i>Zn</i>	1.0	4.21×10^{-2}	1.09×10^{-3}	9.29×10^{-2}	2.58×10^{-3}

Z vypočítaných hodnôt DP pre deti a dospelých je zrejmé, že z expozície pôde v komunitných záhradách a konzumácie dopestovaných paradajok a šalátu nevyplývajú zdravotné riziká, a skúmané druhy zeleniny sú bezpečné na pravidelnú konzumáciu.

Záver

Analýza pôd a zeleniny komunitných záhrad v Bratislave ukázala lokálne zvýšené znečistenie Cu, Pb, Sb a Zn v komunitných záhradách Pionierska a Vodárenská, spôsobené s ošetrovaním viniča pesticídmi a nesprávnym nakladaním s popolom zo spaľovania hnedého uhlia. Koncentrácie Cd a Pb v paradajkách a šaláte neprekračujú aktuálne limity stanovené Európskou komisiou. Z *in vitro* testu biopristupnosti vyplýva znížená biopristupnosť stopových kovov v intestinálnej fáze, čo je spôsobené re-adsorpciou prvkov na oxidy Fe/Mn prítomné v pôdnej matrici. Výpočet potenciálneho príjmu stopových prvkov z konzumácie pestovanej zeleniny a prác v záhrade, a jeho porovnaním s TDD pre každý prvok, ukázal, že z daných aktivít nevyplývajú zdravotné riziká. Naopak, z doterajších výsledkov vyplýva, že práca v záhrade a zvýšená konzumácia dopestovaných produktov pôsobí prospešne na životný štýl participantov.

PodĎakovanie

Táto štúdia bola financovaná projektami APVV-17-0317, APVV-21-0212, VEGA No. 1/0362/22, UK/09/2021, UK/42/2022, UNCE/SCI/006 (Center for Geosphere Dynamics) a vďaka Operačnému programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt Zvýšenie kapacít a

kompetencií Univerzity Komenského vo výskume, vývoji a inováciách, ITMS2014+: 313021BUZ3, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Guitart D., Pickering C., Byrne J. (2012) Urban For. Urban Green. 11, p. 364
- [2] Al-Delaimy W. K., Webb M. (2017) Curr. Environ. Health Rep. 4, p. 252
- [3] Ruby M. V. (2004) Hum. Ecol. Risk Assess. 10, p. 647
- [4] Poggio L., Vrščaj B., Schulin R., et al. (2009) Environ. Pollut. 157, p. 680
- [5] USEPA (2011) Exposure factors handbook, 2011 edn. National Center for Environmental Assessment, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. (EPA/600/R-09/052F)
- [6] Hiller E., Pilková Z., Filová L., et al. (2022) Chemosphere, 305, p. 135499
- [7] Vyhláška č. 59/2013 Z. z., Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky z 11. marca 2013, ktorou sa mení a dopĺňa vyhláška Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky č. 508/2004 Z. z., ktorou sa vykonáva § 27 zákona č. 220/2004 Z. z. o ochrane a využívaní poľnohospodárskej pôdy a o zmene zákona č. 245/2003 Z. z. o integrovanej prevencii a kontrole znečisťovania životného prostredia a o zmene a doplnení niektorých zákonov, s. 4
- [8] EU 2021/1323 (2021) Commission Regulation (EU) 2021/1323 of 10 August 2021 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in certain foodstuffs. <http://data.europa.eu/eli/reg/2021/1323/oj>
- [9] EU 2021/1317 (2021) Commission Regulation (EU) 2021/1317 of 9 August 2021 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of lead in certain foodstuffs. <http://data.europa.eu/eli/reg/2021/1317/oj>
- [10] Mendoza C. J., Garrido R. T., Quilodran R. C., et al. (2017) Chemosphere 176, p. 85

Vplyv medi na rast a fotosyntetické pigmenty žaburinky menšej (*Lemna minor* L.)

Pavína Eliška Šotek¹, Milan Novák², Ammara Nawaz¹, Marianna Molnárová¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra environmentálnej ekológie a manažmentu krajiny, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 84215 Bratislava, Slovenská republika; liscakova5@uniba.sk

²Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin, Kamýcká 129, 165 21 Praha, Česká republika

Abstract

The effect of copper (Cu) on the growth and photosynthetic pigments of duckweed (*Lemna minor* L.)

As a macrophyte, the common duckweed (*Lemna minor*) is a suitable potential accumulator for various metals. In our study, we focused on the effect of Cu on this plant, exposing it to concentrations 0; 0.001; 0.1; 1; 10 and 100 mg Cu·l⁻¹. Our results show that both the number of fronds and their area and subsequently the content of photosynthetic pigments decreased with increasing Cu concentration. The highest inhibition occurred for the area of fronds and their number at 10 mg Cu·l⁻¹. Photosynthetic (PS) pigments were inhibited the most at 0.1 mg Cu·l⁻¹, however with the higher Cu presence all the measured PS pigments increased and rested at the maximum of around 0.08 µg·mg⁻¹ fresh biomass (FM) for chlorophyll *a*, 0.06 µg·mg⁻¹ FM for chlorophyll *b*, and 0.34 µg·mg⁻¹ FM for total carotenoids. A statistically significant change compared to the control was observed especially in chlorophyll *a* and chlorophyll *b*. Duckweed could be suitable for phytoremediation of Cu contaminated waters.

Keywords: duckweed; phytoremediation; copper; chlorophyll *a*; total carotenoids; fronds

Úvod a formulácia cieľa

Znečistenie pôdy a vody potenciálne nebezpečnými/toxickými prvkami, predovšetkým iónmi ťažkých kovov, sa stalo jedným z najzávažnejších environmentálnych problémov súčasnosti. Hoci Cu patrí medzi esenciálne prvky pre fotosyntetické organizmy, jej koncentrácia medzi 20 až 100 mg.kg⁻¹ v sušine je pre väčšinu rastlín toxická [1]. Cu je prvok, ktorý sa zúčastňuje oxidačno-redukčných reakcií v bunke, je súčasťou mnohých bunkových metabolických dráh, ako aj proteínov. Okrem jej pre bunku prospešnej úlohy však môže tiež prispievať k zvyšovaniu úrovne prooxidantov na úkor antioxidantov, čo môže viesť aj k zvýšeniu úrovne oxidačného stresu v celom organizme. Známa je napr. účasť mednatých iónov na tvorbu vysoko reaktívnych hydroxylových radikálov v tzv. Fentonovej reakcii [2]. Zvyšovaním hladiny voľných radikálov môže spôsobiť oxidáciu proteínov a peroxidáciu lipidov, čím môže narušiť funkciu dôležitých enzýmov alebo integritu bunkových membrán [3]. Okrem toho môže nahrádzať Mg v chlorofyle a následne inhibovať tvorbu fotosyntetických pigmentov, a spolu so zvýšenou úrovňou oxidačného stresu viesť k celkovej inhibícii rastu rastliny [4].

Žaburinka menšia (*L. minor*) je odporúčaná ako modelový organizmus pre testy ekotoxicity látok medzinárodnými a národnými normami [5-7]. Využíva sa na sanáciu znečisteného územia, na elimináciu fosforu, dusíka či rozpustených solí, no zároveň dokáže dobre eliminovať aj Cu a Zn z kontaminovaných odpadových vôd [8]. V rámci tejto štúdie sme sa zamerali na sledovanie vplyvu Cu na rast *L. minor* spolu s vplyvom na hladinu fotosyntetických pigmentov (chlorofylu *a*, chlorofylu *b*, celkových karotenoidov), pričom výsledok by mal slúžiť pre posúdenie vhodnosti tejto rastliny na účel fytoremediácie kontaminovaných vôd s vysokou koncentráciou Cu.

Materiál a metódy

Ako modelovú testovaciu rastlinu sme použili žaburinku menšiu (*Lemna minor* L.), ktorá pochádza zo zdrže kanálovej vody pri cyklistickej trase vo vinohradoch popri ceste II. triedy č. 502 (GPS súradnice sú 48° 13' 30.6407764" N a 17° 11' 9.0251239" E). Vzorku odobrala Mgr. Alexandra Filová, PhD. dňa 18.6.2017, rastlinu identifikovala a potvrdila aj botanička RNDr. Jana Ružičková, PhD. z Katedry environmentálnej ekológie a manažmentu krajiny PríF UK v Bratislave. Zásobná kultúra žaburinky menšej sa udržiava a množí v laboratórnych podmienkach u nás na pracovisku v Steinbergovom médiu, modif. podľa Altenburgera (výsledná koncentrácia v mmol.dm⁻³: 3,461 KNO₃; 0,661 KH₂PO₄; 0,072 K₂HPO₄; 0,406 MgSO₄·7H₂O; 1,249 Ca(NO₃)₂·4H₂O; a mikroelementy v μmol.dm⁻³: 1,94 H₃BO₃; 0,63 ZnSO₄·7H₂O; 0,18 Na₂MoO₄·2H₂O; 0,91 MnCl₂·4H₂O; 2,81 FeCl₃·6H₂O; 4,03 Na₂EDTA·2H₂O; výsledné pH 8,30 ± 0,05) [9, 10]. Rastie pri osvetlení 19 000 luxov (247 μE.s⁻¹.m⁻²) pri teplote 24 ± 1 °C pri svetelnom režime 16 hod svetla a 8 hod tmy. Všetky použité chemikálie boli p.a. čistoty, z firmy Lachema, Brno, Česká republika.

Kultivačným médiom pre testovanie účinkov Cu na *L. minor* bola 24 hod odstáta vodovodná voda (72,6 mg Ca.l⁻¹; 17,7 mg Mg.l⁻¹; voľný Cl <0,02 mg.l⁻¹; pH 7,06 ± 0,05). Cu sme testovali vo forme CuCl₂·2H₂O (p.a., Merck, Nemecko), v koncentráciách od 0 do 100 mg.l⁻¹ (0; 0,001; 0,1; 1; 10; 100). V každej 250 ml kadičke bolo 200 ml odstátej vody, 5 rastlín, a celkový počet frondov bol 15 na kadičku. Pre každú koncentráciu boli použité tri paralelné vzorky. Jednotlivé kadičky sme obalili do čierneho papiera, aby svetlo prenikalo ku koreňom iba zhora a na vrch sme dali Petriho misku. Rastliny rástli 8 dní pri osvetlení 1 440 luxov pri teplote 24 ± 1 °C pri svetelnom režime 16 hod svetla a 8 hod tmy. Počas testu sme po 1., 2., 3., 4., 7. a 8. dni počítali frondy *L. minor* a uvádzame to ako výsledný súčet zo všetkých paralelných vzoriek. Zároveň sme v tieto dni fotografovali jednotlivé kadičky

zhora na vyhodnotenie plochy frondov pomocou softvéru ImageJ, v. 13.0.6. (National Institutes of Health, Bethesda, USA).

Po uplynutí 8 dní sme rastliny odobrali a približne 30 mg z nich homogenizovali s 3 ml 95 % etanolu v trecej miske do úplného odfarbenia zvyškov frondov v homogenáte. Potom sme vzorku zliali do 12 ml plastovej skúmavky, ešte raz zvortexovali, a scentrifugovali pri 2900 g na 2 min. Po centrifugácii sme supernatant opatrne oddelili od peletu a dali do vopred pripravených čistých skúmaviiek. Zmerali sme absorbanciu supernatantu na UV-VIS spektrofotometri (UV-1600PC, VWR, Čína) pri 470, 649 a 665 nm oproti slepej vzorke (95 % etanol) a obsah jednotlivých fotosyntetických pigmentov vypočítali podľa nasledovných rovníc [11]:

$$chlorofyla(C_a) = 13,95xA(665nm) - 6,88xA(649nm) \quad (1)$$

$$chlorofylb(C_b) = 24,96xA(649nm) - 7,32xA(665nm) \quad (2)$$

$$celkovékarotenoidy(C_{x+c}) = \frac{1000xA(470nm) - 2,05x(C_a) - 114,8x(C_b)}{245} \quad (3)$$

Množstvo pigmentu sa potom prepočítal na $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ čerstvej biomasy. Z vyhotovených fotografií sme pomocou programu *ImageJ* (v. 13.0.6.; USA) vyhodnotili plochu frondov [12]. Rastovú rýchlosť rastu plochy frondov r sme vypočítali ako [10]:

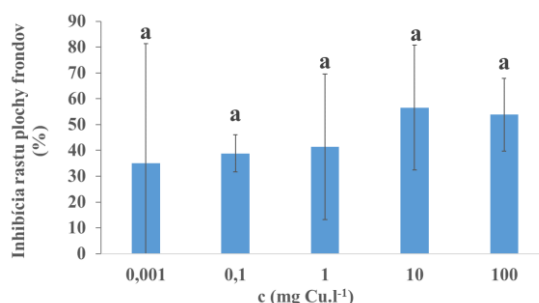
$$r = \frac{\ln(x(t_2)) - \ln(x(t_1))}{t_2 - t_1} \quad (4)$$

kde r je rastová rýchlosť za deň v jednotkách d^{-1} , $x(t_1)$ hodnota plochy frondov na začiatku pokusu (mm^2), $x(t_2)$ hodnota plochy frondov na konci pokusu (mm^2), $t_2 - t_1$ je čas medzi prvým a posledným dňom pokusu (d). Výsledky sme vyhodnotili v programe Statistica (v.12.0; USA) pomocou jednofaktorovej analýzy rozptylu (ANOVA) s Fisherovým LSD *post hoc* testom ($p < 0,05$).

Výsledky a diskusia

Na Obr. 1 je znázornená závislosť inhibície rastu plochy frondov v prítomnosti Cu, pričom pre kontrolu bola nameraná rastová rýchlosť $0,080 \text{ mm}^2/\text{d}$, čo predstavuje 0 % inhibície. Síce sme so zvyšujúcou sa koncentráciou Cu pozorovali vyššiu inhibíciu rastu plochy frondov, ale tieto hodnoty neboli štatisticky významné. Najvyššiu inhibíciu rastu plochy (56,6 %) sme zistili pri 10 mg Cu.l^{-1} (Obr. 1). Iní autori pozorovali inhibíciu rastu, ale aj obsahu

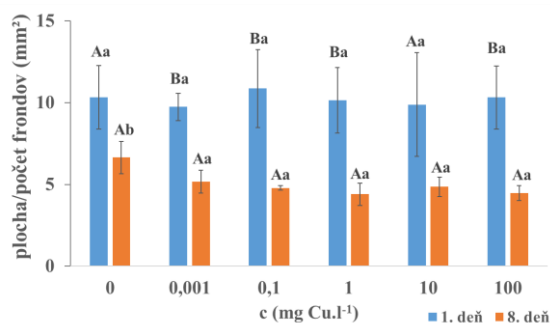
fotosyntetických pigmentov až od koncentrácie $0,6 \text{ mg Cu} \cdot \text{l}^{-1}$ [13]. Pri pokuse s *L. minor*, ku ktorej sa pridalo 100 a $150 \text{ } \mu\text{g Cu} \cdot \text{l}^{-1}$ v podobe nanočastíc (CuO) bol rozdiel plochy frondov medzi kontrolou a $100 \text{ } \mu\text{g Cu} \cdot \text{l}^{-1}$ len 4% , ale po pridaní $150 \text{ } \mu\text{g Cu} \cdot \text{l}^{-1}$ došlo až k 48% inhibícii [14].



Obr. 1. Závislosť inhibície rastu plochy frondov od koncentrácie (c) Cu.

V grafe sú uvedené aritmetické priemery s ich smerodajnou odchýlkou (SD). Písmená predstavujú výsledky Fisherovho LSD testu ($p < 0,05$), predstavujúce štatisticky významné rozdiely medzi koncentraciami Cu.

Celková plocha frondov v pomere k počtu frondov bola po 8 dňoch štatisticky významne znížená už pri najnižšej testovanej koncentrácii Cu (Obr. 2). Zároveň približne o polovicu sa znížil sledovaný ukazovateľ po ôsmich dňoch pokusu v porovnaní s prvým dňom pokusu vo všetkých koncentráciách počnúc $0,1 \text{ mg Cu} \cdot \text{l}^{-1}$ (Obr. 2).

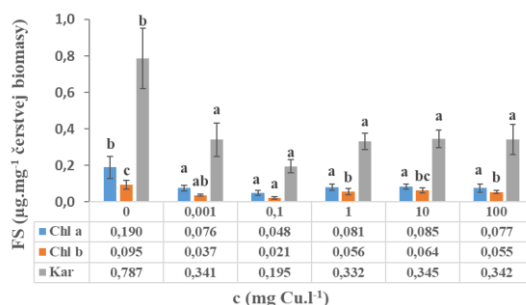


Obr. 2. Závislosť plochy frondov a ich počtu po 1. a 8. dni merania pri rôznych koncentráciách Cu.

V grafe sú uvedené aritmetické priemery s ich smerodajnou odchýlkou (SD). Písmená predstavujú výsledky Fisherovho LSD testu ($p < 0,05$), kde malé písmená predstavujú štatisticky preukázateľné rozdiely medzi koncentraciami Cu v rámci jedného dňa; a veľké písmená predstavujú štatisticky významné rozdiely medzi 1. a 8. dňom v rámci jednej koncentrácie Cu.

Hladina fotosyntetických pigmentov (chlorofylu *a*, chlorofylu *b* a celkových karotenoidov) sa v prítomnosti Cu významne znižovala (Obr. 3), pričom pri väčšine koncentrácií bol rozdiel oproti kontrole štatisticky významný. Najvýraznejší pokles pigmentov sme pozorovali pri celkových karotenoidoch. Štatisticky významný pokles v prítomnosti Cu bol zistený aj pri chlorofyle *b*, pričom jeho koncentrácia klesala do koncentrácie $0,1 \text{ mg Cu} \cdot \text{l}^{-1}$

(o 78 % oproti kontrole), ale pri vyšších koncentráciách sa ustálila na hodnote okolo 0,05-0,06 $\mu\text{g Chl } b \cdot \text{mg}^{-1}$ sušiny. Zároveň sa ustálila aj koncentrácia chlorofylu *a* na hodnote okolo 0,08 $\mu\text{g Chl } a \cdot \text{mg}^{-1}$ sušiny (Obr. 3). V práci Hou a kol. [15] pozorovali po pridaní 0,05 $\text{mg Cu} \cdot \text{l}^{-1}$ miernu stimuláciu (1 %) chlorofylu *a* a chlorofylu *b*, avšak pri vyšších koncentráciách dochádzalo už k inhibícii ich koncentrácie. Na rozdiel od našich výsledkov bol však obsah karotenoidov najnižší zo všetkých fotosyntetických pigmentov [15]. Vyššie obsahy FS pigmentov pri vyšších koncentráciách v porovnaní s 0,1 $\text{mg Cu} \cdot \text{l}^{-1}$, by mohli naznačovať, že si *L. minor* vytvorila pri vyšších koncentráciách obranné mechanizmy, aké majú napríklad niektoré hyperakumulátory [16, 17]. *L. minor* sa osvedčila ako hyperakumulátor pre Co [18], ako aj pre Cd [19].



Obr. 3. Koncentrácia fotosyntetických (FS) pigmentov po pridaní rôznych koncentrácií Cu.

V grafe sú uvedené aritmetické priemery s ich smerodajnou odchýlkou (SD). Písmená predstavujú výsledky Fisherovho LSD testu ($p < 0,05$), predstavujúce štatisticky významné rozdiely medzi koncentraciami Cu. Legenda: c – koncentrácia; Chl a – chlorofyl *a*; chl b – chlorofyl *b*; kar – celkové karotenoidy.

Záver

Negatívny vplyv Cu na rast aj fotosyntetické pigmenty *L. minor* bol potvrdený už pri najnižšej testovanej koncentrácii. Avšak od koncentrácie 0,1 $\text{mg Cu} \cdot \text{l}^{-1}$ sa obsah celkových karotenoidov zvýšil o 70 % oproti tejto koncentrácii, a táto hodnota sa držala aj pri vyšších testovaných koncentráciách Cu. Predpokladáme, že Cu mohla spôsobiť zvýšenie úrovne oxidačného stresu v rastline, na čo žaburinka reagovala zvýšenou syntézou karotenoidov ako možných antioxidantov na zníženie poškodenia vyvolaného prooxidantami. Ale na potvrdenie tejto teórie by bolo vhodné urobiť ešte ďalšie pokusy. *L. minor* by však mohla byť vhodnou rastlinou na akumuláciu Cu z vôd využiteľnou pri fytoremediáciách.

PodĎakovanie

Príspevok bol riešený za podpory projektu NutRisk Centre (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000845).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Cruz F. J. R., Ferreira R. L. D. C., Conceição S. S., et al. (2022) Copper Toxicity in Plants: Nutritional, Physiological, and Biochemical Aspects. In: Kimatu, J. N. (ed) *Advances in Plant Defense Mechanisms*. IntechOpen, London, The United Kingdom, p. 24
- [2] Fenton H. J. H. (1894) *J. Chem. Soc.* 65, p. 899
- [3] Ayala A., Muñoz M. F., Argüelles S. (2014) *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014, Art. No. 360438
- [4] Tanyolaç D., Ekmekçi Y., Ünalan A. (2007) *Chemosphere* 67(1), p. 89
- [5] OECD (2006a) Guidelines for the testing of chemicals. Terrestrial plant test: Seedling emergence and seedling growth test, Test 208, OECD, Paris, France
- [6] U. S. EPA (1996) Ecological effects test guidelines: Terrestrial plant toxicity, Tier I (vegetative vigor), 712-C-96-163, OPPTS 850.4150, Washington, USA
- [7] STN 83 8303 (1999) Skúšanie nebezpečných vlastností odpadov. Ekotoxikita. Skúšky akútnej toxicity na vodných organizmoch a skúšky inhibície rastu rias a vyšších kultúrnych rastlín. Bratislava, Slovenská republika
- [8] Abdel-Gawad F. K., Khalil W. K. B., Bassem S. M., et al. (2020) *Water* 12(11), p. 2983
- [9] OECD (2006b) Test No. 221: *Lemna* sp. Growth inhibition test. OECD guidelines for the testing of chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, France
- [10] STN EN ISO 20079 (júl 2008) Kvalita vody. Stanovenie toxického účinku zložiek vody a odpadovej vody na *Lemna minor* (žaburinku). Skúška inhibície rastu (ISO 20079:2005). Slovenský ústav technickej normalizácie, Bratislava, Slovenská republika, 2008
- [11] Lichtenthaler H. K., Wellburn A. R. (1983) *Biochem. Soc. Trans.* 11(5), p. 591
- [12] Fargašová A., Molnárová M., Takáčová A. (2018) *Ekotoxikológia v praxi*. Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, Slovenská republika, s. 303
- [13] Hu C., Liu L., Li X., et al. (2018) *J. Hazard. Mater.* 341(5), p. 168
- [14] Yue L., Zhao J., Yu X., et al. (2018) *Environ. Pollut.* 243, p. 543
- [15] Hou W., Chen X., Song G., et al. (2007) *Plant Physiol. Biochem.* 45(1), p. 62
- [16] Kanoun-Boulé M., Vicente J. A. F., Nabais C., et al. (2009) *Aquat. Toxicol.* 91, p. 1
- [17] Naumann B., Eberius M., Appenroth K.-J., (2007) *J. Plant Physiol.* 164(12), p. 1656
- [18] Hu D., Cheng M., Hu K., et al. (2019) *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 179, p. 79
- [19] Ozyigit I. I., Arda L., Yalcin B., et al. (2021) *Int. J. Phytoremediation* 23(12), p. 1255

Travinno-bylinné spoločenstvá k. ú. Detvianska Huta a ich manažment

Eva Švantnerová, Hubert Žarnovičan

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra environmentálnej ekológie a manažmentu krajiny, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, svantnerova15@uniba.sk

Abstract

Grassland communities of the cadastral area of Detvianska Huta village and their management

In this contribution we focused on a syntaxonomical classification of grassland communities of the cadastral area of Detvianska Huta village and their management. In 2022 we recorded a total of 48 phytocenological relevés, which include 111 species of vascular plants. The most widespread community of the studied area is *Anthoxantho odorati-Agrostietum tenuis* Sillinger 1933. Within the association, we distinguished typical and acidophilous variants. On the other hand, the grasslands of *Lolium perennis-Cynosuretum cristati* Tüxen 1937 association are rarer. In addition, we provide some information about the management obtained using a structured interview method. It includes mainly mowing, grazing (and their combinations), litter raking, ploughing, fertilizing and harrowing.

Keywords: *vegetation; Arrhenatherion elatioris; Cynosurion cristati; management*

Úvod a formulácia cieľa

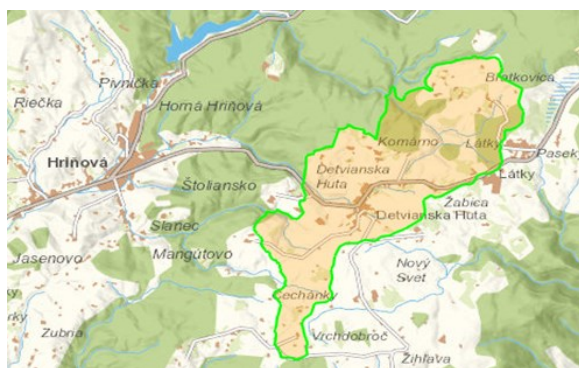
Detvianska Huta patrí medzi obce s charakteristickým lazničným osídlením. Jej okolie je tvorené rozsiahlymi lúkami a pasienkami [1]. Napriek tomu, že travinno-bylinné porasty v podhorských oblastiach nevznikli prirodzene, ich biologická hodnota je vysoká, podmienená pravidelným manažmentom [2, 3]. Ide o krajinný prvok, ktorý prispieva k udržaniu genetickej a druhovej diverzity, ako aj diverzity kultúrnej krajiny, ktorého existenciu ohrozujú manažmentové zmeny [15]. V príspevku podávame syntaxonomickú klasifikáciu travinno-bylinných spoločenstiev k. ú. Detvianska Huta a charakteristiku ich manažmentu.

Materiál a metódy

Naším záujmovým územím bolo katastrálne územie obce Detvianska Huta (Obr. 1) s výmerou 1431 ha [4]. Územie leží v juhozápadnej časti Veporských vrchov [5].

Fytocenologický prieskum porastov sme uskutočnili v júni v roku 2022 pred kosbou. Zber fytocenologických zápisov sa uskutočnil podľa zásad Züriško-Montpelliarskej geobotanickej školy [6] na plochách s veľkosťou 24 – 25 m². Fytocenologické zápisy sme uložili v programe Turboveg [7] a exportovali do programu JUICE 7.1 [8]. Pomocou programu PC-ORD [9] bola vytvorená numerická klasifikácia zápisov a využili sme Wardovu metódu, relatívnu Euklidovskú mieru vzdialenosti a odmocninovú transformáciu pokryvnosti druhov. Diagnostické druhy sme stanovili podľa Hegedúsovej Vantarovej a Škodovej [10]. Syntaxonomická klasifikácia je podporená výsledkami detrendovanej korešpondenčnej

analýzy (DCA) v programe CANOCO 5 [11]. Pre ekologickú interpretáciu ordinačných osí boli do grafu ordinačnej analýzy premietnuté ekologické faktory podľa Chytrý et al. [12]. Nomenklatúru cievnatých rastlín uvádzame podľa Marholda, Hindáka (1998) [13], názvy syntaxónov podľa Hegedúsovej Vantarovej, Škodovej [10]. Informácie o manažmente študovaných porastov sme zisťovali metódou štruktúrovaného rozhovoru [14] v októbri 2022.



Obr. 1. Katastrálne územie obce Detvianska Huta.

Výsledky a diskusia

Študované porasty sme zaradili do nasledujúcich syntaxónov:

Trieda: *Molinio-Arrhenatheretea* R. Tx. 1937

Rad: *Arrhenatheretalia* R. Tx. 1931

Zväz: *Arrhenatherion elatioris* Koch 1926

Asociácia: *Anthoxantho odorati-Agrostietum tenuis* Sillinger 1933 typický variant

Asociácia: *Anthoxantho odorati-Agrostietum tenuis* Sillinger 1933 kyslomilný variant

Zväz: *Cynosurion cristati* R. Tx. 1947

Asociácia: *Lolio perennis-Cynosuretum cristati* R. Tx. 1937

Asociácia: *Anthoxantho odorati-Agrostietum tenuis* Sillinger 1933 typický variant (34 zápisov)

Diagnostické druhy: *Alchemilla vulgaris* agg., *Dactylis glomerata*, *Rhinanthus minor*, *Trisetum flavescens*, *Vicia cracca*

Najrozšírenejšie spoločenstvo územia, ktorého fyziognómiu určujú stredne vysoké úzkolisté trávky ako napr. *Festuca rubra* agg., *Agrostis capillaris*, spolu s druhmi *Anthoxanthum odoratum*, *Phleum pratense*, *Dactylis glomerata* a kvetnaté byliny mezofilných ovsíkových lúk zväzu *Arrhenatherion elatioris* – *Leontodon hispidus*, *Ranunculus acris*, *Leucanthemum vulgare*, *Trifolium pratense* a *T. repens*. Porasty sú dvojvrstvové, druhovo stredne bohaté

(priemerne 30 druhov v zápise). Spoločenstvo porastá svahy s miernym sklonom do 15°, rôznych expozícií, v nadmorských výškach 778 – 920 m.

Asociácia: *Anthoxantho odorati-Agrostietum tenuis* Sillinger 1933 kyslomilný variant (10 zápisov)

Diagnostické druhy: *Anthoxanthum odoratum*, *Nardus stricta*, *Polygala vulgaris*, *Potentilla erecta*, *Viola canina*

Druhovo chudobnejšie porasty (priemerne 22 druhov v zápise), v ktorých z tráv úplne prevláda *Festuca rubra* agg., vyššiu účasť majú subacidofyty a acidofyty (*Steris viscaria*, *Veronica officinalis*) a nižšiu stálosť a semikvantitatívne hodnoty dosahujú druhy mezofilných ovsíkových lúk. Spoločenstvo porastá svahy s miernym sklonom prevažne do 3°, rôznych expozícií, v nadmorských výškach 781 – 935 m.

V porastoch asociácie *Anthoxantho odorati-Agrostietum tenuis* sa vyskytujú aj charakteristické druhy zväzu *Violion caninae* ako *Carex pallescens*, *Dianthus deltoides*, *Polygala vulgaris*, *Viola canina*, ako aj triedy *Molinio-Arrhenatheretea* (*Ranunculus acris*, *Rumex acetosa*, *Trifolium pratense*, *T. repens* a ďalšie). Na floristickú blízkosť asociácie *Anthoxantho odorati-Agrostietum tenuis* s asociáciou *Campanulo rutundifoliae-Dianthetum deltoidis* zo zväzu *Violion caninae* poukazujú aj Uhliarová et al. [15] a dodávajú, že uvedené druhy dosahujú len nízku pokryvnosť a nikdy v porastoch nedominuje *Nardus stricta*. Uvedené tvrdenie platí aj pre porasty z Detvianskej Huty, najmä pokiaľ ide o dominanciu psice tuhej.

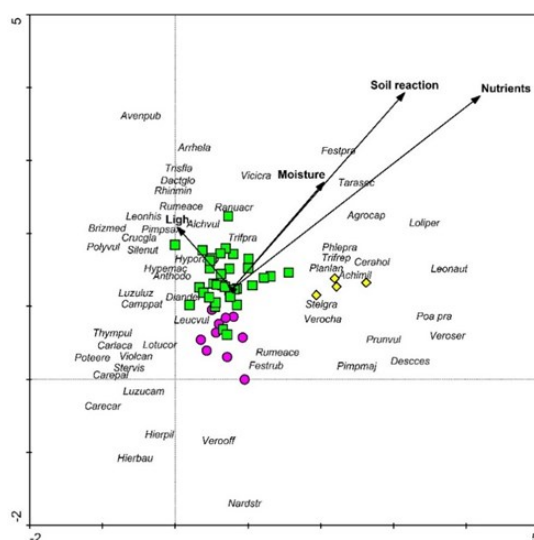
Asociáciu *Anthoxantho odorati-Agrostietum tenuis* (pod názvom *Anthoxantho-Agrostietum* Sill. 1933 em. Jurko 1969) z okolia Detvianskej Huty, z Klenovských a Balockých vrchov a Málinských vrchov opísal Miadok [16, 17, 18].

Asociácia: *Lolio perennis-Cynosuretum cristati* R. Tx. 1937 (4 zápisy)

Diagnostické druhy: *Cynosurus cristatus*, *Leontodon autumnalis*, *Poa pratensis*, *Veronica serpyllifolia*

Druhovo najchudobnejšie travinno-bylinné porasty územia (priemerne 21 druhov v zápise) manažované pastvou. Z druhov znášajúcich ohryz a zošľap sú prítomné *Lolium perenne*, *Leontodon autumnalis*, sporadicky aj *Cynosurus cristatus*, *Prunella vulgaris* a *Plantago major*. Fyziognómiu porastov určujú trávny *Poa pratensis*, *Festuca rubra* agg., *Agrostis capillaris* a leguminózy. Spoločenstvo bolo opísané na stanovištiach v nadmorskej výške 833 – 864 m.

Grafické znázornenie syntaxonomickej klasifikácie podávajú aj výsledky detrendovanej korešpondenčnej analýzy (DCA) (Obr. 2). Prvá ordinačná os pozitívne koreluje s pôdnou reakciou, pôdnymi živinami a vlhkosťou a negatívne koreluje so svetlom. V rámci asociácie *Anthoxantho odorati-Agrostietum tenuis* sa v spodnej časti grafu vyčlenili zápisy kyslomilného variantu, negatívne korelujúce s faktormi pôdna reakcia a obsah pôdných živín. V pravej časti grafu v smere rastúceho obsahu živín sa výraznejšie odčlenili zápisy asociácie *Lolio perennis-Cynosuretum cristati*. Ich vyčlenenie je ovplyvnené prirodzeným obohacovaním pôdy o živiny pasúcimi sa zvieratami. Druhá os je pozitívne korelovaná s pôdnou reakciou, živinami, vlhkosťou a svetlom.



Zelené štvorce – *Anthoxantho odorati*-*Agrostietum tenuis* typický variant, ružové body – *Anthoxantho odorati*-*Agrostietum tenuis* kyslomilný variant, žlté kosoštvorce – *Lolio perennis*-*Cynosuretum cristati*.
 Použité skratky druhov: *Agrocap* – *Agrostis capillaris*, *Achimil* – *Achillea millefolium* agg., *Alchvul* – *Alchemilla vulgaris* agg., *Anthodo* – *Anthoxanthum odoratum*, *Arrhela* – *Arrhenatherum elatius*, *Avenpub* – *Avenula pubescens*, *Brizmed* – *Briza media*, *Camppat* – *Campanula patula*, *Carecar* – *Carex caryophylla*, *Carepal* – *Carex pallescens*, *Carlaca* – *Carlina acaulis*, *Cerahol* – *Cerastium holosteoides*, *Crucgla* – *Cruciata glabra*, *Dactglo* – *Dactylis glomerata*, *Descscs* – *Deschampsia cespitosa*, *Diandel* – *Dianthus deltoides*, *Festpra* – *Festuca pratensis* agg., *Festrub* – *Festuca rubra* agg., *Hierbau* – *Hieracium bauhini*, *Hierpil* – *Hieracium pilosella* agg., *Hypemac* – *Hypericum maculatum*, *Hyporad* – *Hypochaeris radicata*, *Leonaut* – *Leontodon autumnalis*, *Leonhis* – *Leontodon hispidus*, *Leucvul* – *Leucanthemum vulgare*, *Loliper* – *Lolium perenne*, *Lotucor* – *Lotus corniculatus*, *Luzucam* – *Luzula campestris* agg., *Luzuluz* – *Luzula luzuloides*, *Nardstr* – *Nardus stricta*, *Phlepra* – *Phleum pratense*, *Pimpmaj* – *Pimpinella major*, *Pimpsax* – *Pimpinella saxifraga* agg., *Planlan* – *Plantago lanceolata*, *Poapra* – *Poa pratensis*, *Polyvul* – *Polygala vulgaris*, *Poteere* – *Potentilla erecta*, *Prunvul* – *Prunella vulgaris*, *Ranuacr* – *Ranunculus acris*, *Rhinmin* – *Rhinanthus minor*, *Rumeace* – *Rumex acetosa*, *Rumeace* – *Rumex acetosella*, *Silenut* – *Silene nutans*, *Stelgra* – *Stellaria graminea*, *Stervis* – *Steris viscaria*, *Tarasec* – *Taraxacum* sect. *Ruderalia*, *Thympul* – *Thymus pulegioides*, *Trifpra* – *Trifolium pratense*, *Trifrep* – *Trifolium repens*, *Trisfla* – *Trisetum flavescens*, *Verocha* – *Veronica chamaedrys*, *Veroof* – *Veronica officinalis*, *Veroser* – *Veronica serpyllifolia*, *Vicicra* – *Vicia cracca*, *Violcan* – *Viola canina*

Porasty asociácie *Anthoxantho odorati-Agrostietum tenuis* sú jednokosné, len v prípade zrážkovo nadpriemerného roka dvojkosné, po kosbe zvyčajne spásané. Porasty môžu byť využívané aj výlučne na extenzívnu pastvu [15]. V území je aj v súčasnosti rozšírený chov hovädzieho dobytku súkromnými obhospodarovateľmi, miestne družstvo sa venuje chovu oviec v počte do 1200 kusov. Travinno-bylinné porasty územia sa nemulčujú, vyhrabávajú sa aspoň jedenkrát ročne, v jarnom období sa bránia. Niektoré plochy sa v 5 až 8 ročných intervaloch orú, hnoja a pôda je následne využitá na pestovanie zemiakov, obilia, ovsu s prísevom hrachu. Pri zatrávňovaní sú vysievané kostravy, mätonoh a d'ateliny.

Záver

Príspevok podáva syntaxonomickú klasifikáciu travinno-bylinných spoločenstiev k. ú. Detvianska Huta a charakteristiku ich manažmentu. Najrozšírenejším spoločenstvom je asociácia *Anthoxantho odorati-Agrostietum tenuis* Sillinger 1933, v rámci ktorej sme odlišili dva varianty: typický variant reprezentuje druhovo bohatší mezofilnejší typ spoločenstva a kyslomilný variant, ktorý je druhovo chudobnejší a kyslomilnejší. Porasty asociácie *Lolio perennis-Cynosuretum cristati* Tüxen 1937 sú v území zriedkavejšie. Manažment travinno-bylinných porastov vykonávajú súkromní obhospodarovatelia a miestne družstvo. Travinno-bylinné porasty sú manažované jednou kosbou, pastvou a ich kombináciami, vyhrabávaním, bránením, hnojením a orbou. Prevažne ide o používanie tradičných manažmentových postupov, vlastných aj minulosti, s výnimkou náhrady ručnej kosby za mechanizovanú. Pokračovanie v tradičnom manažmente je predpokladom zachovania travinno-bylinných porastov územia, ich funkcií v krajine, ako aj nimi poskytovaných ekosystémových služieb.

PodĎakovanie

Za rady a pripomienky k príspevku ďakujeme Mgr. Ivete Škodovej, PhD. z Botanického ústavu SAV.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Urban P. (2015) Quaestiones rerum naturalium 2(2), p. 8.
- [2] Ružičková H., Kalivoda H. (2007) Kvetnaté lúky, Prírodné bohatstvo Slovenska. Veda vydavateľstvo SAV, Bratislava, p. 133.
- [3] Ružičková H., Ružička M., Kontriš J., et. al. (1978) Problémy biológie krajiny 23. Zborník Ústavu biológie SAV a Ústavu krajinnej ekológie ČSAV. Veda vydavateľstvo SAV, Bratislava, p. 152.

- [4] Geodetický a kartografický ústav Bratislava (2022) Mapový klient ZBGIS – Letecké a laserové skenovanie a DMR 5.0. [Citované: 8. marec 2023] <https://www.geoportal.sk/sk/zbgis/lls-dmr/?fbclid=IwAR08scsNSTlkA5NqIJeKsfDm_MvcnKSpP1KxTSs3I3XU_i-3FogP6-dgZ24>
- [5] Mazúr E., Lukniš M. (1986) Geomorfologické členenie SSR a ČSSR. Časť Slovensko. Slovenská kartografia, Bratislava.
- [6] Braun-Blanquet J. (1964) Pflanzensoziologie. Grundzüge der Vegetationskunde. Ed. 3. Springer, Wien, New York, p. 865.
- [7] Hennekens S. M., Schaminée J. H. J. (2001) J. Veg. Sci. 12, p. 589–591.
- [8] Tichý L. (2002) J. Veg. Sci. 13, p. 451.
- [9] McCune B., Meford M. J. (1999) PC-ORD Multivariate Analysis of Ecological Data. Version 4. – MjM Software Design. Gleneden Beach, Oregon, USA.
- [10] Hegedúšová Vantarová K., Škodová I. (eds) (2014) Rastlinné spoločenstvá Slovenska 5. Travinno-bylinná vegetácia. Veda, Bratislava, p. 581.
- [11] Šmilauer P., Lepš J. (2014) Multivariate analysis of ecological data using Canoco 5. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- [12] Chytrý M., Tichý L., Dřevojan, P., et al. (2018) Preslia 90, p. 83
- [13] Marhold K., Hindák F. (1998) Zoznam nižších a vyšších rastlín Slovenska. Veda, Bratislava, p. 688.
- [14] Gavora P. (2001) Úvod do pedagogického výskumu. Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, p. 236.
- [15] Uhliarová E., Janišová M., Ujházy K., et. al. (2014) Arrhenatherion elatioris. In: Hegedúšová Vantarová K., Škodová I. (eds) Rastlinné spoločenstvá Slovenska 5. Veda, Bratislava, p. 202.
- [16] Miadok D. (1984) Acta Fac. rerum. nat. Univ. Comen., Botanica 31, p. 61.
- [17] Miadok D. (1983) Biológia 38(1), p. 67.
- [18] Miadok D. (1985) Acta Fac. rerum. nat. Univ. Comen., Botanica 32, p. 91.
- [19] Janišová M., Zaliberová M., Dúbravková D., et. al. (2014) Cynosurion cristati. In: Hegedúšová Vantarová K., Škodová I. (eds) Rastlinné spoločenstvá Slovenska 5. Veda, Bratislava, p. 239.

Carbon sequestration in natural and managed forests: case study from South-Western Slovakia

Shanza Zaib, Simona Klačanová, Denisa Slabejová, Lucia Čahojová, Michaela Michalková, Jozef Šibík

Plant Science and Biodiversity Center of Slovak Academy of Sciences, v. v. i., Institute of Botany, Dúbravská cesta 9, 845 23 Bratislava, Slovak republic; shanza.zaib@savba.sk

Abstract

Forests are an important part of the planet's carbon cycle and sequester a substantial amount of the CO₂ released into the atmosphere by human activities. Rising carbon dioxide concentrations in the atmosphere could alter earth's climate system. Since natural and managed forests differ in terms of forest structure and management techniques and play different roles in the accumulation of biomass and the sequestration of carbon. The goal of this study is to quantify the carbon sequestration and biomass between natural and managed forest. From April to September 2022, we recorded data from 8 twin plots (20 m x 20 m) in both, natural and managed forests, under the same environmental conditions. By including tree height and diameter at breast height as parameters in the method of coupling biomass, we were able to estimate the current carbon stock and project sequestration potential from above ground biomass. Findings in our datasets demonstrated that the rich source of biomass and carbon sequestration was found in natural forests while comparing to managed habitat.

Keywords: *habitats; management practice; carbon sink; biomass; twin plot; climate change*

Introduction and Objectives

Forest carbon sequestration is the process by which forests absorb and store carbon dioxide (CO₂) from the atmosphere through photosynthesis. Carbon is stored in trees, graminoids, shrubs, in under and below ground biomass, roots and in the soil, keeping it out of the atmosphere and helping to mitigate climate change. Forests play a critical role in the global carbon cycle and are one of the most effective natural tools we can promote to mitigate climate change [1].

By absorbing carbon, forests help to reduce the amount of greenhouse gases in the atmosphere and slow the rate of global warming, annually forests sequester two-thirds of total terrestrial carbon sequestration [2]. In addition, forests provide a suite of services, including habitats for wildlife, clean water, and carbon storing [3].

When we compared the carbon stock between different forests (natural and planted) the amount of biomass and carbon was greater in natural forest also help in mitigation of climate change as compared to planted forest, while the species from managed plantation are responsible for the loss and homogenization of plant biodiversity. They have the potential to alter biological processes and significantly reduce the survival of native species [4].

The objective of current study is to estimate above ground biomass and carbon stock potential of natural forest with comparison of planted forest to evaluate which type of forest are better at biomass accumulation. Eventually promote natural forest as these are more effective at storing carbon than plantation forests. Natural forests have more complex and diverse ecosystems that allow for greater carbon storage in both aboveground and belowground biomass.

Materials and methods

The research area is in the Carpathian-Pannonian region. The data were collected from areas situated in South-Western Slovakia in Zahorie lowland and near Danube River at elevations ranging from 100 to 480 m a.s.l.

Three types of native forests were purposefully chosen as the most common native forest habitats replaced by black locust (*Robinia pseudoaccacia*) and *Populus canadensis* plantations. Twin plots (natural and managed forests) were already created by Slabejova [5] during previous research.

This study is based on 4 twin plots (8 plots totally). Plots were based on sample twin pairs, forest plantations and the other in a neighboring natural forest. *Robinia pseudoacacia* (black locust) was popular among beekeepers and was used for forestry and soil stabilization in addition to horticultural purposes [6]. Black locust trees significantly impact native vegetation due to their capacity to fix nitrogen [7].

To prevent the impact of local environmental variability on the forest, plots making up pairs were spaced 50–250 m apart. In addition, to remove the effect of succession, we sampled twins of similar ages using expert estimation (not too young and not too soon after clear-cut or other management). Plots were created on equal-sized (400m²) [8].

To calculate the biomass of trees and shrubs, we used a non-destructive method. For the estimation of biomass, all woody individuals with a diameter at breast height (DBH) greater than 5 cm and a height (H) greater than 5 m were chosen, small shrubs and dead wood on the ground were counted, and CO₂ flux by graminoids and herbs will be analyzed by closed chamber method in subsequent research. Leica DISTO (S910) equipment was used to measure the tree height, and measuring tape was used to measure the tree's perimeters. Biomass of the trees was estimated following the equations of Pajtik [9].

Soil samples were collected up to a depth of 15cm in each plot at three different points and thoroughly mixed for further analysis. The samples were spread out on a paper sheet, labeled, and dried at room temperature before being analyzed [10]. Using the Macherey-Nagel

reagent case for soil analysis with PF-3, the pH and fractions (nitrite, nitrate, potassium, ammonium, and phosphorus) of the soil were determined.

Result and discussion

Total 575 of woody plants were recorded from the plots of natural forest from 47 plants species while plots from planted forest consist of 1074 individual plants from 40 different species.

Plant biomass and carbon stock are higher in the natural forest than in the managed forest in all the studied plots. When compared to the biomass of planted forest, the overall distribution of tree biomass (tons) across all natural selected plots revealed promising results as shown in “Fig.1”. Ecosystem carbon pool was 17% higher in natural forest and showed the greater potential of carbon dioxide sequestration compared to the planted forest [11]. Biomass of planted forests varied greatly depending on management practices and species selection, their carbon storage potential was generally lower than that of natural forests [12].

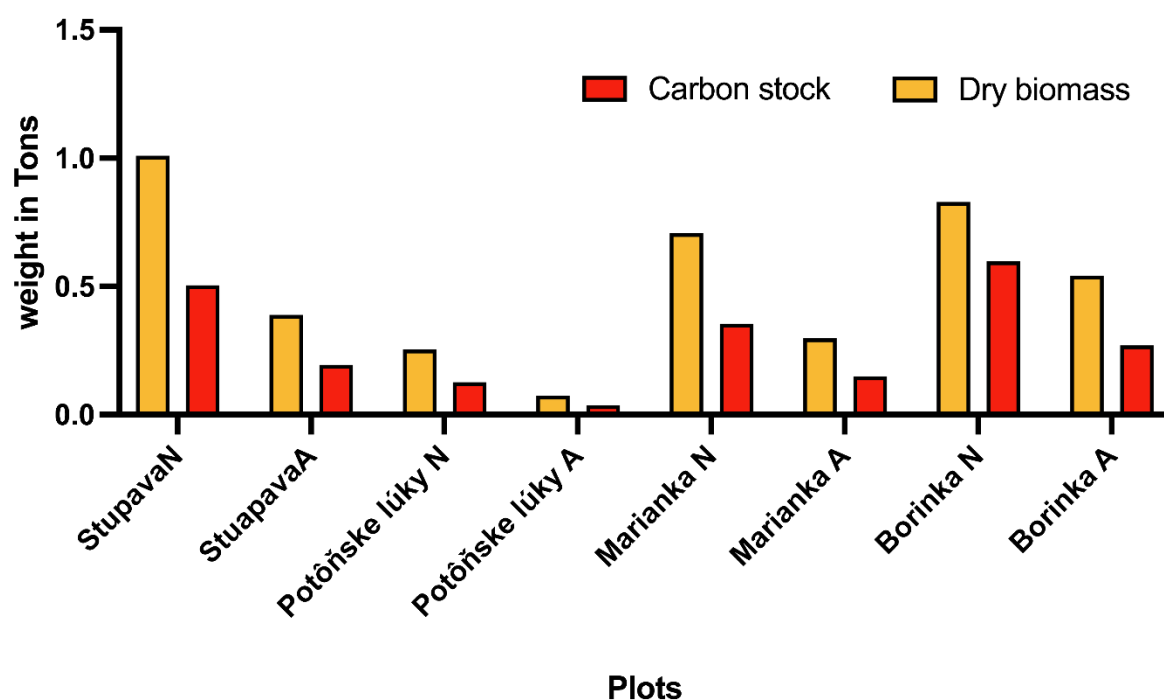


Fig. 1. Different plots showing the significant results of biomass and carbon sequestration in natural and managed forest.

A) plots in Stupava B) plots in Potôňske lúky C) plots in Marianka D) plots in Borinka.

The soil results show that the soil from planted forests has more nutrients like nitrogen, ammonium, and potassium than natural forest soil, providing more sustainability to grow alien

grasses under the planted forest species like *Solidago canadensis* as demonstrated in “Fig.2”. As Slez and Hrivn (2020) published that the significant impact was noticed in the Pannonian region where non-native species richness is linked to soil reaction. It has been demonstrated in various types of floodplain forests that variations in soil pH affect the richness of all the species in the understory. [13]. Changes in species composition and loss of plant diversity are both brought about by the conversion of native forests into alien stands. In planted stands, nitrophilous species predominate over many of the oligotrophic and acidophilus species found in native forests [14].

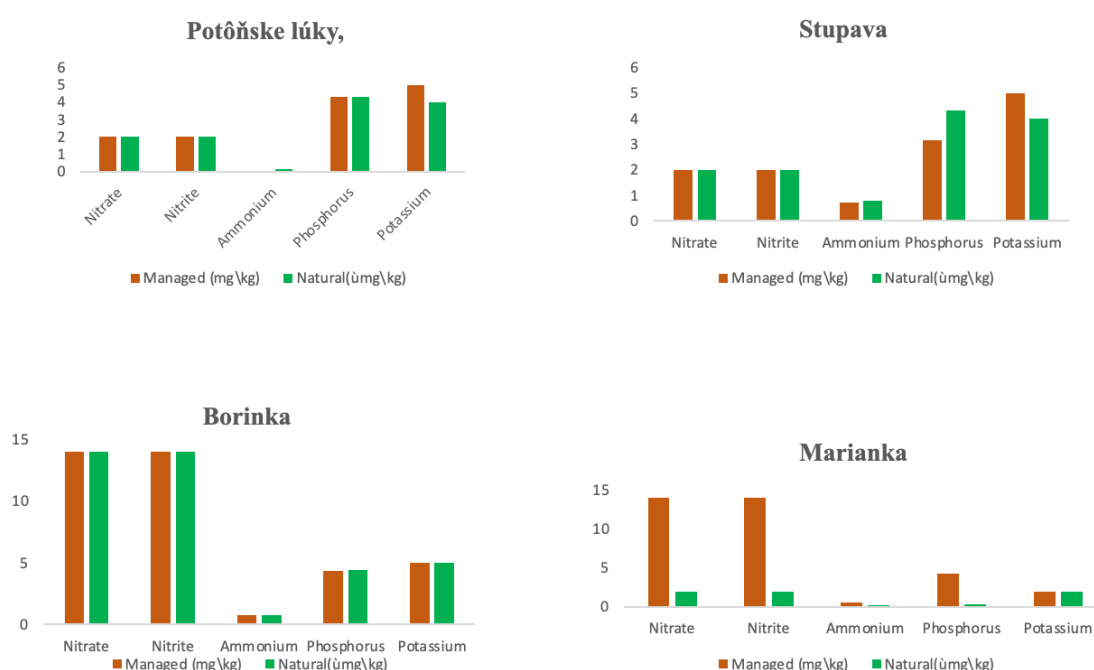


Fig. 2. Plots from Potôňske lúky, Stupava, Borinka and Marianka showing the results from soil analysis indicating presence of different nutrients in twin plots.

Conclusion

Tree height and diameter at breast height are highly related to tree biomass and carbon stock. In comparison to planted forests, current research shows that natural forests in our dataset can store relative more amount of biomass and carbon stock. From the soil analysis we analyzed that the amount of nutrient (nitrogen) is present in relatively high amount in managed forests which provide home to more alien grasses as understory vegetation.

References

- [1] Lal R (2005) For. Ecol. Manag. 220, p. 242

- [2] Post W., Emanuel W., Zinke P. (1982) *Nature*. 298, p. 156
- [3] Lindquist E. J. D., Annunzio R., Gerrand A., et al. (2012) Global forest land-use change 1990–2005. FAO forestry paper no. 169. In: Food and agriculture organization of the United Nations and European Commission Joint Research Centre. FAO, Rome
- [4] Vilà M., Espinar J. L., Hejda M. (2011) *Ecol. Lett.* 14 (7), p. 702
- [5] Plantinga A. J., Mauldin T., Miller, D. J. (1999) *Am. J. Agric. Econ.* 81(4), p. 812
- [6] Slabejová D., Bacigál T., Hegedúšová K., et al. (2019) *For. Ecol. Manag.* 439, p. 28
- [7] Jurko (1963) *Československá Ochrana Přírody*, 1, p. 56
- [8] Ferrari A. E., Wall L. G. (2007) *Biol. Fertil. Soils*, 43 (4), p. 471
- [9] Manan F., Khan S. M., Ahmad Z., et al. (2020) *Trop. Ecol.* 61, p. 509
- [10] Pajtík J., Priwitzer T., Cibula R. (2009) *J. For.*, 55(4), p. 355
- [11] Gogoi A., Ahirwal J., Sahoo U. K. (2021) *J. Environ. Manage.* 280, p.111671
- [12] Bastin J. F., Finegold Y., Garcia C., et al. (2019) *Nature*, 564(7738), p. 364
- [13] Slez M., Hrivn R. (2020) *Folia Oecol.* 47(2), p. 100
- [14] Benesperi R., Giuliani C., Zanetti S., et al. (2012) *Biodivers. Conserv.* 21, p. 3555

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA**



**eŠVK
PRIF UK
2023**

SPONZORI

**ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2023
ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV**



SNUS

eppendorf

pragolab



Lifbee
Academy

centralchem[®]
chemická obchodná spoločnosť

SYNLAB

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA**



**eŠVK
PRIF UK
2023**

REGISTER PRÍSPEVKOV

**ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2023
ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV**

BIOLÓGIA

Návrh a tvorba plazmidového konštruktu pre produkciu Lon proteázy z uropatogénneho kmeňa <i>Escherichia coli</i> KL53	9
Optimalizácia izolácie exozomálnej miRNA z ľudskej plazmy	15
Optimalizácia bioinformatickej analýzy genomickej sekvencie bakteriofágov	21
Využitie celogenómového sekvenovania pri detekcii profágov v kmeňoch čeľade <i>Lactobacillaceae</i>	27
Prvé záznamy o faune ovadov (Diptera: Tabanidae) na lokalite Ornitologický stacionár Drienovec	33
Vplyv aeróbného silového tréningu na denné rytmy aktivity u obéznych adolescentov (predbežné výsledky)	39
Brain injury in influenza A virus infected Balb/c mice is associated with dysregulated immune respons	45
Vplyv tlmeného svetla v noci na zápalovú odpoveď a expresiu hodinových génov v pečeni a tukovom tkanive.....	51
Preliminary crystallization of UL144 recombinants from different viral species and their binding to CD160 revealed by co-IP assay	57
Sledovanie imunomodulačného účinku chondroitín sulfátu a fukoidanu v podmienkach in vivo na modeli laboratórnych myší.....	63
Celogenómová analýza kmeňov <i>Listeria monocytogenes</i> izolovaných z prostredia spracovania potravín	69
Antropologická analýza kostrových pozostatkov z krypty v Katedrále Najsvätejšej Trojice v Žiline (Slovensko) – Predbežné výsledky.....	75
Vplyv ošetrovania semien jačmeňa jarného superabsorpčným polymérom na účinnosť moridla proti hubovému patogénu <i>Bipolaris sorokiniana</i>	81
Genetická príčina senzorineurálnej poruchy sluchu s dôrazom na analýzu génu STRC.....	87
Posudzovanie obvodových, hmotnostných charakteristík v súvislosti so sledovaním nadhmotnosti a obezity u detí	93
Optimalizácia metódy pre izoláciu extracelulárnych vezikúl z plazmy	99
Influence of adaptation of influenza A viruses on the immune response in the spleens of infected mice	105
Sledovanie exprese vybraných génov včasnej imunitnej odpovede po infekcii vírusu kliešťovej encefalitídy v keratinocytoch.....	111
<i>E. coli</i> bacteriophages useful for therapy of urinary tract infections	117
Sledovanie telesnej stavby žiakov staršieho školského veku (Bratislavský kraj).....	123
Degradácia PCB bionanočasticami železa z kávového odpadu pripravenými pod inertnou a vzdušnou atmosférou.....	129
Porovnanie monokultúr hybridných topoľov (<i>Populus x canadensis</i>) a lužných lesov z hľadiska diverzity podrastu.....	135

Úloha mozogčka v naučenej vokálnej komunikácii dospelých spevavcov	141
Effect of Gestational Dim Light at Night on Pregnancy Outcomes and Offspring Development in Laboratory Rat.....	147
Vybrané telesné parametre a parametre minerálnej kostnej denzity u žien trpiacich astmou	153
Vplyv rekreačnej športovej aktivity na obsah minerálov v kostiach u mladých dospelých ..	158
Hodnotenie arteficiálneho presahu na plantograme vzhľadom na konkrétne oblasti plantogramu.....	164
Bioaktívne komplexy prechodných kovov na báze chinazolinónov – ich interakcie s DNA ľudských buniek ovplyvnených H ₂ O ₂ in vitro.....	170
Katechín prehľbuje účinok azolov proti patogénnym kvasinkám <i>Candida glabrata</i>	176
Krvné parazity radu Haemosporida (krvinkovky) a ich možný vplyv na fyziologický stres u vtákov.....	181
Vplyv fosforylácie na interakciu GlyT2 so syntenin-1 prostredníctvom domén PDZ	186
Molekulárna fylogénéza rodu <i>Dolichophis</i> (Reptilia: Colubridae)	192
Vzťah medzi krvným systémom AB0 a závažným priebehom ochorenia COVID-19.....	198
Zmeny vo väzbe kyseliny sialovej na plazmatickú membránu býčích spermíí počas dozrievania v nadsemenníku.....	203
Genetické zmeny v mitochondriách: potenciálny marker chemorezistencie testikulárnych nádorov?.....	209
Deep protein profiling of trap leaves of carnivorous sundew (<i>Drosera binata</i>).....	215
Produkcia mutovanej a nemutovanej reverznej transkriptázy v expresnom systéme <i>Escherichia coli</i>	221
Charakterizácia reportérového vírusu kliešťovej encefalitídy v dormantných a cicajúcich kliešťoch <i>Ixodes ricinus</i>	227
A rare case of adverse effects caused by Hippoboscidae bite	233
The occurrence and distribution of synanthropic plant species on the ski slopes in Central Slovakia.....	237
Metagenomická analýza environmentálnych vzoriek vzduchu odobraných z výroby bryndze	243
Identifikácia vhodných podmienok ovplyvnenia <i>Schizosaccharomyces pombe</i> oxidačnými agensami prostredníctvom prietokovej cytometrie	249
Stanovenie zmien vo väzbe manózy na plazmatickej membráne po epididymálnej maturácii, ejakulácii a kapacitácii býčích spermíí	254
Efekt ochorenia COVID-19 na kvalitu a hustotu kostí.....	260
Meranie hrúbky mäkkých tkanív tváre pomocou ultrazvuku a sledovanie vplyvu BMI a telesnej hmotnosti na merané hodnoty.....	266
Využitie exozomálnej mtDNA ako nového potenciálneho biomarkera pre detekciu nádorov v centrálnej nervovej sústave	272
Analýza mikrobiómu bezstavovcov s využitím sekvenovania novej generácie	278

Charakterizácia mutantných foriem katalázy-peroxidázy z <i>Archaeoglobus fulgidus</i> AfKatG	284
Ektomykorízne huby ako rezervoár peroxidázových génov	289
Objasnenie funkcie proteínu Dbp2 v procese tvorby chromatinových štruktúr v bunkách <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	295
Kondicionované médium z adipocytov izolovaných z karcinómu prsníka zvyšuje expresiu karbónickej anhydrázy IX	301
Interakcia ACE I/D genetického variantu so životným štýlom a ich vzájomný vplyv na tukovú hmotu u mladých dospelých	307
Gén YIERG1 z kvasinky <i>Yarrowia lipolytica</i> dokáže nahradiť funkciu génu <i>ScERG1</i> kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	313
Analýza genomickej DNA pacientov s kolorektálnym karcinómom s využitím long-range PCR a sekvenovania za účelom identifikácie mutácií v rámci mismatch - repair génov asociovaných s Lynchovým syndrómom	319
Vplyv 10 nm nanočastíc zlata s obalom BSA na myšie hepatocyty (in vitro) a tkanivo pečene u myši (in vivo)	325
MinION operon sequencing of Pazo de Raxoi (Santiago de Compostela, Spain) mural samples	331
Využitie 3D bunkového modelu na štúdium liečivých látok na báze glykozaminoglykánov a sulfátovaných heteropolysacharidov	337
Štúdium odpovede kvasinky <i>Yarrowia lipolytica</i> na absenciu telomerázy	343
Spoločenstvo mravcov (Hymenoptera, Formicidae) Chráneného územia Abov (južné Slovensko)	349
Konštrukcia plazmidových vektorov s replikačným génom repE pod kontrolou arabinózového promótoru s divým typom RBS ako nástroje pre plynulú reguláciu génovej dózy	355
Skríning mladých jedincov s predispozíciou k hypertenzii na základe zmien tlaku krvi za bazálnych podmienok, v priebehu a po skončení ergometrického vyšetrenia	361
Hniezdna biológia muchárika bieločrkeho (<i>Ficedula albicollis</i> (Temminck, 1815)) v dubovom lese v ZOO Bratislava	367
Asociácia prítomnosti laktózovej intolerancie a zdravia kostí u mladých slovenských žien	373
Analýza črevného mikrobiómu u pacientov so spánkovým apnoe	378
Účinok fotodynamickej terapie na kvasinkovú infekciu vyvolanú na modeli prepeličej chorioalantoickej membrány	384
Distribúcia skóre polygénového rizika v rodinách so zápalovými črevnými ochoreniami ...	390
Proteome Profiling of <i>Phragmites australis</i>	396
Ovplyvňuje kremík metabolické procesy zapojené do fenylpropanoidnej dráhy v kukurici (<i>Zea mays</i> L.), ktorá je vystavená stresu z arzenu?	402
Príprava expresného systému na báze kvasinky <i>Candida utilis</i> s vylepšeným procesovaním sekrečného signálu	408

Th1/M1 and Th2/M2 immune response in hearts of Balb/c mice infected with lethal dose of A/WSN/33 and NS80 viruses	414
Expression of BTLA is increased in chronic lymphocytic leukemia	420
Prvý molekulárny dôkaz hybridizácie endosymbiontných nálevníkov (Protista: Ciliophora)	426
Účinok fotobiomodulačného žiarenia po hypericínom indukovanej fotodynamickej terapii v nádorových a nenádorových bunkách in vitro	432
Asociácia expresie génov vybraných komponentov transláznej syntézy DNA s rezistenciou bunkových línií nádorov zo zárodočných buniek na cisplatinu	438
Štruktúrna a funkčná charakteristika SLT domény bakteriofága BFK20.....	444
Rekonštrukcia fylogenie nálevníkov radu Clevelandellida s využitím sekundárnych štruktúr rRNA molekúl.....	450
Ako vplýva voda na znášku a správanie nosníc.....	456
Fotodynamická inaktivácia rickettsiových infekcií s použitím uhlíkových kvantových bodiek	462
Analýza mikrosatelitovej instability asociovanej s Lynchovým syndrómom	468
Interakcia fluorescenčných molekúl aktívnych vo fotodynamickej terapii s mezopórovitou silikou a bunkami.....	472
Identifikácia reaktívnych častíc zodpovedných za genotoxické účinky nízkoteplotnej plazmy na plazmidovú DNA	478
α -Amylázová rodina GH119 – in silico analýza zameraná na identifikáciu sekvenčno-štruktúrnych črt, evolúciu a príbuznosť s rodinou GH57	484
Vplyv nízkoteplotnej plazmy na kvasinky <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	490
Two novel variants associated with PMPCA related disease	495
Veľká neopísaná diverzita podrodu <i>Hystriochaetonotus</i> (Gastrotricha, Chaetonotidae, Chaetonotus) v strednej Európe	501
Cielená mutagenéza ťažko exprimovateľných proteínov v bakteriálnych systémoch.....	507
Kvantitatívne hodnoty radiálnych a ulnárných kľúčiek a ich využitie vo forenzej praxi....	511
Výskyt dermatoglyfických útvarov v oblasti mediálnych a proximálnych článkoch II. – V. prsta u slovenských detí v predškolskom veku.....	516
Modifikácia regulačnej kaskády kontrolujúcej expresiu z maltázového promótoru	522
Produkcia neuropeptidu ITP z <i>D. melanogaster</i> v expresnom systéme <i>E.coli</i>	528
Towards the identification of plant calpain DEFECTIVE KERNEL DEK1's substrate: Generation of inducible DEK1 down-regulation lines for targeted proteomics studies.....	532
Porovnanie metód ohraničenia hodnotených oblastí papilárneho terénu: metóda najvyššej kvality vs. metóda založená na dermatoglyfických útvaroch	538
Vplyv akustických a vizuálnych podnetov na správanie nosníc z rôznych chovných systémov v teste skreslenia pozornosti	544
Identifikácia a charakterizácia variantu v géne <i>EYA1</i> asociovaného so závažnými symptómami branchio-oto-renálneho syndrómu	550

Vplyv atranorínu na hematologické parametre onkologicky chorých experimentálnych zvierat	556
Candida auris mannan from cultivation on Shibata medium	561
Degradácia latentných odtlačkov prstov a environmentálne faktory, ktoré ju spôsobujú – upotrebitel'nosť latentných odtlačkov prstov	567
Predikcia telesnej výšky z rozmerov rúk a ich odtlačkov u jedincov zo slovenskej populácie	573
Účinnosť protistafylokokových bakteriofágových prípravkov in vitro	579
CAIX suppression attenuates the inflammation-triggered migration of the pancreatic cancer cell line Colo357	585
Relationship between bone mineral density in radius and fat mass in young adult women..	591
Fágová terapia kožných infekcií pacientov s diabetickou nohou	597
Produkcia LG3 domény rastlinného kalpainu DEK1 vo Vibrio natriegens	603
Intro do analýzy environmentálnej DNA zo sedimentov plies Mlynickej doliny	609
Návrh a konštrukcia expresných plazmidov pre produkciu kyseliny kanabigerolovej vo vybraných kvasinkách.....	615
Štúdium kombinovaného pôsobenia kofeínu a kvercetínu na ľudské bunky	621
Foretické roztoče čeľade Parasitidae (Acari, Mesostigmata) asociované s rozkladajúcim sa živočíšnym materiálom	627
Analýza dermatoglyfických útvarov druhého stupňa u slovenských detí v predškolskom veku	631
Analýza mechanizmu adaptácie proteínu Teb1 na úlohu transkripčného faktora	637
Magnetické častice v bioafinitných interakciách za účelom implementácie v diagnostike onkologických ochorení.....	643
Žilová kresba ruky a jej distribúcia u populácie z juhozápadného Slovenska.....	649
Využitie expresného systému Escherichia coli pre heterológnu expresiu ión-transportného peptidu z Drosophila melanogaster a jeho purifikácia.....	654
Vplyv polystyrénových mikroplastov na rastliny ľanu siateho (Linum usitatissimum L.) ...	660

CHÉMIA

Colloidal gold and silver nanocrystals for studies of antimicrobial activity	667
In silico návrh a testovanie možných inhibítorov enzýmu GlfT2 z Mycobacterium tuberculosis	672
Fosfatidylglycerol znižuje expresiu génu pre interleukín 8 v bunkách A549	678
X-ray Characterization of new 1D Chain-Like Metalloporphyrin Metal-Organic Framework	684
Vývoj novej analytickej metódy na analýzu triacylglyceridov používaných pri falšovaní éterických olejov pomocou GC-FID	687
Vývoj novej analytickej metódy na analýzu voľných mastných kyselín v syroch	693
Mechanizmus termickej izomerizácie fotochromných 3-fenylazaindolov	699
Prvková analýza korenín metódami atómovej spektrometrie	705
Ekotoxická vybraných pesticídov a ich degradačných medziproduktov vzniknutých po pokročilom oxidačnom procese	711
Syntéza nového makrocyclického binaftylového prepínača s acetamidovým mostíkom	717
Dvojkroková derivatizácia karboxylových kyselín kynurenínovej dráhy	721
Glykány apolipoproteínu C-III ako alternatívny diagnostický biomarker pri diagnostike kolorektálneho karcinómu	727
Čo odhalila analýza medov a medových pien?	732
Identifikácia skupiny cyklitolov v kvetoch Magnolia soulangeana hmotnostnou spektrometriou	738
Využitie hmotnostnej spektrometrie s trojitým kvadrupólom na identifikáciu skupiny cyklitolov vo hviezdici prostrednej	743
Štúdium vlastností exozómov a ich potenciál v diagnostike rakoviny prostaty	748
Porovnanie účinku vybraných dlhoreťazcových acyl-CoA syntetáz z granátovníka na akumuláciu kyseliny punikovej v kvasinkách	754
Monitorovanie účinnosti enzýmovej substitučnej terapie alfa-manozidózy využitím HPLC-FLD	759
Microarray Optimizations for High-Throughput Glycoprofiling of Cancer Sera	765
Cellulose Hydroxyapatite composite based on Cigarette Waste: Influence of Concentration onto ¹³³ Ba Removal	771
Influence of pH onto ¹³⁷ Cs and ¹³³ Ba removal by montmorillonite/biochar composite	777
Glykomická a proteomická analýza extracelulárnych vezikúl zo séra	782
Effect of hydrochar on the photo-induced activity of magnetite for removal of Rhodamine B	788
Mechanochemická aktivácia v syntéze ruxolitinibu	792
MALDI-TOF/TOF analysis of human milk oligosaccharide present in permethylated urine samples of an infant	797

C(2)-Regioselektívna paládiom katalyzovaná arylácia chromónov	803
Uncovering properties of 2D materials at finite temperatures using ab-initio molecular dynamics and machine-learned force fields.....	809
Unveiling Co -V mixed borate $\text{Co}_x\text{V}_5\text{-xB}_{12}\text{O}_{25}(\text{OH})$: High-pressure synthesis using multianvil press and crystal structure analysis.....	815
Enantioselektívna syntéza fluórovaných chirálnych dihydropyránov s potenciálnou biologickou aktivitou	821
Organokatalytická trojkomponentná domino Knoevenagelova/Dielsova-Alderova reakcia	827
Vývoj vysoko účinných a selektívnych ALR2 inhibítorov a ich disulfidových dimérov určených na ovplyvnenie komplikácií diabetu a rastu tumorov	833
Novel synthesis approach for the preparation of chalcogenide perovskites	839

GEOLÓGIA

Deciphering the variability of authigenic $^{10}\text{Be}/^{9}\text{Be}$ ratio from deltaic to offshore facies: An attempt to improve applicability of method for dating	846
The effect of organics removal using cyclohexane and bleach on mineralogical and physico-chemical properties of mature fine tailings (MFT) from Alberta, Canada	852
Interpretácia teploty morskej vody v plytkovodných prostrediach Viedenskej panvy počas neskorého Bádenu na základe lastúrníkov a dierkavcov	856
Finding of the Miocene turtle shell fragment from the vicinity of Dúbravská hlavica (Bratislava, Slovakia)	862
Composition of rutile from the Ochtiná-Rochovce W-Mo porphyry deposit based on LA ICPMS analysis.....	868
Dlhodobé sledovanie chemického a izotopového zloženia podzemnej vody vo výukovom vrte v areáli PrF MU	874
Description of a paleoecological environment from the new mollusca rich Middle Miocene locality at Dúbravská Hlavica hill.....	880
Geomagnetická aktivita pozorovaná v Hurbanove magnetometrom PSM-8711 so záznamníkom LB-480.....	885
Deformačný záznam a tektonický vývoj v oblasti Nízkych Tatier na styku tatrika a veporika pozdĺž čertovického zlomu (Západné Karpaty).....	891
Vývoj kontaminácie podzemných vod na vybrané lokalitě.....	897
New occurrences and updated fossil record of <i>Pseudopus pannonicus</i> (Squamata, Anguidae): taxonomical interests and extended geographic range.....	902
Volumetric abundance of microplankton in pelagic deposits across the Upper Jurassic and Lower Cretaceous boundary with the use of the new view on the point-counting method: Some evidence from Brodno	907
Review of petrogenetic processes determined in the Dinaridic Ozren-Borja Mahnjača ophiolites in Bosnia and Hercegovina	913
Quantitative retrospective evaluation of landslide susceptibility maps, case study: Stara Lubovna district	919

GEOGRAFIA

Priestorová analýza vakcinácie na Covid-19 na území Slovenska	925
Hodnotenie dynamiky liahnísk komárov v povodí riek Morava a Dunaj.....	931
Dostupnosť MHD v Bratislave s využitím dát GTFS.....	937
Modelovanie a predikcia zmien krajiny pokrývky, prípadová štúdia: okres Piešťany	943
Analýza návštevnosti zápasov futbalových klubov najvyššej futbalovej ligy na Slovensku	949
Testovanie využitia výšky nad najbližším vodným tokom pri priestorovej identifikácii riečnej nivy rieky Belá.....	955
Využitie voľne dostupných satelitných údajov a neurónových sietí na identifikáciu poľnohospodárskych pozemkov	961
Ženy v športe v modernom olympijskom hnutí.....	967
Predikcia poškodenia lesných porastov v dôsledku veternej kalamity s využitím logistickej regresie.....	973
Vývoj a charakteristika zrážkových pomerov Vysokých a Belianskych Tatier v kontexte klimatickej zmeny	979
Identifikácia náveterných a záveterných polôh Slovenska pri severných a južných cyklonálnych situáciách	985
Rodová rovnosť v akademickom prostredí na Slovensku	991

DIDAKTIKA

Vplyv respirátorov na rozpoznávanie emócií žiakov základných škôl a gymnázií	997
Z akých zdrojov čerpá denne informácie „Generácia Z“ ?	1002
Teoretické znalosti a praktické skúsenosti žiakov gymnázia pri práci s mikroskopom na hodinách biológie ako predpoklad znovuspoznania častí mikroskopu a ich funkcií	1008
Analýza využívania školského dvora vo vyučovaní prírodovedných predmetov na stredoslovenských školách	1014
Stres a vyhorenie učiteľov prírodovedných predmetov počas pandémie COVID-19	1020
Názory a hodnotenie realizácie outdoorového vyučovania učiteľmi prírodovedných predmetov	1026
Identifikácia mylných predstáv žiakov o vybraných orgánových sústavách človeka prostredníctvom štvorúrovňového testu	1032
Pochopenie bunkových základov dedičnosti žiakmi gymnázií	1038

ENVIRONMENTALISTIKA

Organický uhlík v pôde a jeho odozva na antropogénny zásah.....	1045
Can lower microbial decomposition be the reason for the decline of reclamation in limestone quarry?	1050
Odstraňovanie ropného znečistenia z pôd prostredníctvom elektrokineticky indukovaného premývania pôd so surfaktantom Tween-80.....	1056
Vývoj fragmentov jelšových lesov v čase a priestore pomocou diaľkového prieskumu Zeme	1062
Stopové kovy a polokovy v komunitných záhradách Bratislavy: koncentrácie, bioprístupnosť a hodnotenie zdravotných rizík.....	1068
Vplyv medi na rast a fotosyntetické pigmenty žaburinky menšej (<i>Lemna minor</i> L.)	1074
Travinno-bylinné spoločenstvá k. ú. Detvianska Huta a ich manažment	1080
Carbon sequestration in natural and managed forests: case study from South-Western Slovakia.....	1086

Študentská vedecká konferencia 2023
Zborník recenzovaných príspevkov

Dátum a miesto konania:	26. apríl 2023 Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta MS TEAMS
Editori:	RNDr. Mária Chovancová, PhD. Mgr. Táňa Sebechlebská, PhD. doc. RNDr. Eva Viglašová, PhD. Mgr. Dagmara Gajanová
Recenzenti:	Všetky príspevky prešli anonymným recenzným konaním.
Grafická úprava:	Mgr. Dagmara Gajanová RNDr. Eva Viglašová, PhD.
Vydanie:	prvé
Náklad:	400 ks
Rozsah strán:	1106
Vydavateľ:	Univerzita Komenského v Bratislave
ISBN:	978-80-223-5608-4 (tlač)
ISBN:	978-80-223-5609-1 (online)



ISBN 978-80-223-5608-4 (tlač)
ISBN 978-80-223-5609-1 (online)