

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA



ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2013

ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV

ŠVK
PriF UK
2013

Univerzita Komenského v Bratislave

Prírodovedecká fakulta



ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PrIF UK 2013

Zborník recenzovaných príspevkov



SIGMA-ALDRICH®



SLOVENSKÉ JADROVÉ FÓRUM
SLOVAK NUCLEAR FORUM



PC REVUE

Quark



Reader's Digest



PROMO SPRAVY.sk
Propagačný portál slovenského internetu

Nadácia Curie



GASTRO

24. apríl 2013

Bratislava, Slovenská republika

ISBN 978-80-223-3392-4

Predseda ŠVK

RNDr. Michal Galamboš, PhD.

Odborný výbor

Prof. RNDr. Jozef Halgoš, DrSc.
Doc. RNDr. Alžbeta Blehová, CSc.
Doc. RNDr. Hana Drahovská, CSc.
Doc. RNDr. František Golais, CSc.
Doc. Mgr. Iveta Herichová, PhD.
Doc. RNDr. Peter Kabát, CSc.
RNDr. Regina Sepšiová, PhD.
Mgr. Silvia Bodoriková, PhD.
Mgr. Andrej Ficek, PhD.
RNDr. Soňa Nagyová, PhD.
Prof. RNDr. Agáta Fargašová, DrSc.
Prof. Ing. Bohdan Juráni, CSc.
Doc. RNDr. Katarína Pavličková, CSc.
Mgr. Marcel Horňák, PhD.
RNDr. Norbert Polčák, PhD.
Prof. RNDr. Daniela Reháková, CSc.
Doc. RNDr. Marián Fendek, CSc.
Doc. Mgr. Peter Uhlík, PhD.
Prof. RNDr. Vladimír Kelló, DrSc.
Doc. Mgr. Radovan Šebesta, PhD.

Editori

RNDr. Michal Galamboš, PhD.
RNDr. Vladimíra Džugasová, PhD.
RNDr. Andrea Ševčovičová, PhD.

Podpredseda ŠVK

RNDr. Vladimíra Džugasová, PhD.
RNDr. Andrea Ševčovičová, PhD.

Organizačný výbor

Mgr. Martin Vataha
Mgr. Martin Babič
Mgr. Michaela Dórnghóferová, PhD.
Mgr. Nora Tóth-Hervay, PhD.
Mgr. Petra Uhrová
Mgr. Veronika Čerňanová
Mgr. Veronika Michalcová
Mgr. Maja Al Beyroutiová
Mgr. Martin Šponiar
Ing. Barbora Slabeciusová
Mgr. Roman Tóth
Mgr. Erika Igondová
Mgr. Juraj Holec
Mgr. Michal Veselský
Mgr. Roman Tvarožka
Mgr. Michal Šujan
Bc. Eva Viglašová
Bc. Adrián Krajňák
Bc. Jana Holekšiová
Mgr. Adela Bobovská

Predslov



Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave v roku 2013 opätovne otvára svoje brány účastníkom Študentskej vedeckej konferencie. Študenti všetkých troch stupňov štúdia z našej fakulty a fakúlt ďalších vysokých škôl zo Slovenska, ale i zahraničia sa stretávajú aby prezentovali výsledky svojej práce.

Tradícia Študentskej vedeckej konferencie na Prírodovedeckej fakulte UK sa začala písať už pred viac ako 40 rokmi, ešte ako Študentská vysokoškolská odborná činnosť (ŠVOČ). Pôvodne mala súťažný charakter, t.j. v každej odbornej sekcii hodnotiaca komisia určovala poradie, pričom účastníci, ktorí sa umiestnili na prvých troch miestach postúpili do celoštátneho kola, ktoré sa konali striedavo na rôznych fakultách vysokých škôl na Slovensku. Po roku 1989 a krátkom útlme záujmu študentov o tento typ

aktivity sa na fakulte obnovila Študentská vedecká konferencia už v súčasnej podobe.

Pre každú dobrú univerzitu a fakultu je vedecká práca základným kameňom jej existencie. Ruka v ruke s týmto „pevným základným kameňom“ však musí ísť aj o prenos vedeckých poznatkov medzi študentov všetkých stupňov štúdia. V tomto smere je Prírodovedecká fakulta UK v Bratislave jednoznačne lídrom medzi všetkými fakultami na Slovensku. Pri dosahovaných výsledkoch vo vedeckej práci, v počte publikačných výstupov, projektov či ďalších hodnotených parametrov patríme medzi tri najlepšie fakulty na Slovensku. Lenže z týchto troch fakúlt máme najvyšší počet študentov, pričom v počte študentov doktorandského stupňa štúdia dosahujeme aj absolútne najvyššie čísla v rámci všetkých fakúlt slovenských vysokých škôl. Z toho jasne vyplýva, že naši študenti dostávajú vzdelanie v tej najvyššej odbornej kvalite.

Prírodovedecká fakulta UK v Bratislave sa k týmto výsledkom nedopracovala z večera do rána. Je za tým dnes už 73 ročná história fakulty, práca všetkých učiteľov a vedeckých pracovníkov ako aj akademických funkcionárov, ktorí fakulty smerovali vždy k tým najvyšším cieľom.

V tomto roku sa Študentskej vedeckej konferencie zúčastnia účastníci z 6 slovenských, 6 českých a 1 nemeckej univerzity a privítame aj účastníkov zo Slovenskej akadémie vied či spoločnosti Slovaft a.s. Celkovo sa bude prezentovať 297 príspevkov, z toho 66 prednesú účastníci, ktorí nie sú z našej fakulty. Uvedené počty účastníkov sa udržiavajú na stabilnej úrovni už niekoľko rokov a dokumentujú pretrvávajúci záujem o Študentskú vedeckú konferenciu na fakulte. V tomto roku sa sympaticky zvýšil počet zahraničných univerzít (z 3 na 7).

Pri pohľade do vnútra fakulty je najviac prezentujúcich z biologickej sekcie, so značným odstupom nasledujú ostatné sekcie, na čele s chemickou. V ostatných 5-6 rokoch počet študentov biologickej sekcie výrazne stúpol a keďže učitelia a vedeckí pracovníci biologickej sekcie sa výrazne podieľajú na vedeckom výkone fakulty, je počet prezentujúcich sa biológov odrazom tejto skutočnosti. Príjemným zistením je druhé miesto chemickej sekcie. Je nesporné, že vedecký potenciál učiteľov a ostatných pracovníkov chemických katedier a ústavu je najvyšší v rámci fakulty. Problémom je klesajúci počet študentov sekcie, pričom sa výrazne zvyšuje podiel študentov biochémie, ktorí už dnes predstavujú takmer 2/3 z celkového počtu chemikov.

Napriek tomu, že geografi v tomto roku „odskočili“ od environmentalistov, stále sú to veľmi nízke čísla. Očakával by som vyšší počet geografov (vzhľadom na ich počet v rámci študentov fakulty) a pracoviská sekcie by sa touto skutočnosťou mali v budúcnosti určite zaoberať.

Som rád, že sa medzi prezentujúcimi objavujú aj študenti učiteľstva a prezentujú svoje práce. Naša fakulta sa hlási k učiteľským fakultám a aj účasť študentov v didaktickej sekcii to dokumentuje.

Chcel by som poďakovať Organizačnému a Odbornému výboru Študentskej vedeckej konferencie, jednotlivým odborným a organizačným garantom sekcií za prácu vykonanú pri príprave konferencie. Verím, že priebeh a výsledok konferencie bude pre nich príjemným zadosťúčením.

Účastníkom Študentskej vedeckej konferencie PriF UK 2013 želám pokojný hlas, istú ruku a jasnú myseľ pri prezentácii, aby sa im výsledky svojej práce podarilo „predať“ čo najlepšie. Verím, že účasť na Študentskej vedeckej konferencii vám prinesie aj „pridanú hodnotu“ v podobe nových priateľských a pracovných kontaktov.

doc. RNDr. Milan Trizna, PhD.

dekan

Prírodovedeckej fakulty UK v Bratislave

Obsah

Plenárna prednáška	7
Biológia.....	8
Chémia	887
Geológia.....	1228
Geografia.....	1312
Didaktika.....	1503
Environmentalistika	1568
Sponzori	1718
Register príspevkov	1735

Byť vedcom „*ab initio*“

Prof. RNDr. Jozef Noga, DrSc.

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta,

Katedra anorganickej chémie, jozef.noga@fns.uniba.sk

Príspevok sa dotýka rôznych aspektov povolania vedca v kontexte dnešnej doby, ale i špecifických podmienok v našom geopolitickom regióne. Byť vedcom nie je zamestnanie, ale v pravom slova zmysle povolanie. Povolanie, ktoré je slobodné, fascinujúce, o to viac však zaväzuje k zodpovednosti.

Medzi ústredné budú okrem iného patriť témy ako etika vo vede, veda a pseudoveda, ale aj autorov pohľad na otázky ako napríklad “*Dá sa vedecká výkonnosť merať?*” alebo “*Ako sme na tom na Slovensku?*”.

V neposlednom rade sa autor v priebehu prednášky pokúsi poukázať aj na niektoré praktické stránky života vedca, subjektívne vychádzajúc zo svojich vlastných skúseností.

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA



ŠVK
PriF UK
2013

BIOLOGIA

ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2013
ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV

Evolučne staré enzýmy polyfosfátkinázy

Lucia Achbergerová^{1,2}, Jozef Nahálka^{1,2}

¹*Slovenská akadémia vied, Chemický ústav, Centrum glykomiky, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia; chemlucy@savba.sk*

²*Slovenská akadémia vied, Chemický ústav, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia*

Abstrakt

Polyphosphate kinases catalyse the polymerisation and degradation of polyphosphate chains, linear molecule that contains tens to hundreds of phosphate residues connected by macroergic bonds. As a result of this process, Ppk produces or consumes energy in the form of ATP. Polyphosphate appears to be an easily obtainable and rich source of energy from prebiotic times to the present and is found in the cells of all three domains of life. But Ppk are widely distributed only in Bacteria. Archaea and Eukarya probably use different enzymes connected to polyphosphate metabolism. The present study focuses on Ppk1 and Ppk2 homologues, which have been described in Bacteria. The aim is to determine which homologue group, Ppk1 or Ppk2, is older. Phylogenetic analyses imply that polyphosphate consumption (Ppk2) evolved first and that phosphate polymerisation (Ppk1) evolved later.

Kľúčové slová: polyfosfátkináza; polyfosfát; evolúcia; ATP; ADP.

Úvod a formulácia cieľa

Polyfosfátkinázy (Ppk) katalyzujú polymerizáciu a degradáciu polyfosfátového (polyP) vlákna, lineárnej molekuly pozostávajúcej z desiatok až stoviek fosfátových zvyškov pospájaných makroergickými väzbami. Výsledkom tohto procesu je produkcia alebo konzumácia energie vo forme ATP [1, 2]. Podľa teórie nositeľa Nobelovej ceny z roku 1959 vznikol polyP v prebiotckej evolúcii Zeme a následne slúžil ako primárny zdroj energie prvým organizmom na Zemi [3]. V súčasnosti je však polyP na Zemi tvorený biogénnym procesom [4]. Abiogénny polyP bol nájdený len na pár miestach [5]. Priemyselne ľahká príprava polyP naznačuje jednoduchosť jeho vytvorenia v podmienkach prebiotckej Zeme [6].

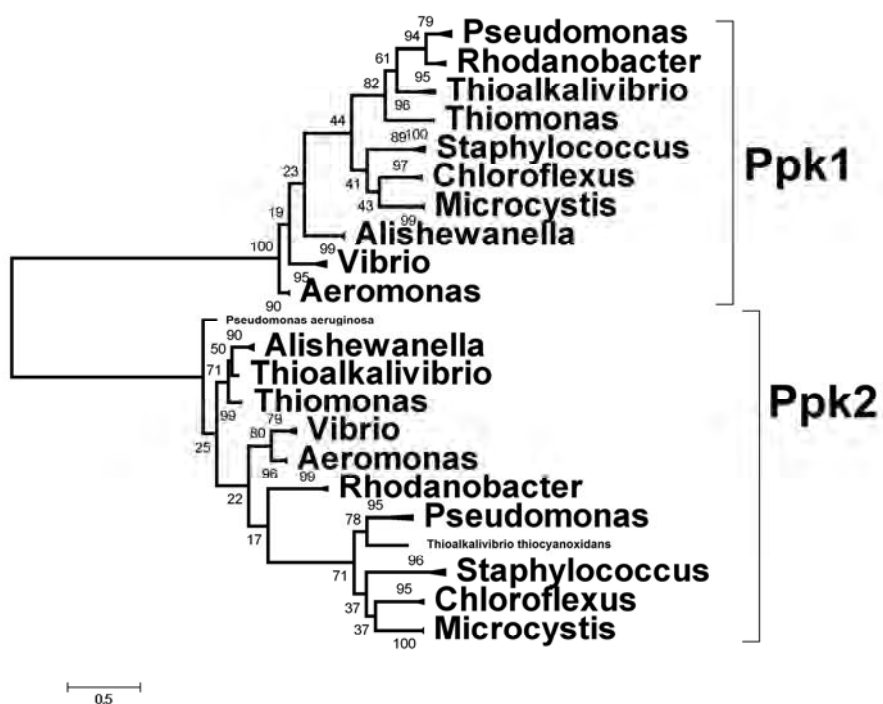
PolyP sa vyskytuje u všetkých troch domén života. Ppk, kľúčové enzýmy v jeho syntéze, sú prítomné len v baktériách [3]. U archeónov a eukaryotických organizmov sú za metabolizmus polyP pravdepodobne zodpovedné iné enzýmy. Ako napríklad jeden zo štvorice vakuolárneho transportného chaperonu Vtc4 u eukaryotických organizmov [7] a polyP/ATP závislej NAD kinázy prítomnej u archeónov [8]. Cieľom tejto práce bolo naznačiť, ktorý z proteínov popísaných v baktériách (Ppk1 alebo Ppk2) je evolučne starší.

Materiál a metódy

Pomocou programu BLAST [9] boli identifikované organizmy, ktoré obsahujú súčasne homológ proteínu Ppk1 (PDB kód 1XDO) [10] z *Escherichia coli* a homológ proteínu Ppk2 (PDB kód 3CZP) [10] z organizmu *Pseudomonas aeruginosa*. Získané proteínové sekvencie boli zarovnané v programe Clustal X2 [11] a USEARCH 5 [12]. Pre evolučné analýzy bol použitý program MEGA 5 [13]. Model Whelan a Goldman bol vybraný ako najlepší spomedzi 48 testovaných substitučných modelov [14]. Vedľa vetvy fylogenetického stromu je zobrazené percento stromov, v ktorých boli súvisiace rody uvedené spolu. Iniciačný strom bol nájdený heuristicky a generovaný automaticky.

Výsledky a diskusia

Pre fylogenetické štúdie bol vybraný súbor organizmov, ktoré obsahujú obidva proteíny Ppk1 a Ppk2. Teória bola, že tieto proteíny vznikli genetickou duplikáciou, a zafixovali sa v populácii, lebo zvýšili jej fitness v prítomnosti dvoch kópií [15, 16]. Paralógy si zachovali rovnakú bazálnu funkciu, ale mutácie spôsobili vzrast afinity k substrátu [17]. Postupom popísaným v kapitole „Materiál a metódy“ sme zostavili fylogenetický strom. Jeho skrátená verzia je pre ilustráciu uvedená na Obr.1.



Obr. 1 Evolúcia polyfosfátkináz- evolučný strom je zostavený na základe porovnávania proteínových sekvencií homológov Ppk1 a Ppk2. Vedľa vetvy fylogenetického stromu je zobrazené percento stromov, v ktorých boli súvisiace rody uvedené spolu.

Výsledky ukazujú, že ak PPK1 a PPK2 vznikli z parentálneho génu genetickou duplikáciou, fylogenetický strom zobrazuje Ppk2 bližšie k spoločnému predkovi Ppk. Znamená to, že Ppk2 je staršia ako Ppk1. Ak to dáme do súvisu s anorganickým polyP, potvrdzuje to teóriu o prvotnej funkcii konzumácie polyP a produkcie energie vo forme ATP, a teda prítomnosti Ppk2 enzýmu. A neskoršiemu vývoju polymerizácie polyP a konzumácie ATP a prítomnosti Ppk1.

Záver

Ppk sú celkovo staré enzýmy. Fylogenetické štúdie ukázali, že enzým Ppk2, ktorý preferenčne degraduje polyP, je starší ako enzým Ppk1, ktorý polyP preferenčne syntetizuje. Táto práca je v korelácii s prácou Arthura Kornberga, ktorý považoval polyP za „bioenegetickú fosíliu“, ktorá slúžila ako primárny zdroj energie prvým organizmom na Zemi.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Kornberg A., Kornberg S. R., Simms E. S. (1956) *Biochim. Biophys. Acta.* 20, p. 215
- [2] Kulaev I. S. (1975) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 73, p. 131
- [3] Kornberg A. (1995) *J. Bacteriol.* 177, p. 491
- [4] Gower L. B. (2008) *Chem. Rev.* 108, p. 4551
- [5] Yamagata Y., Watanabe H., Saitoh M., et al. (1991) *Nature* 352, p. 516
- [6] Baltscheffsky H., Blomberg C., Liljenstrom H., et al. (1997) *J. Theor. Biol.* 187, p. 453
- [7] Ogawa N., DeRisi J., Brown P. O. (2000) *Mol. Biol. Cell.* 11, p. 4309
- [8] Sakuraba H., Kawakami R., Ohshima T. (2005) *Appl. Environ. Microbiol.* 71, p. 4352
- [9] Altschul S. F., Gish W., Miller W., et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215, p. 403
- [10] Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., et al. (2000) *Nucleic. Acids. Research.* 28, p. 235
- [11] Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., et al. (2007) *Bioinformatics* 23, p. 2947
- [12] Edgar R. C. (2010) *Bioinformatics*

- [13] Tamura K., Peterson D., Peterson N., et al. (2011) *Mol. Biol. Evol.* 28, p. 2731
- [14] Whelan S., Goldman N. (2001) *Mol. Biol. Evol.* 18, p. 691
- [15] Lynch M., Conery J. S. (2000) *Science* 290, p. 1151
- [16] Kondrashov F. A., Rogozin I. B., Wolf Y. I., et al. (2002) *Genome. Biol.* 3
- [17] Hahn M. W. (2009) *J. Hered.* 100, p. 605

Vplyv rotačného svetelného režimu používaného pri práci na smeny s fázovými posunmi smerom dopredu na expresiu hodinových génov *per2* a *bmal1* v srdci potkana

Jana Ambrušová, Michal Zeman, Anna Veselá, Iveta Herichová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika,
j.ambrusova@gmail.com

Abstrakt

Irregular light (L) dark (D) regimens used at shift work frequently interfere with environmental LD cycle and cause deregulation of the circadian rhythms in the organism. Deregulation of the circadian system is associated with changes in neural, metabolic and humoral signaling that participate in the synchronization of the peripheral oscillators. We used Wistar rats that were exposed to the LD cycle mimicking the rotating shift work to study the *per2* and *bmal1* expression in the heart. Clock gene expression was measured by real time PCR. We found that LD regimen mimicking shift work with 8h phase advances every other day caused significant phase delay in acrophase, decrease in the mean value and significant decrease in the amplitude of *per2* and *bmal1* rhythmic expression. We conclude that under LD conditions used in rotating shift work with phase advances peripheral oscillators in the heart are constantly out of the actual phase.

Kľúčové slová: cirkadiálny systém, práca na smeny, SCN, svetelný režim

Úvod a formulácia cieľa

Cirkadiánne rytmy sú behaviorálne a fyziologické endogénne rytmy riadené vnútorným cirkadiánnym systémom s periódou trvajúcou približne, ale nie presne 24 hodín. Cirkadiánný systém u cicavcov je hierarchicky organizovaný, pričom hlavný pacemaker je lokalizovaný v suprachiazmatických jadrách hypotalamu (SCN) a periférne oscilátory zahŕňajú periférne orgány ako aj ostatné mozgové štruktúry [1].

Centrálny oscilátor je synchronizovaný geofyzikálnymi časovými cyklami, najmä prostredníctvom svetelných signálov registrovaných sietnicou oka, ktoré sú do SCN prenášané retinohypotalamickým traktom [2]. Periférne oscilátory sa nachádzajú vo všetkých tkanivách a bunkách organizmu a autonómne generujú oscilácie v periférnych tkanivách [3]. Periférne oscilátory sú predominantne synchronizované prostredníctvom SCN, avšak za určitých okolností môžu byť odpojené od hlavného oscilátora a synchronizované inými podnetmi, ako napríklad príjmom potravy [4].

Cirkadiánne rytmy sú na molekulárnej úrovni generované komplexom negatívnych a pozitívnych spätnoväzobných transkripčno-translačných slučiek [5]. Kľúčové negatívne komponenty hlavnej spätnoväzobnej slučky sú proteínové produkty *period* génov (*per 1-3*) a *cryptochrome* génov (*cry 1-2*). Transkripcia týchto génov je iniciovaná dvoma základnými

helix-loop-helix transkripčnými faktormi obsahujúcimi PAS doménu BMAL1 a CLOCK, ktoré predstavujú hlavné pozitívne komponenty slučky [6].

Súčasná populácia žijúca v industrializovanej západnej Európe je často vystavovaná podmienkam vonkajšieho prostredia, ktoré môžu narušať cirkadiálny systém. Deregulácia cirkadiálneho systému má za následok zmeny v rytmoch sekrécie hormónov, spánku či činnosti orgánových sústav. Mnohé aspekty súčasného moderného života ako práca na smeny, let cez časové pásma či nadmerné nočné osvetlenie podnecujú aktivitu a príjem potravy počas pasívnej fázy dňa, čo je často v rozpore so svetelnou synchronizáciou mediovanou do SCN [7]. Dôsledkom týchto protichodných signálov sú narušené fázové vzťahy cirkadiálnych rytmov v správaní, hormonálnych a metabolických premenných, ktoré vedú k internej desynchronizácii [8]. Porušenie endogénnej rytmicity vyskytujúce sa pri práci na smeny má za následok zvýšenie rizika vzniku obezity, kardiovaskulárnych ochorení, metabolického syndrómu a nádorových ochorení [9, 10, 11].

Cieľom našej práce bola identifikácia faktorov dôležitých pri vzniku internej desynchronizácie, v našom prípade desynchronizácie navodenej svetelným režimom simulujúcim svetelný režim pri práci na smeny. Fyziologický účinok nami navodeného nestabilného svetelného režimu sme posudzovali prostredníctvom zmien v expresii hodinových génov *per2* a *bmal1*.

Materiál a metódy

V pokuse bolo použitých 72 samcov potkanov kmeňa Wistar, ktoré boli rozdelené do dvoch skupín s odlišným svetelným režimom. Kontrolná skupina bola vystavená štandardnému svetelnému režimu svetlo:tma 12:12 so začiatkom svetlej fázy dňa o 6:00 hod. Experimentálna skupina bola exponovaná svetelnému režimu simulujúceho svetelný režim pri práci na smeny v rýchlom rotačnom režime. Každý druhý deň sa uskutočnil posun o 8 hodín smerom dopredu (phase advance), teda fáza tmy bola kratšia o 8 hodín. Zvieratá mali prístup k potrave a vode *ad libitum*. Odbery sa uskutočnili 10 týždňov po vystavení potkanov nestabilnému svetelnému režimu počas 24 hodín v 4-hodinových intervaloch. Vypreparované srdcia boli zmrazené v tekutom dusíku a uložené pri -80°C až do izolácie celkovej RNA.

Pre izoláciu celkovej RNA z tkanív sme použili Tri-Reagent (MRC, USA). Komplementárnu cDNA sme nasyntetizovali pomocou reverznej transkriptázy s použitím kitu ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, USA). Prostredníctvom real time PCR sme kvantifikovali génovú expresiu nami vybraných génov. Okrem týchto génov sme

analyzovali aj expresiu house keeping génu, za ktorý sme si stanovili gén *rib11* (ribozomálny proteín large P1). Tento gén slúžil na normalizovanie expresie sledovaných génov. V PCR reakcii sme použili master mix s hot start polymerázou (QuantiTect SYBR Green PCR Kit; QIAGEN, Nemecko). Meranie prebiehalo v cykleri Step-One System (Applied Biosystems, USA). Program začal počiatočnou aktiváciou hot start DNA polymerázy a denaturáciou dvojreťazcových DNA molekúl 15 minút, 95°C. Ďalej pokračoval v 50-tich cykloch, v ktorých sa opakovali kroky: denaturácia 15 sekúnd pri 94°C, anelácia 30 sekúnd pri stanovenej anelačnej teplote (*per2* 49°C, *bmal1* 55°C) a elongácia 30 sekúnd pri teplote 72°C. Ukončenie programu prebehlo po dosyntetizovaní reťazcov 2 minúty pri 72°C. Primery použité v reakciách boli: *per2* (AB016532) - sense 5'-GAGGTTCAGGGAAGTGAGCA-3', antisense 5'TTGACACGCTTGGACTTCAG-3'; *bmal1* (AB012600) - sense 5'GCACTCACACATGGTTCCAC-3', antisense 5'-CATTCCGCAAGGTGTCCTAT-3'; *rib11* (NM_001007604) - sense - 5'-TCC ACA ACA TGG CTT CTG TC-3', antisense 5'-ATT GCA GAT GAG GCT TCC AA-3. Z kalibračnej krivky, ktorú sme pripravili logaritmičným riedením vybranej vzorky, sme odrátali relatívnu expresiu hodinových génov v jednotlivých vzorkách. Špecifickosť reakcie bola monitorovaná analýzou teploty topenia PCR produktov a potvrdená sekvenáciou.

Prostredníctvom kosínorovej analýzy sme otestovali rytmickosť nami vybraných génov. V prípade, že nafitovaná kosínorová krivka signifikantne korelovala s experimentálnymi dátami, bola vypočítaná akrofáza (čas, kedy rytmus dosahuje maximum vo vzťahu k zadanému časovému bodu, v našom prípade od začiatku svetlej fázy 24h cyklu), amplitúda (polovica rozdielu medzi minimálnou a maximálnou hodnotou nafitovanej krivky) a mezor (stredná hodnota rytmu alebo stredná hodnota medzi najvyšším a najnižším bodom nafitovanej krivky). Signifikanciu rozdielov medzi nafitovanými krivkami sme posúdili prostredníctvom porovnania vypočítaných konfidenčných limitov. Čas je uvádzaný v relatívnych jednotkách Zeitgeber time (ZT). ZT0 je definovaný ako začiatok svetlej fázy 24 hodinového cyklu.

Výsledky a diskusia

U kontrolných potkanov bol denný profil expresie *per2* v srdci signifikantne rytmický s maximom zaznamenaným na začiatku tmavej fázy 24h cyklu (ZT 15:12, cosinor $P < 0,0001$). U potkanov vystavených posunutému svetelnému režimu (každý druhý deň posun o 8 hodín smerom dopredu) po dobu 10 týždňov maximum expresie *per2* vykazovalo signifikantný

posun smerom dozadu približne o dve hodiny (17:10, cosinor $P < 0,05$) s poklesom amplitúdy o viac ako 50% a signifikantným poklesom strednej hodnoty.

Denný rytmus expresie *bmal1* v srdci kontrolných potkanov bol v antifáze v porovnaní s expresiou *per2*, pričom maximum expresie *bmal1* bolo zaznamenané pri prechode z tmavej do svetlej fázy 24h cyklu (ZT 0:55, cosinor $P < 0,05$). U potkanov vystavených posúvajúcemu sa svetelnému režimu expresia *bmal1* dosahovala najvyššie hladiny počas svetlej fázy dňa (ZT 5:37, cosinor $P < 0,05$) s poklesom amplitúdy o viac ako 50% a zníženou hodnotou mezoru.

Záver

Na záver možno konštatovať, že v podmienkach imitujúcich svetelný režim pri práci na smeny dochádza k zmenám v expresii hodinových génov *per2* a *bmal1* vo všetkých parametroch. V expresii oboch génov sme pozorovali signifikantný posun akrofázy smerom dozadu, pokles strednej hodnoty rytmu a výrazný, viac ako 50%, pokles amplitúdy. Tieto výsledky implikujú, že periférny oscilátor v srdci za týchto podmienok nie je nasynchronizovaný s aktuálnym svetelným režimom a cirkadiánný systém neplní svoju úlohu v prediktívnej adaptácii na cyklické zmeny prostredia. Nazdávame sa, že uvedené zmeny môžu v prípade dlhodobého trvania funkčne súvisieť s vyšším rizikom vývinu porúch kardiovaskulárneho systému u ľudí pracujúcich na smeny.

PodĎakovanie

Práca bola podporená grantom VEGA 1/1262/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Challet E., Candelas I, Graff C. (2003) Biol Chem 384(5), p.711
- [2] Reppert S. M., Weaver D. R. (2002) Nature 418 (6901), p.935
- [3] Storch K. F., Lipan O., Leykin I., et al. (2002) Nature 417(6884), p.78
- [4] Damiola F., Minh N. M., Preitner N., et al. (2000) Genes Dev 14(23), p.2950
- [5] Ueda H. R., Hayashi S., Chen W., et al. (2005) Nat Genet 37(2), p.187
- [6] Gachon F., Nagoshi E., Brown S. A., et al. (2004) Chromosoma 113(3), p.103
- [7] Waterhouse J., Reilly T., Atkinson G., et al. (2007) Lancet, 369 (9567), p.1117
- [8] Haus E., Smolensky M. (2006) Cancer Causes Control, 17(4), p.489
- [9] Knutsson A. (2003) Occup Med (Lond) 53(2), p.103

- [10] Schernhammer E.S., Laden F., Speizer F.E., et al. (2003) *J. Natl. Cancer. Inst.* 95(11), p.825
- [11] Karlsson B., Knutsson A., Lindahl B. (2001) *Occup Environ Med* 58(11), p. 747

Sledovanie vplyvu herpetickej, chrípkovej a zmiešanej infekcie na vybrané parametre bunkovej a humorálnej imunity

Lucia Ančicová¹, Magdaléna Wágnerová¹, Anna Chalupková¹, Jana Jarčušková¹, Zuzana Hrabovská¹, Jela Mistríková^{1,2}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika;
lucka.ancicova@gmail.com

²Virologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava

Abstract

Murine gammaherpesvirus 68 (MHV-68) is a naturally occurring herpesvirus of wild rodents and is genetically related to HHV 8 and Epstein-Barr virus. The ability of MHV-68 to establish acute and persistent infection within laboratory mice offers a unique opportunity to investigate immunological and virological aspects of gammaherpesvirus pathogenesis. In connection with herpetic infections in recent years, several authors addressed the dual infection and its impact on host immunity but the overall deployment of co-infection. The interaction of multiple pathogens in the human body can cause unexpected immune reactions. It may modulate the immune response leading to the pathological inflammatory changes. Gammaherpesvirus-induced latent infection and subsequent acute influenza infection may serve as a useful model for examining the latency reactivation of oncogenic gammaherpesvirus due to co-infection by another virus. It can also be applied in the study of mortality and morbidity during acute influenza infection in the population, which is persistently infected with gammaherpesviruses.

Key words: Murine gammaherpesvirus 68; Influenza; Co-infection

Úvod a formulácia cieľa

Vírus Epsteinova a Barrovej (EBV) je ľudský gamaherpesvírus, ktorý navodzuje perzistentnú infekciu u viac ako 90% svetovej populácie. Rovnako ako ostatné herpesvírusy, tak aj EBV má dve fázy životného cyklu- lytickú, teda produktívnu replikáciu a latentnú infekciu. Po primárnej infekcii EBV pretrváva v B- lymfocytoch v latentnom stave po celý život hostiteľa. Nízka úroveň reaktívacie lytickej replikácie umožňuje vylučovanie vírusu do slín a prenos *in vivo*. Celoživotná perzistentná infekcia navodená EBV je neškodná a ochorenie sa vyvinie pri narušení rovnováhy medzi vírusom a hostiteľom. Hlavný záujem vzbudzujú gamaherpesvírusy najmä kvôli ich asociácii s rôznymi malignanciami. EBV je asociovaný s Burkittovým lymfómom, nasofaryngeálnym karcinómom a Hodgkinovým lymfómom, zatiaľ čo genómy HHV-8 boli identifikované takmer vo všetkých tkanivách KSHV a v niekoľkých B- lymfómoch dávaných do súvislosti s AIDS [1, 2].

Medzi najbežnejšie, ale i najvýznamnejšie príčiny infekcie respiračného traktu patrí vírus chrípky, pretože spôsobuje vysokú chorobnosť a úmrtnosť. U starších ľudí, u dojčiat,

u chronicky infikovaných ľudí a u jedincov s oslabenou imunitou je chrípka spojená s mimoriadne vysokou úmrtnosťou [3].

Cieľom našej práce je na modeli BALB/c myši, u ktorých bola navodená perzistentná infekcia myšacím lymfotropným gamaherpesvírusom (MHV-68), sledovať priebeh sekundárnej infekcie vírusom chrípky (A/Miss/1/85/M9/E2 H3N2). Porovnať jednotlivé parametre imunity v skupine MHV-68 infikovaných, v skupine chrípkou infikovaných a v skupine infikovaných oboma vírusmi (MHV-68 a H3N2).

Materiál a metódy

MHV-68: prototypový myšací herpetický vírus, ktorý bol získaný z divožijúcich hlodavcov *Myodes glareolus* [4].

A/Miss/1/85/M9/E2 (H3N2): chrípkový vírus adaptovaný na myšiach. Vírus nám poskytla RNDr. Eva Varečková, DrSc. z VÚ SAV v Bratislave.

BALB/c myši: inbrédna línia laboratórných myši pochádzajúca z chovnej stanice v Brne

Infekcia: Myši sme intranazálne infikovali MHV-68 v objeme 0,02 ml (2×10^4 PFU/1ml/myš). Na 45. deň sú infikované vírusom chrípky 0,04 ml ($0,5 LD_{50}$). V jednotlivých intervaloch ich odkrvíme, krv použijeme na stanovenie DKO a počet leukocytov, inaktivované sérum použijeme na stanovenie titra vírus - neutralizačných protilátok.

Diferenciálny krvný obraz: Z 10 μ l heparinizovanej krvi zhotovíme na odmastenom podložnom sklíčku krvný rozter. Používame Pappenheimovu metódu panoptického farbenia roztokmi May-Grünwald a Giemsa-Romanowski. Po uschnutí krvný náter prevrstvíme roztokom May-Grünwald. Po 10 minútach preparát opláchneme pod tečúcou vodou a nanesieme roztok Giemsa-Romanowski, ktorý necháme pôsobiť 15 minút. Následne náter opláchneme a necháme uschnúť. Sledujeme pod mikroskopom s imerzným objektívom.

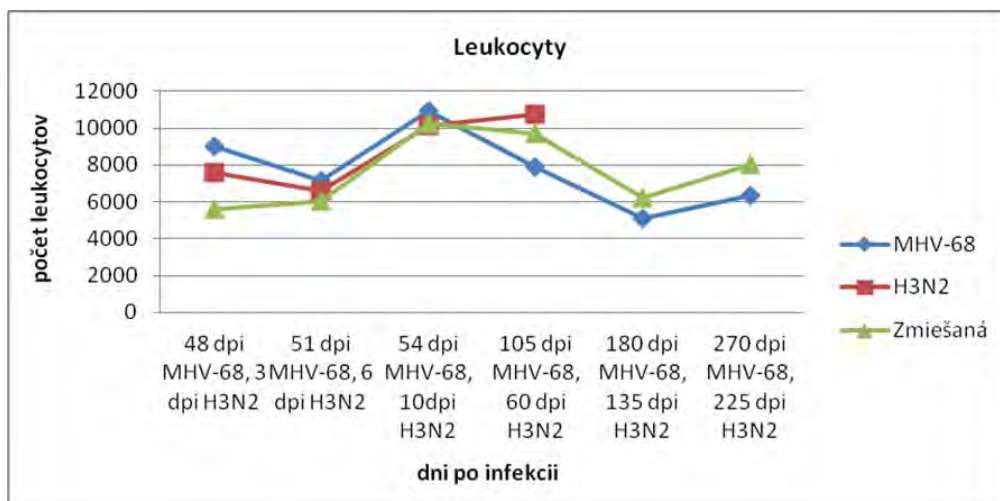
Počítanie leukocytov: Do 475 μ l Türckovho roztoku pridáme 25 μ l heparinizovanej krvi, rozfúkame a 10 minút farbíme. Leukocyty počítame v Bürkerovej komôrke v 50 malých štvorcoch a výsledný počet vynásobíme 100 a zistíme počet leukocytov v 1 μ l krvi.

Vírus- neutralizačný test: Pripravíme si dvojnásobné riedenie vyšetřovaného inaktivovaného séra (1:2, 1:4, 1:8, 1:16,....1:1024). Použijeme 1000 ID vírusu v 1ml. Zmes vírus- sérum (v rovnakom pomere) inkubujeme 30 min. v termostate pri 37°C s 5% obsahom CO₂. Potom odoberieme z každého riedenia 100 μ l a preniesieme do príslušných jamiek 96-jamkovej mikrotitračnej platničky, kde sme vopred odstránili pôvodné kultivačné médium (okrem kontrol). Pre kontrolu rozmnoženia vírusu používame retitráciu vírusu. Adsorbujeme

90 min. v termostate pri 37°C s 5% obsahom CO₂. Po uplynutí 90. minút odsajeme zostatok zmesi vírus - sérum, ale aj riedenia vírusu a do každej jamky pridáme po 200 µl čerstvého udržiavacieho DMEM 2% FBS. V termostate ich necháme pri 37°C. Posledné riedenie séra, ktoré ešte zabránilo vzniku CPE, predstavuje titer vírus - neutralizačných protilátok.

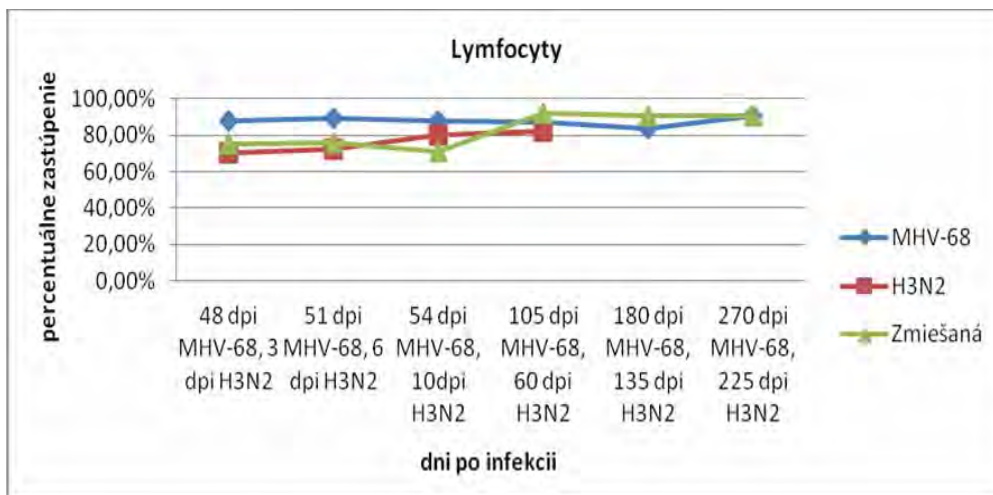
Výsledky a diskusia

V jednotlivých intervaloch infekcie BALB/c myši sme vyšetrovali počet leukocytov v krvi, rovnako ako aj % zastúpenie jednotlivých typov leukocytov v DKO. Vyšetrovali sme aj prítomnosť vírus - neutralizačných protilátok a tieto hodnoty sme korelovali s jednotlivými vírusovými infekciami.



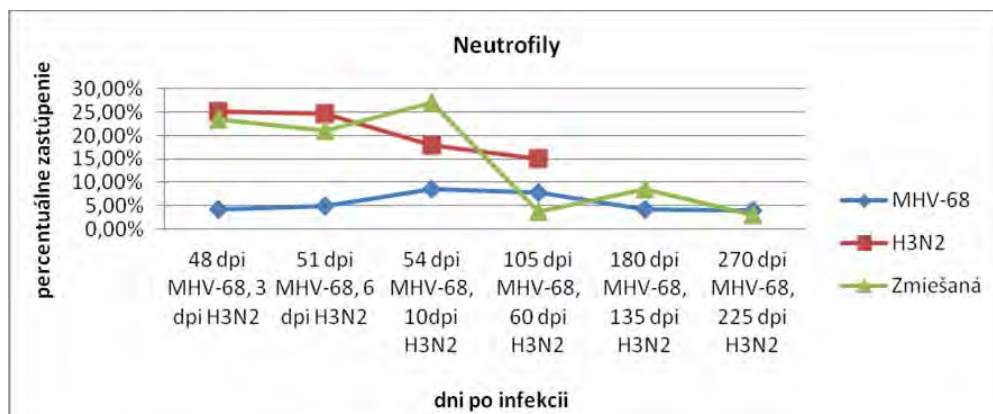
Obr. 1 Sledovanie vplyvu herpetickej, chrípkovej a zmiešanej infekcie na zastúpenie leukocytov v DKO BALB/c myši (dpi = dni po infekcii)

Ako vyplýva z obr. 1, infekcia herpetickým vírusom MHV-68, infekcia vírusom chrípkov, rovnako ako aj zmiešaná infekcia obidvoma vírusmi nemá signifikantný vplyv na počet leukocytov v periférnej krvi BALB/c myši.



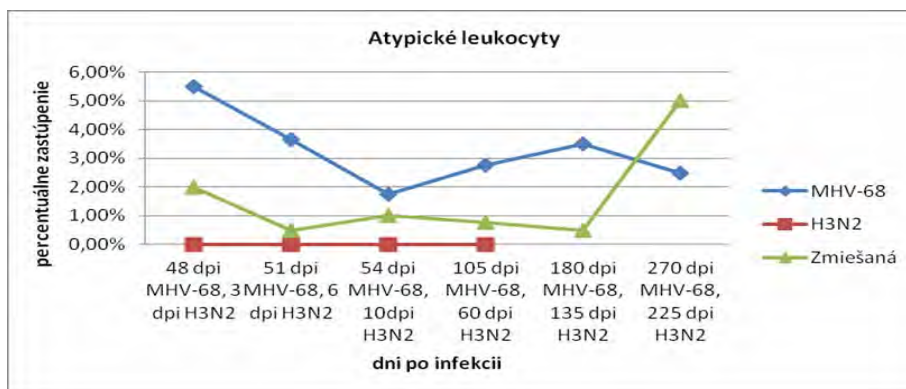
Obr. 2 Sledovanie vplyvu herpetickej, chrípkovej a zmiešanej infekcie na % zastúpenie lymfocytov v DKO BALB/c myši (dpi = dni po infekcii)

Ako vyplýva z obr. 2, počet lymfocytov je po infekcii MHV-68 v porovnaní s infekciou vírusom chrípky zvýšený, čo sa potvrdilo aj pri zmiešanej infekcii obidvoma vírusmi. V neskorších fázach infekcie (105 dpi MHV-68- 60 H3N2; 180 dpi MHV-68- 135 dpi H3N2; 270 dpi MHV-68- 225 H3N2) došlo naopak k nárastu počtu lymfocytov v dvojito infikovaných myšiach v porovnaní so samostatnou MHV-68 infekciou.



Obr. 3 Sledovanie vplyvu herpetickej, chrípkovej a zmiešanej infekcie na % zastúpenie neutrofilov DKO BALB/c myši (dpi = dni po infekcii)

Ako vyplýva z obr. 3, počet neutrofilov je pri chrípkovej aj dvojitej infekcii signifikantne zvýšený v porovnaní s herpetickej infekciou.



Obr. 4 Sledovanie vplyvu herpetickej, chrípkovej a zmiešanej infekcie na % zastúpenie atyp. leukocytov v DKO BALB/c myši (dpi = dni po infekcii)

Ako vyplýva z obr. 4, tvorba atypických leukocytov, ako dôsledok lymfoproliferatívnych zmien herpetickej infekcie v analógii s EBV, bola prekvapivo dokázaná aj u dvojito infikovaných myši, pričom koinfekcia mala skôr pozitívny vplyv na ich množstvo.

Infekcia herpetickým vírusom MHV-68, infekcia vírusom chrípky, rovnako ako aj zmiešaná infekcia obidvoma vírusmi nemá vplyv na počet monocytov a bazofilov.

Tab. 1 Detekcia VN protilátok v sérach Balb/c myši infikovaných MHV-68 v priebehu chronickej infekcie a myši infikovaných MHV-68 a chrípkou H3N2

Trvanie infekcie jednotlivými vírusmi	Titer VN protilátok proti MHV 68 u myši infik. MHV-68	Titer VN protilátok proti MHV-68 u myši infikov. zmiešanou infekciou
48 dpi MHV-68, 3 dpi H3N2	2-8	16-32
51 dpi MHV-68, 6 dpi H3N2	16-32	8-16
55 dpi MHV-68, 10 dpi H3N2	64	8-16
105 dpi MHV-68, 60 dpi H3N2	8-16	4-16
180 dpi MHV-68, 135 dpi H3N2	256	4-8
270 dpi MHV-68, 225 dpi H3N2	64	4-16

dpi = dni po infekcii; **VN** = vírus- neutralizačné; **ND** = not done

Ako vyplýva z tab.1, titer VN protilátok proti MHV-68 sa v priebehu chronickej fázy infekcie MHV-68 zvyšoval priamo úmerne s dĺžkou infekcie a udržiaval sa na hladinách (od 8 do 256).

Titer VN protilátok proti MHV-68 sa v priebehu dvojitej infekcie vírusom MHV-68 a H3N2 nezvyšoval priamo úmerne s dĺžkou infekcie MHV-68, ale jeho hladina sa skôr znižovala priamo úmerne s dĺžkou sekundárnej chrípkovej infekcie. Hladiny protilátok proti MHV-68 sa udržiavali v rozpätí titrov (od 4 do 32), ktoré boli signifikantne znížené.

Porovnaním hladín VN protilátok proti MHV-68 u skupiny infikovanej len herpesom a u skupiny infikovanej herpesom aj chrípkou sa potvrdilo, že dvojitá infekcia mala vplyv na zníženie tvorby protilátok voči MHV-68.

Záver

Zo všetkých sledovaných parametrov bunkovej imunity sme zaznamenali zmeny len v počte neutrofilov a atypických leukocytov. Atypické leukocyty sa v krvi vyskytovali len po infekcii MHV-68.

Počet neutrofilov bol po infekcii vírusom chrípkou signifikantne zvýšený rovnako ako aj po dvojitej infekcii.

Koinfekcia však nespôsobila taký istý nárast neutrofilov ako samotná infekcia vírusom chrípkou, čo môže vysvetliť ťažší priebeh infekcie a zhoršenie revitalizácie v dôsledku zníženej fagocytárnej odpovede neutrofilov.

Z uvedeného vyplýva, že dvojitá infekcia má vplyv nielen na parametre bunkovej imunity, dokázané poklesom počtu fagocytujúcich buniek, ale aj na zníženie humorálnej imunity, ktorá sa prejavila znížením tvorby VN protilátok proti MHV-68.

Pod'akovanie:

Táto práca bola zrealizovaná s finančnou podporou projektov VEGA 1/01 85/11, VEGA 1/1340/12.

Zoznam použitej literatúry:

- [1] Simas, J. P., Efstathiou, S. (1998) Trends Microbiol. 6(7), p. 403
- [2] Nash, A. A., Dutia, B. M., Stewart, J. P., et al. (2001) Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B. 356, p. 569
- [3] Wright, P. F., Neumann, G., Kawaoka, Y. (2007) Orthomyxoviruses. In Knipe D.M., Howley P.M (eds.) Fields virology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, p. 1692
- [4] Blaškovič, D., Stančeková, M., Svobodová, J., et al. (1980) Acta Virol. 24, p. 468

Analýza proteín-dna interakcií v procese replikácie plazmidovej DNA

Martin Babič, Viera Cimová, Juraj Bugala

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, martin.babic4@gmail.com

Abstrakt

Plasmids are extrachromosomal DNA elements with characteristic copy numbers within the host. In many plasmid replicons plasmid-encoded replication initiator, Rep protein, is required. Rep-type proteins bind to tandem directly-repeated sequences (iterons) to establish the initiation nucleoprotein complex. Iteron sequence length, number and spacing between iteron repeats are typical for every replicon. Rep proteins belonging to the family replication initiators exist mainly as dimers, but only Rep protein monomers can initiate replication by binding to repetitive sequences. Rep proteins interact with the regulatory region of the DNA molecule by the secondary structure consisting of intermittent alpha-helices (HTH motif). The Rep proteins of some replicons, have an important second function, they recognize inversely-repeated sequences (operators) which overlap the promoter of their own coding genes, acting as self-repressors. We isolated and characterized plasmid pAG20, from *Acetobacter aceti* CCM 3620 cell, which encodes a small replication protein Rep20 for his replication.

KLúčové slová: *plazmid; replikácia plazmidovej DNA; proteín-DNA interakcie*

Úvod a formulácia cieľa

Plazmidy a z nich pripravené plazmidové vektory sú významným nástrojom v molekulárnej biológii. Octové baktérie obsahujú široké spektrum plazmidov, pričom v jednej bunke sa môže vyskytovať viac plazmidov s rôznymi funkciami a veľkosťou [1,2,3,4].

Časť plazmidov pre iniciáciu replikácie si kóduje a využíva vlastné iniciačné replikačné proteíny známe ako trans-aktivačné faktory, označované ako Rep proteíny. Tieto proteíny sa viažu v počiatku replikácie na špecifické sekvencie (cis – aktívny faktor), s ktorými Rep proteín interaguje v monomérskej, alebo polymérskej forme [5]. Bioinformatické analýzy ukázali, že na replikačnom proteíne môžeme identifikovať dve oblasti. Jedna oblasť interaguje s regulačnou oblasťou na molekule DNA spravidla v počiatku replikácie, čo zabezpečuje sekundárna štruktúra v zoskupení prerušovaného alfa helixu (HTH motív) na N konci proteínu [6,7]. Druhá oblasť sa využíva na dimerizáciu proteínov a na vzájomnú interakciu proteínov v priebehu samotného replikačného procesu. Táto oblasť v C-terminálnej oblasti obsahuje väčšie množstvo leucínov schopných vzájomnej interakcie, čo vytvára motív leucínového zipsu [8,9].

Naším cieľom je pripraviť v HTH oblasti replikačného proteínu skupinu mutantov v jednotlivých α -helixoch a aminokyselinách schopných sa viazať na regulačnú oblasť a pomocou mobility gel shift assay (EMSA) určiť, ktoré aminokyseliny sú dôležité v tomto

processe a fragmentovou analýzou určiť presné miesto väzby proteínu.

Materiál a metódy

V práci sme použili bakteriálne kmene *E. coli* XL1-Blue, *E. coli* BL21 (DE3), plazmid pAG20 izolovaný z bakteriálneho kmeňa *Acetobacter aceti* CCM 3620 a pripravený konštrukt pET30a⁺-rep20.

CIELENÁ MUTAGENÉZA POMOCO PCR METÓDY

Plazmid pET30-rep_{AG20} sme použili ako templát pre cieleňú mutagenézu *rep* génu v PCR reakcii použitím skupiny špecifických primérov uvedených v Tab. 1 s cieľom získať substitučných mutantov v aminokyselinách HTH oblasti replikačného proteínu Rep20. PCR amplifikáciou sme pripravili deriváty, ktoré mali zavedenú substitúciu aminokyselín v treťom α -helixe. Po transformácii buniek *E. coli* BL21 (DE3) jednotlivými derivátmi sme nadprodukovali proteíny, ktoré sme po purifikácii využili na mobility gel shift assay.

Tab. 1 Priméry použité na substitučnú mutagenézu v *rep* géne a amplifikáciu repetitívnych sekvencií v regulačnej oblasti plazmidu pAG20

priméry	nukleotidová sekvencia v smere 5'-3'
R20PR1	CATCCAAAACACTATTGGCCAAAATG
R20PR2	CATCCCAAGCTATAATCGCCAAAATG
R20PL12	CGACGAGAGCATTATTGCGGC
R20PR3	CATTGGACCAAATGGCTGGTTGC
R20PR4	CATTGGCCAAAATAACTATGTGCGG
R20PR21	CATCCCAAGCTATATTGGCCAAAATG
R20PR22	CATCCCAAGCTACAATCGCCAAAATG
R20PR31	CATTGGACAAAATGGCTGGTTGC
R20PR32	CATTGGCCCAAATGGCTGGTTGC
IT20L	GGGTAGCCCACCAGCTATG
IT20P	CAAATTCCTTCCAAACCTAGCCC
OR1L	GGTTTGGATGGAATTTGTCCAAATTTG
OR1P	AATTCATCCATTTTCATAGCGAAAAATGTAG
OR2L	AATTCATCTACATTTTTTCGCTATGAAATGG
OR2P	TCAAATCAGACGATTTTTTCATCCAAATTTG

SEKVENČNÁ ANALÝZA:

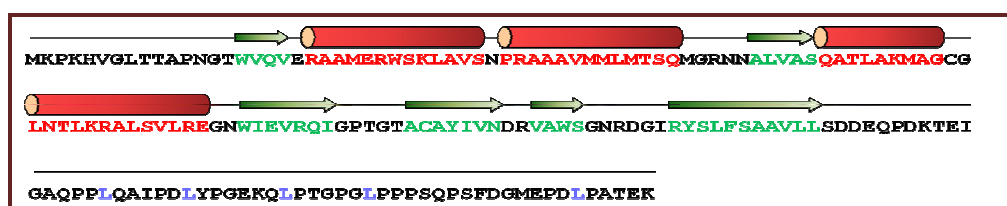
Sekvenčná analýza pripravených rekombinantných DNA sa uskutoční metódou podľa Sangera na automatickom sekvenátore ABI-3130 XL Genetic Analyzer s použitím sekvenačného kitu BigDye Terminátor 3.1 Sequencing Kit na pracovisku Katedry molekulárnej biológie.

MAPOVANIE VÄZBY PROTEÍNU:

Proteínovú interakciu s molekulou DNA budeme sledovať väzbou proteínu na regulačnú oblasť plazmidu využitím štandardnej metódy Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)[10] elektroforézou v 4 % PAGE za nenedenaturačných podmienok.

Výsledky a diskusia

Bioinformatickou analýzou Rep20 proteínu sme na jeho C-terminálnom konci identifikovali HTH motív v podobe štyroch prerušovaných alfa-helixov o veľkosti 48 aminokyselinových zvyškov (Obr. 1).



Obr.1 Sekundárna štruktúra replikačného proteínu Rep20

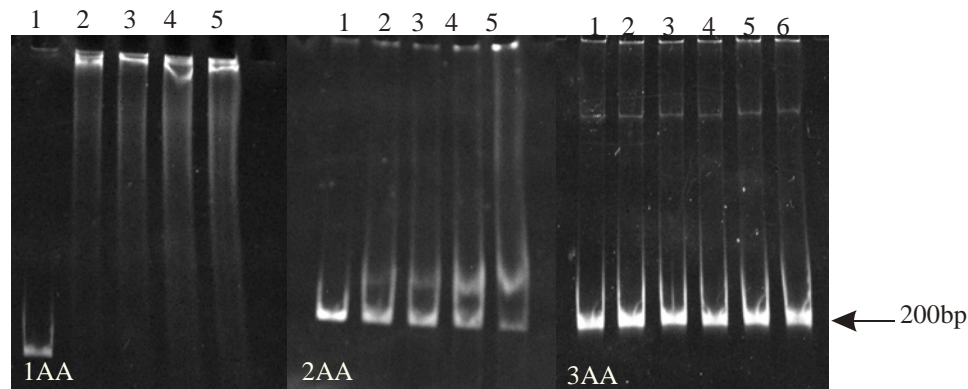
Pre väčšinu replikačných proteínov je HTH motív zodpovedný za väzbu na regulačnú oblasť pri iniciácii replikácie plazmidov. V predchádzajúcom období metódou EMSA sme dokázali, že za väzbu replikačného proteínu Rep20 na regulačnú oblasť plazmidu pAG20 je zodpovedný tretí α -helix

PCR metódou použitím špecifických primérov Tab.1 sme pripravili sériu substitučných mutantov v konštrukte pET30-rep20. Zamieňali sme aminokyselinu v treťom α -helixe *rep* génu (Obr.2) a sledovali sme, či substitúcia bude mať efekt pri väzbe proteínu Rep20 na regulačnú oblasť plazmidu pAG20(Obr.3).

	ATGGGCCGCAATAATGCTCTCGTCGCA	TCC	CAA	GCT	ACA	TTG	GCC	AAA	ATG	GCT	GGT	TGC	GGC
	MGRNNALVAS		Q	A	T	L	A	K	M	A	G	C	G
1AA	ATGGGCCGCAATAATGCTCTCGTCGCA	TCC	AAA	ACT	ACA	TTG	GCC	AAA	ATG	GCT	GGT	TGC	GGC
	RNNALVAS		K	T	T	L	A	K	M	A	G	C	G
2AA	ATGGGCCGCAATAATGCTCTCGTCGCA	TCC	CAA	GCT	ATA	ATC	GCC	AAA	ATG	GCT	GGT	TGC	GGC
	RNNALVAS		Q	A	I	I	A	K	M	A	G	C	G
3AA	ATGGGCCGCAATAATGCTCTCGTCGCA	TCC	CAA	GCT	ACA	TTG	GAC	CAA	ATG	GCT	GGT	TGC	GGC
	RNNALVAS		Q	A	T	L	V	Q	M	A	G	C	G
4AA	ATGGGCCGCAATAATGCTCTCGTCGCA	TCC	CAA	GCT	ACA	TTG	GCC	AAA	ATA	ACT	CTA	TGC	GGC
	MGRNNALVAS		Q	A	T	L	A	K	I	T	V	C	G

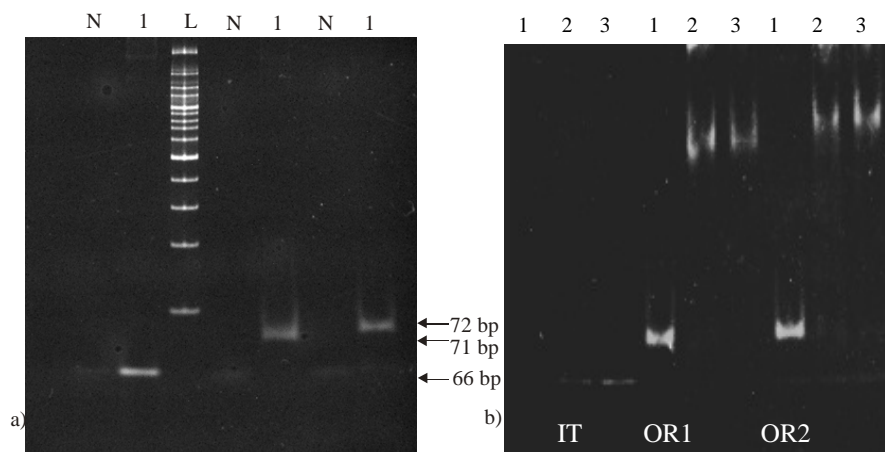
Obr.2 Substitučná mutagenéza v treťom α -helixe proteínu Rep20

Produkty expresie substitučných mutantov *rep20* génu sme purifikovali afinitnou HPLC a FPLC chromatografiou na niklových IMAC nosičoch. Schopnosť mutantných proteínov interagovať s regulačnou oblasťou replikácie plazmidu pAG20 sme analyzovali metódou EMSA(Obr.3)



Obr.3 Väzba Rep20 proteínu so substitučnou mutáciou (1AA,2AA,3AA) na regulačnú oblasť *rep20* v 4% PAGE. 1.dráha - DNA bez proteínu, 2.dráha - DNA s proteínom - konc. 100 ng, 3.dráha - DNA s proteínom - konc. 200 ng, 4.dráha - DNA s proteínom - konc.300 ng, 5.dráha s proteínom - konc. 500 ng

Bioinformatickou analýzou sme identifikovali iterónové a priame repetitívne sekvencie v oblasti počiatku replikácie plazmidu pAG20. PCR metódou sme amplifikovali jednotlivé sekvencie(Obr.4a), ktoré sme následne použili ako templát v EMSA, aby sme identifikovali sekvencie , na ktoré sa viaže replikačný proteín Rep20 pri replikácii plazmidu pAG20. Pre identifikáciu sekvencií sme použili wt replikačný proteín Rep20.



Obr.4 a) PCR amplifikácia iterónovej sekvencie (66bp) a repetitívnych sekvencií (71bp a 72bp): N-negatívna kontrola, L-Ladder; **b)** EMSA: Väzba Rep20 proteínu na iterónovú a priame repetitívne sekvencie v regulačnej oblasti *rep20* génu v 4% PAGE. 1.dráha - DNA bez proteínu, 2.dráha - DNA s proteínom - konc. 300 ng, 3.dráha – DNA s proteínom-konc. 400 ng

Záver

V predloženej práci sme metódou EMSA potvrdili väzbu replikačného proteínu Rep20 na regulačnú oblasť *rep20* génu. Cielenu mutagenézou pomocou PCR sme pripravili sériu substitučných mutantov v *rep20* géne, v treťom α -helixe. Zistili sme, že substitúcia prvej a druhej dvojice aminokyselín nemala efekt na väzbu replikačného proteínu na regulačnú oblasť. Druhou sériou substitučných mutácií v treťom α -helixe sme identifikovali, že pravdepodobne za väzbu proteínu je zodpovedná ⁶³Lyzín(AAA). Metódou EMSA sme identifikovali sekvencie (OR1 a OR2) v regulačnej oblasti *rep20* génu, na ktoré sa viaže replikačný proteín Rep20 v procese iniciácie replikácie plazmidu.

Pod'akovanie

Uvedená práca bola vypracovaná v laboratóriu Doc. RNDr. Jozefa Gronesa CSc., ktorému patrí aj moje pod'akovanie za všestrannú pomoc.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Ohmori S., Uozumi T., Beppu T. (1982) *Agric. Biol. Chem.* 46, 381-389.
- [2] Krahulec J., Kretová M., Grones J. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 94-97.
- [3] Kretová M., Szemes T., Laco J., Gronesová P., Grones J. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 27-31.
- [4] Grones P., Grones J. (2010) *Advances in Biosci. Biotechnol.* 2010, 1, 417-425.
- [5] Han M., Yagura M., Itoh T. (2006) *J. Bacteriol.*, 189, 1061-1071.
- [6] Brennan, R.G. (1993) *Cell.* 74, 773-776.
- [7] Otting G., Qian Y.Q., Billeter M., Muller M., Affolter M., Gehring W.J., Wuthrich K. (1990) *EMBO J.* 9, 3085-3092.
- [8] Giraldo R., Nieto C., Fernandez-Tresguerres M.E., Diaz-Orejas R. (1989) *Nature* 342, 866.
- [9] Nieto C., Giraldo D. R., Fernandez-Tresguerres E., Diaz-Orejas R. (1992) *J. Mol. Biol.* 223, 415-426.
- [10] Smith A. J, Humphries S. E (2009) *J. Mol. Biol.* 385 (3): 714-7
- [11] Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Cold Spring Harbor, NY

Klonovanie, expresia a charakterizácia DnaB proteínu z octových baktérií

Martin Babič, Juraj Bugala, Viera Cimová, Ivana Durčáková

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, martin.babic4@gmail.com

Abstrakt

The aim of the presented work is to study the replicative DnaB protein which is encoded by the chromosome of acetic acid bacteria *Acetobacter pasteurianus*. We amplified *dnaB* gene from chromosome of bacterial strain *Acetobacter pasteurianus* LMG1513 and cloned it into expression vector pET30a+. We transformed competent cells *E. coli* BL21 (DE3) with the construct carrying the *dnaB* gene. Then we overexpressed our target protein and we purified it by affinity chromatography for further studies. We verify the ability of DnaB protein to interact with Hu replication protein *in vivo* by using bacterial two hybrid system.

Kľúčové slová: *Acetobacter*; DnaB proteín; Hu proteín; BACTH kit

Úvod a formulácia cieľa

Proces replikácie bakteriálneho genómu ako aj extrachromozómových plazmidových molekúl sa študuje už niekoľko rokov a stále sa objavujú nové informácie, ktoré jednotlivé stupne replikácie upravujú, dopĺňajú a detailne ozrejmujú. Predložená práca je zameraná na štúdium replikácie chromozómovej DNA octových baktérií s dôrazom na objasnenie úlohy replikačného proteínu DnaB v tomto procese.

DnaB proteín bol intenzívne študovaný na modelovom organizme *E. coli*. Uplatňuje sa pri iniciácii a elongácii replikácie bakteriálneho chromozómu. Je to multifunkčný enzým kontrolujúci formovanie a translokáciu replizómu. V priebehu replikácie interaguje s ďalšími replikačnými proteínmi a podieľa sa tak na asemblácii primozómového komplexu a následnom pohybe replikačného aparátu [1].

V *E. coli* tento hexamérny proteín pozostáva zo šiestich protomérov o veľkosti 471 aminokyselinových zvyškov, ktoré tvoria prstencovitú štruktúru s trojitou symetriou [2]. Protomér má „dvojlalokovitú formu“ pozostávajúcu z veľkej C-terminálnej domény pripojenej linkerom k malej N-terminálnej doméne [3].

V *E. coli* DnaB proteín musí byť v komplexe s DnaC proteínom, aby bol schopný väzby na počiatok replikácie. V tomto komplexe DnaC proteín inhibuje helikázovú a ATP-ázovú aktivitu DnaB proteínu, ktorý svoju aktivitu nadobudne až po disociovaní DnaC z komplexu [4, 5].

Cieľom práce je charakterizácia DnaB proteínu a sledovanie proteín-proteínových interakcií medzi proteínom DnaB a proteínom Hu z baktérie *Acetobacter pasteurianus* pre lepšie pochopenie procesu replikácie genómu octových baktérií. Na štúdium proteínových interakcií *in vivo* sme zvolili bakteriálny dvojhybridný systém a na sledovanie interakcie medzi proteínmi *in vitro* využijeme pull down test v kombinácii s Western blot analýzou. Tieto štúdie smerujú k pochopeniu účasti DnaB proteínu v procese iniciácie replikácie v bunkách octových baktérií a porovnaniu procesu medzi popísaným mechanizmom v eubaktériách a doteraz neštudovaným procesom v bunkách *Acetobacter*.

Materiál a metódy

Bakteriálne kmene a plazmidy

V práci sme použili bakteriálne kmene *A. pasteurianus* LMG 1513, *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BTH101, expresný vektor pET30a⁺ a klonovacie vektory pUT18 a pKT25.

Príprava konštruktú pET30a⁺– dnaB

Z chromozómu octovej baktérie *Acetobacter pasteurianus* LMG 1513 sme amplifikovali sekvenciu *dnaB* génu a klonovali do expresného vektora pET30a⁺.

Nadprodukcia DnaB proteínu

Bunky *E. coli* BL21 (DE3) sme transformovali pripraveným konštruktom pET30a⁺ – *dnaB* a použitím induktora IPTG sme indukovali nadexpresiu *dnaB* génu.

Purifikácia DnaB proteínu

Bunky *E. coli* BL21 (DE3) s nadprodukovaným DnaB proteínom sme homogenizovali ultrazvukom, odstránili zvyšky bunkových štruktúr, vyzrážali nukleové kyseliny a cytoplazmatický extrakt použili na chromatografickú purifikáciu požadovaného proteínu.

SDS-PAGE elektroforéza

Proteíny sme analyzovali elektroforézou v 12% SDS-PAGE, ktorú sme uskutočnili podľa metódy popísanej Sambrook a kol. (1989) [6].

Štúdium proteín-proteínových interakcií *in vivo*

Na štúdium interakcií v podmienkach *in vivo* sme využili EUROMEDEX BACTH System Kit (Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System Kit). Z chromozómu baktérie *Acetobacter pasteurianus* LMG 1513 sme amplifikovali gény *dnaB* a *hu* a klonovali do vektorov pUT18 a pKT25. Bunky *E. coli* BTH101 sme kotransformovali pripravenými konštruktmi pUT18 – *dnaB* a pKT25 – *hu*. Transformanty sme selektovali na LB pôde s prídavkom X-gal a IPTG.

Výsledky a diskusia

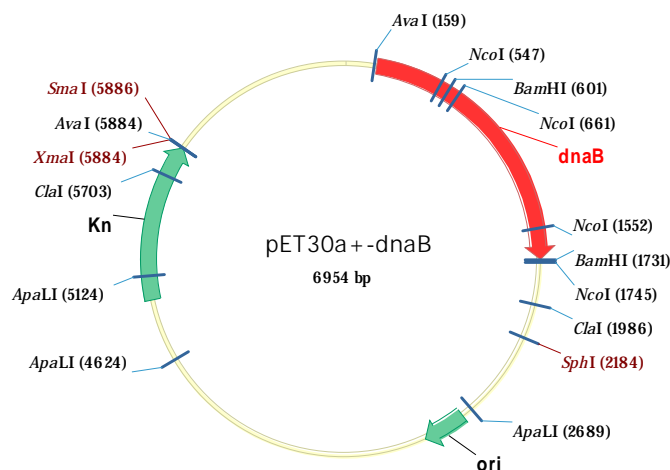
Predmetom nášho záujmu je štúdium replikačného proteínu DnaB, ktorý je kódovaný génom *dnaB* na chromozóme octovej baktérie *Acetobacter pasteurianus* LMG 1513. Bioinformatickou analýzou sme určili nukleotidovú sekvenciu *dnaB* génu na 1557 bp s obsahom GC párov 55%. Proteínový produkt, DnaB proteín je tvorený 519 aminokyselinovými zvyškami a má veľkosť 57,27 kDa. V jeho sekundárnej štruktúre sme identifikovali 17 α -helixov a 7 β -skladaných listov (Obr. 1).



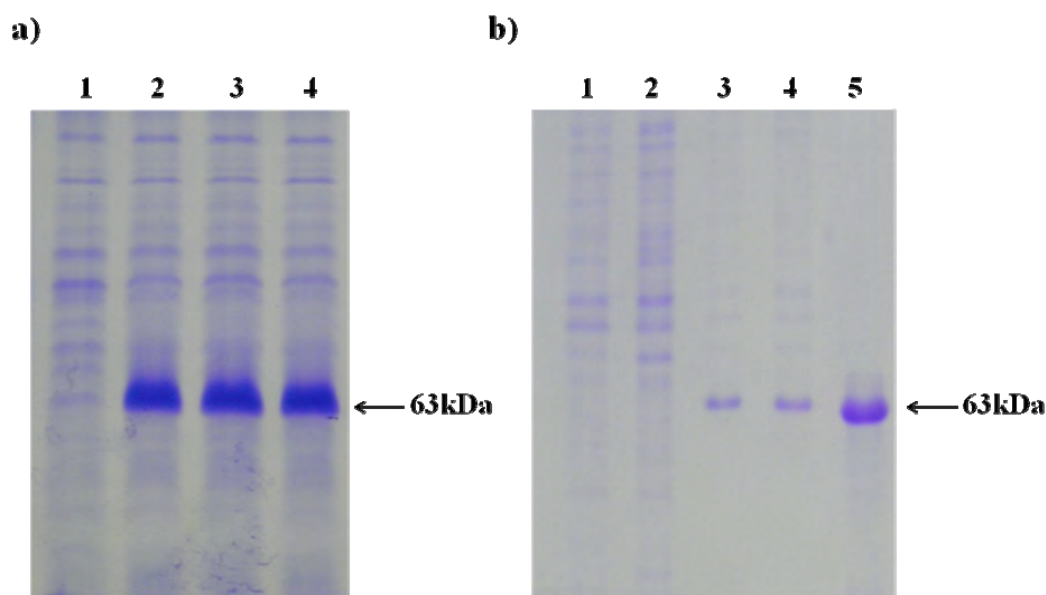
Obr. 1 Sekundárna štruktúra DnaB proteínu s vyznačenými α -helixmi a β -skladanými listami

Metódou PCR sme z chromozómovej DNA baktérie *Acetobacter pasteurianus* LMG 1513 použitím špecifických navrhnutých primerov amplifikovali sekvenciu *dnaB* génu a klonovali do expresného vektora pET30a⁺. Po overení správnosti pripraveného konštruktu pET30a⁺ – *dnaB* restričnou a sekvenačnou analýzou sme zostrojili jeho fyzikálnu mapu (Obr.2).

Konštrukt pET30a⁺ – *dnaB* sme využili na inducibilnú nadexpresiu *dnaB* génu v T7 expresnom systéme buniek *E. coli* BL21 (DE3). Na chromozóme týchto buniek sa gén pre T7 polymerázu nachádza pod lac promótorom, na indukciu sme preto použili IPTG. (Obr. 3). Nadrodukovaný DnaB proteín vo fúzii s hexahistidinovou sekvenciou sme chromatograficky purifikovali použitím kolóny špecificky viažúcej His-Tag. Na kolóne naviazaný proteín sme eluovali lineárnym gradientom imidazolu (Obr. 3). Pozitívne frakcie sme dialyzovali, aby sme odstránili imidazol a purifikovaný proteín sme uschovali pri teplote -70°C pre ďalšie štúdie.



Obr. 2 Fyzikálna mapa konštruktú pET30a⁺ – *dnaB*



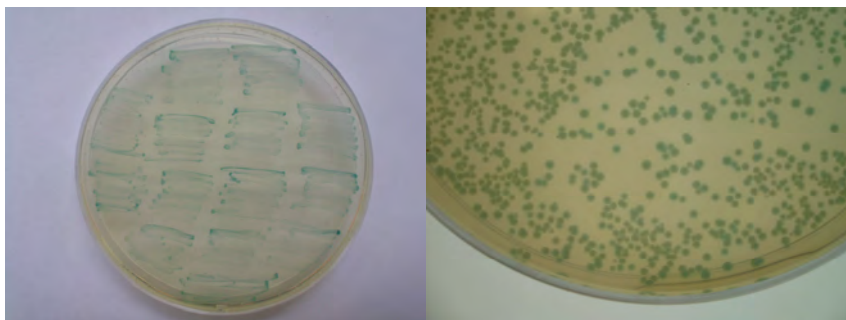
Obr. 3 a) Nadexpresia *dnaB* génu fúzovaného s histidínovou kotvou v bunkách *E. coli* BL21 (DE3) v časovej závislosti pôsobenia induktora IPTG s výslednou koncentráciou 1 mmol.l⁻¹ v 12% SDS-PAGE. 1. dráha – *dnaB* bez indukcie IPTG, 2. dráha – *dnaB* po 1 hod indukcie IPTG, 3. dráha – *dnaB* po 2 hod indukcie IPTG, 4. dráha – *dnaB* po 3 hod indukcie IPTG. b) Chromatografická purifikácia His-Tag fúzovaného DnaB proteínu v 12% SDS-PAGE.

1. dráha – nanášaná frakcia, 2. dráha – premyvaná frakcia, 3., 4., 5. dráha – eluovaná frakcia 50, 100 a 250 mmol.l⁻¹ imidazolom.

Na charakterizáciu interakcie medzi proteínmi DnaB a Hu v podmienkach *in vivo* sme využili bakteriálny dvojhybridný systém. Metóda je založená na aktivácii adenylát cyklázy, ktorá pozostáva z komplementárnych fragmentov T18 a T25. Keď sú tieto fragmenty fúzované s navzájom interagujúcimi proteínmi, heterodimerizáciou týchto hybridných proteínov dôjde k funkčnej komplementácii T18 a T25 a dochádza k syntéze cAMP. cAMP vytvára komplex s CAP (katabolický aktivačný proteín) a spúšťa tak expresiu génov

zahrnutých v metabolizme maltózy alebo laktózy.

Z chromozómu baktérie *Acetobacter pasteurianus* LMG 1513 sme amplifikovali gény *dnaB* a *hu* a následne klonovali do vektorov pUT18 a pKT25. Pripravenými konštruktmi pUT18 – *dnaB* a pKT25 – *hu* sme kotransformovali bunky *E. coli* BTH101, ktorým chýba aktivita adenylát cyklázy. Transformanty sme selektovali na LB médiu s prídavkom X-gal a IPTG, kde pozitívne transformanty vytvárajú modré kolónie. Vzhľadom na sfarbenie kolónii (Obr. 4) sme skonštatovali, že DnaB proteín vstupuje do interakcie s Hu proteínom.



Obr.4 Interakcia medzi proteínmi DnaB a Hu v bunkách *E. coli* BTH101

Záver

V predloženej práci sme bioinformaticky analyzovali základné charakteristiky DnaB proteínu a génu, ktorý ho kóduje. Pripravili sme vhodný expresný systém pre úspešnú produkciu DnaB proteínu s His-Tag kotvou a optimalizovali podmienky purifikácie cieľového proteínu, ktorý mienime využiť na ďalšie štúdie. Bakteriálnym dvojhybridným systémom sme preukázali, že *in vivo* dochádza k fyzickej interakcii medzi DnaB a Hu proteínom. Schopnosť týchto proteínov vzájomne interagovať *in vitro* budeme sledovať prostredníctvom pull down testu a následnej Western blot analýzy.

Pod'akovanie

Uvedená práca bola vypracovaná v laboratóriu Doc. RNDr. Jozefa Gronesa CSc., ktorému by som chcel poďakovať za odborné vedenie, trpezlivosť, ochotu a všestrannú pomoc.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Biswas E. E., Chen P. H., Biswas S. B. (2002) *Nucleic. Acids. Res.* 30(13), p. 2809
- [2] Gupta M. K., Atkinson J., McGlynn P. (2010) *J. Biol. Chem.* 285(2), p. 979
- [3] Leipe D. D., Aravind L., Grishin N. V., Koonin E. V. (2000) *Genome Res.* 10(1), p. 5
- [4] Kaguni, J. M. (2011) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15(5), p. 606
- [5] Makowska-Grzyska M., Kaguni J. M. (2010) *Mol. Cell.* 37(1), p. 90
- [6] Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Cold Spring Harbor, NY

DNA analýza génov zodpovedných za familiárnu hypercholesterolémiu (LDLR, ApoB-100 a PCSK9) u slovenských pacientov

Dominika Balážiová^{1,2}, Daniela Staníková^{1,3}, Miloslava Hučková¹, Juraj Staník^{1,3}, Branislav Vohnout^{1,4}, Katarína Rašlová^{1,4}, Iwar Klimeš¹, Daniela Gašperíková¹

¹ Slovenská Akadémia Vied, Ústav Experimentálnej endokrinológie, Laboratórium diabetu a porúch metabolizmu, Vlárská 3, 833 06 Bratislava, Slovenská republika;

² Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Mlynská Dolina, 842 15 Bratislava; Dominika.Balaziova@SAVBA.sk

³ Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska Fakulta, 1. Detská klinika, Detská Fakultná Nemocnica s Poliklinikou, Limbová 1, 833 04 Bratislava, Slovenská republika

⁴ Slovenská Zdravotnícka Univerzita, Národné referenčné centrum pre Familiárne Hyperlipoproteinémie, Limbová 12, 833 03 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Familial hypercholesterolemia (FH) is a monogenic metabolic disorder which is characterized by elevated levels of total and LDL cholesterol, tendinous xanthomas and high incidence of early myocardial infarction in young and middle-aged patients. The clinical phenotype of FH is caused predominantly by mutations in *LDLR*, *ApoB-100* and *PCSK9* genes with autosomal dominant inheritance. The aim of this study was to identify spectrum of mutations in these genes by multiple methods. By Real-time PCR the most common mutation R3527Q in *ApoB-100* gene was detected in two of total 62 patients. Subsequently in remaining 60 patients we analysed the *LDLR* gene by bidirectional sequencing, causal mutation has been identified in 29 patients. In 6 patients 5 new variants in *LDLR* has been found with potential pathogenicity. *PCSK9* was analysed in remaining 25 patients, but no causal mutation has been identified. As the number of new mutations is constantly growing, early DNA diagnostics in paediatric and adult patients is an important key in early prevention and treatment of serious complications of FH.

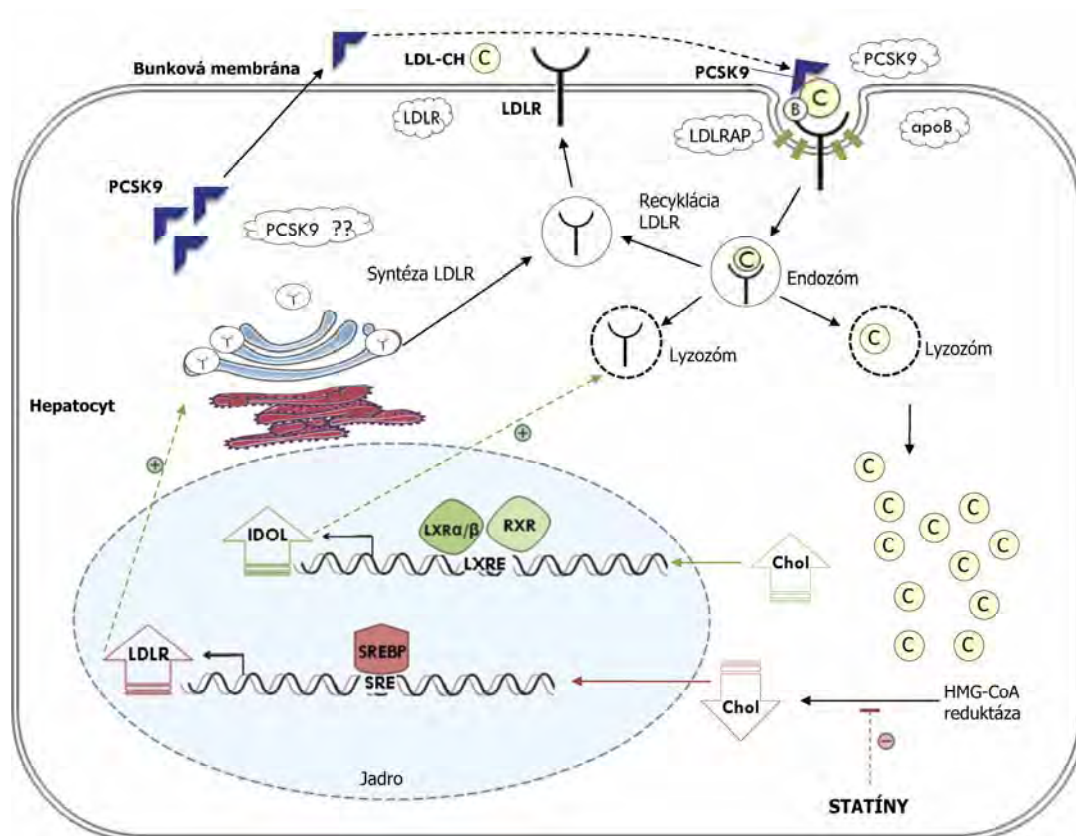
Keywords: familial hypercholesterolemia; DNA diagnostics; *LDLR*; *ApoB-100*; *PCSK9*.

Úvod a formulácia cieľa

Familiárna hypercholesterolémia (FH) je jedno z celosvetovo najrozšírenejších metabolických ochorení, ktoré prvýkrát z klinického hľadiska popísal Carl Müller v roku 1938 [1]. Klinické podozrenie pre diagnózu familiárnej hypercholesterolémie sa opiera o tri základné piliere – biochemické parametre, rodinnú anamnézu a externé prejavy hypercholesterolémie.

Z biochemických parametrov sa sledujú hladiny celkového cholesterolu, LDL a HDL cholesterolu a triacylglycerolov. Za normálne hladiny celkového cholesterolu sa považujú hodnoty do 5 mmol/l, LDL cholesterolu do 3 mmol/l, triacylglycerolov do 2,0 mmol/l. Hodnoty HDL by mali byť čo najvyššie, pričom sú rozličné pre mužské a ženské pohlavie (M min. 1,2mmol/l; Ž min. 1,0 mmol/l) [2]. Pre pacientov s FH sú typické hladiny celkového cholesterolu vyššie ako 8 mmol/l [3].

K externým klinickým prejavom, ktoré sa prejavia približne u 30 % prípadov patrí ukladanie cholesterolu vo forme xantómov v oblasti extenzorov šliach na dolných a horných končatinách, vo forme *arcus lipoides cornea* v dúhovke oka alebo v okolí očí v podobe xantaleziem [4]. V rodinnej anamnéze sa pátra po prítomnosti zvýšených hladín cholesterolu a predčasnom výskyte aterosklerotických komplikácií u prvostupňových a druhostupňových príbuzných.



Obr. 1 Metabolizmus LDL cholesterolu; LDL-CH – LDL cholesterol, LDLR – LDL receptor viaže LDL cholesterol prostredníctvom väzby s ApoB, *ApoB* – gén pre apolipoproteín B, *LDLRAP* – gén pre LDL receptor adaptorový proteín dôležitý pre internalizáciu LDLR do vnútra bunky, PCSK9 – proproteín konvertáza subtilizín/kexín 9 označuje LDL receptor pre degradáciu, HMG-CoA reductáza katalyzuje premenu HMG-CoA na cholesterol vo vnútri hepatocytu. Inhibítory HMG-CoA reductázy (statíny) blokujú funkciu HMG-CoA reductázy a zároveň indukujú expresiu LDL receptorov v pečeni; na znížené množstvo endogénneho cholesterolu bunka reaguje zvýšenou tvorbou LDL receptorov (prostredníctvom väzby SREBP na DNA), pri zvýšenom množstve endogénneho cholesterolu dochádza k transkripcii IDOL, ktorý spôsobí zvýšenú degradáciu LDL receptorov v lyzozóme [5]

Pri **metabolizme LDL cholesterolu** zohráva najdôležitejšiu úlohu LDL receptor (LDLR). LDLR je glykoproteín nachádzajúci sa na membráne hepatocytov, ktorý prostredníctvom väzby s apolipoproteínom B (ApoB), proteínovým komponentom LDL častíc, viaže LDL častice z krvi. Po naviazaní LDL častice na LDL receptor sa vytvorí klatrínom obalená molekula, tá je následne internalizovaná do vnútra bunky pomocou interakcií, ktoré zahŕňajú LDL receptor adaptorový proteín 1 (LDLRAP1). Vo vnútri

hepatocytu dochádza k disociácii komplexu a LDL receptor je recyklovaný späť na bunkovú membránu, voľný cholesterol je rozložený v lyzozóme a využitý vo vnútri bunky. PCSK9 zohráva dôležitú úlohu pri degradácii LDL receptorov, pričom po vytvorení komplexu PCSK9-LDLR dochádza k jeho transportu do lyzozómu a následnej degradácii. PCSK9 zároveň slúži ako post transkripčný inhibítor LDL receptorov, ale presný mechanizmus účinku zatiaľ nebol objasnený (Obr. 1) [5].

Z genetického hľadiska toto ochorenie vzniká ako dôsledok mutácií v génoch pre LDL receptor (*LDLR*), apolipoproteín B (*ApoB-100*), proteín konvertázu subtilizín/kexín 9 (*PCSK9*) alebo LDL receptor adaptorový proteín 1 (*LDLRAP1*). V prípade génov *LDLR*, *ApoB-100* a *PCSK9* je typická autozomálne dominantná dedičnosť, naopak mutácie v *LDLRAP1* sa vyznačujú autozomálne recesívnou dedičnosťou [6].

Prevalencia heterozygotnej formy FH je 1 : 500, čo celosvetovo predstavuje približne 10 miliónov pacientov, na Slovensku sa tento počet odhaduje na 10 000 jedincov s týmto ochorením. Aj keď je prevalencia menej častej homozygotnej formy 1 : 1 000 000, títo pacienti majú niekoľkonásobne závažnejšie klinické prejavy oproti heterozygotom [6].

Mutácie v *LDLR* predstavujú približne 75 % mutácií zodpovedných za toto ochorenie [7]. Gén pre LDL receptor sa nachádza na krátkom ramienku 19. chromozómu (19p13) a je veľký 45 kb. Jeho štruktúra sa skladá z 18 exónov, ktoré kódujú 860 aminokyselín dlhý peptid rozdelený do 5 domén – ligand viažuca, O-karbohydrátová, transmembránová a cytoplazmatická doména a homológ prekursoru EGF [5, 8]. Do dnešného dňa bolo popísaných 1 122 unikátnych mutácií v *LDLR* a každým rokom tento počet narastá, pričom sú relatívne rovnomerne distribuované pozdĺž celého génu [9].

Familiárne defektný ApoB-100 sa klinicky prejavuje podobne ako mutácie génu *LDLR*, príznaky sú však menej závažné. Predpokladá sa, že počet pacientov s defektným apolipoproteínom B predstavuje približne 2 až 5 % všetkých pacientov s FH [5]. Gén pre syntézu apolipoproteínu B sa nachádza na krátkom ramienku 2. chromozómu (2p24-23) a skladá sa z 29 exónov. Najväčší exón veľký 7 572 bp, exón 26, tvorí viac ako polovicu veľkosti proteínu ApoB [10]. Apolipoproteín B-100 je proteínový komponent LDL častíc a práve exón 26 kóduje oblasť apolipoproteínu B, prostredníctvom ktorej dochádza k väzbe LDL častíc na LDL receptory. Najčastejšou mutáciou je missense mutácia R3527Q, ostatné mutácie sú zriedkavé [11].

Mutácie v génoch *PCSK9* a *LDLRAP1* sú v porovnaní s predchádzajúcimi génmi len veľmi zriedkavé. Prevalencia mutácií v heterozygotnej forme v *PCSK9* je 1 : 2500

a *LDLRAP1* 1 : 5×10^6 [6].

Cieľom našej práce bolo: 1. Identifikovať spektrum mutácií v génoch *LDLR*, *ApoB-100* a *PCSK9* spôsobujúcich familiárnu hypercholesterolémiu pomocou priameho obojsmerného sekvenovania a Real-time PCR; 2. Určiť potenciálnu patogenitu nových doteraz nepopísaných variantov pomocou *in silico* prístupu.

Materiál a metódy

V spolupráci s Metabolickým centrom doc. K. Rašlovej, Metabolickou ambulanciou 1. Detskej kliniky DFNSP v Bratislave a Detskou endokrinologickou ambulanciou v Poprade sme vybrali 62 pacientov s klinickým podozrením na familiárnu hypercholesterolémiu. Pacientom bola odobraná vzorka periférnej krvi pre DNA analýzu. Na izoláciu DNA bol použitý štandardný postup komerčne dodávaného kitu E. coli Whole Blood DNA Maxi preparation Kit (BioTeke Corporation, Čína) [12].

V prvom kroku sme analyzovali vzorky od všetkých pacientov metódou Real-time PCR na prítomnosť najčastejšej missense mutácie R3527Q. Vzorky boli spracované podľa postupu odporúčaného dodávateľom použitím Maxima Probe qPCR Master Mix (2x) (Fermentas, Slovensko) a TaqMan SNP Genotyping Assay ID: c_1026605_10, rs5742904 (Applied Biosystems, Nemecko) na cykléri 7900HT fast Real-time PCR system (Applied Biosystems, Nemecko) [13].

V ďalšom kroku sme analyzovali gény *LDLR* a *PCSK9* priamym obojsmerným sekvenovaním pomocou BigDye Terminator v 1.1 & v 3.1 5 x Sequencing Buffer (Applied Biosystems, USA) na genetickom analyzátore ABI – Hitachi 3130 (Applied Biosystems/Hitachi, USA/Japonsko) [14]. Získané sekvenačné dáta sme vyhodnotili pomocou softvéru SeqScape v 2.7 (Applied Biosystems, USA) a porovnali s referenčnou sekvenciou jednotlivých génov z Genebank. Primery pre analýzu génov *LDLR* a *PCSK9* sme použili podľa publikácií Chater a kol., 2006 [15]; Homer a kol., 2008 [16]; Taylor a kol., 2010 [17].

Výsledky a diskusia

V celom súbore 62 pacientov sme metódou alelickej diskriminácie detegovali prítomnosť najčastejšej mutácie R3527Q v géne *ApoB-100* u dvoch pacientov (3% pacientov z celkového súboru), čo zodpovedá údajom o percentuálnom zastúpení pacientov aj v iných krajinách [5]. R3527Q predstavuje zámenu arginínu v aminokyselinovej pozícii 3527 za glutamín v 26 exóne, ktorá sa nachádza presne vo väzbovom mieste apolipoproteínu B-100 na

LDL receptor. Väzbová afinita ApoB-100 k LDLR je tak až o 30% znížená oproti normálnemu fenotypu [11].

Následne sme u zvyšných 60 pacientov, u ktorých nebola identifikovaná prítomnosť mutácie R3527Q analyzovali gén *LDLR* priamym obojsmerným sekvenovaním. Touto metódou sme potvrdili prítomnosť patogénnej mutácie u 47% jedincov (29/62 pacientov), pričom sme detegovali 16 bodových substitúcií, 1 deléciu a 1 inzerciu. U 6 pacientov sme identifikovali 5 variantov, ktoré zatiaľ v dostupnej literatúre neboli popísané. *In silico* analýza nových variantov v exónoch 4, 8, 12 a 14 a v intróne 3 predpovedala ich pravdepodobnú patogenitu (Tab. 1).

Tab. 1 *In silico* analýza nových variantov v géne *LDLR*

Exón	Variant	Polyphen 2	SIFT	ESE/ESS Finder	Počet jedincov
Exón 2	S177P	Patogénna	Ovplyvňuje funkciu proteínu	-	1
Intrón 3	314-2A>G	-	-	Pravdepodobne patogénna	2
Exón 8	C377R	Patogénna	Ovplyvňuje funkciu proteínu	-	1
Exón 12	A612S	Pravdepodobne patogénna	Ovplyvňuje funkciu proteínu	-	1
Exón 14	L680P	Patogénna	Ovplyvňuje funkciu proteínu	-	1

Polyphen 2 a SIFT predikčné programy funkčnej analýzy exónových variantov; ESE/ESS Finder predikčný program defektov na úrovni zostrihu génov; - variant nebol analyzovaný daným programom

Exónový variant S177P, pri ktorom dochádza k substitúcii tymínu za cytozín c.529T>C, čo spôsobí zámenu aminokyseliny serínu za prolín sme identifikovali u jedného probanda. Následne sme vyšetrili DNA vzorky od 5 rodinných príslušníkov a prítomnosť substitúcie sme potvrdili u otca a sestry probanda. Zvýšené hladiny celkového cholesterolu kosegregovali s prítomnosťou variantu S177P u probanda aj rodinných príslušníkov, pričom prítomnosť tohto variantu sme nedetegovali u žiadnych iných pacientov.

V súčasnosti prebieha nábor a odber biologického materiálu od rodinných príslušníkov probandov, u ktorých boli identifikované nové varianty.

Mutácie v géne *PCSK9* sú málo časté v porovnaní s mutáciami v géne pre LDL receptor. Predstavujú približne iba 1% všetkých mutácií vedúcich k vzniku familiárnej hypercholesterolémie, pričom aj penetrancia tohto ochorenia je veľmi variabilná [8]. U zvyšných 25 jedincov bez prítomnosti mutácie v *LDLR* sme analyzovali gén *PCSK9*. Nepodarilo sa nám detegovať prítomnosť žiadnej kauzálnej mutácie, ale identifikovali sme

11 známych polymorfizmov v exónoch aj intrónoch tohto génu.

Záver

DNA analýzou sme u 50% slovenských pacientov potvrdili klinické podozrenie na FH. Najčastejšie išlo o mutácie v *LDLR* (47%), u malého počtu pacientov (3%) boli nájdené mutácie v géne *ApoB-100*. Mutácie v géne *PCSK9* u analyzovaných pacientov neboli zistené. DNA diagnostika vie výrazne urýchliť diagnostický proces FH, pričom včasná diagnostika je kľúčom k včasnej prevencii a liečbe závažných komplikácií.

PodĎakovanie: Táto práca bola podporená projektom Transendogen ITMS 26240220051.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Müller C. (1938) Acta. Med. Scand. 89, p. 75
- [2] Rašlová K., Filipová S., Mikeš Z., et al. (2003) Interná med. 3(1), p. 10
- [3] Wierzbicki A. S. (2000) Cor. Health Care. 4, p. 192
- [4] Nemati M. H., Astaneh B. (2010) Vasc. Health. Risk. Manag. 6, p. 1079
- [5] Fahed A. C., Nemer G. M. (2011) Nutr. Metab. (Lond). 8(1), p. 1
- [6] Rašlová K., Fábryová L. (2008) Cardiol. 17(1), p. 9
- [7] Marduel M., Carrie A., Sassolas A. (2011) Hum. Mut. 31, p. 1811
- [8] Al-Allaf F. A., Coutelle Ch., Waddington S. N. (2010) Int. Arch. Med. 3(36), p. 1
- [9] Leigh S. E. A., Foster A. H., Whittall R. A. (2008) Ann. Hum. Gen. 72, p. 485
- [10] Scott J. (1989) Mol. Bio. Med. 6(1), p. 65
- [11] Varret M., Abifadel M., Rabés J. P. (2008) Clin. Gen. 73, p. 1
- [12] Ecoli, s.r.o. [Citované: 14. marec 2013]
<[http://www.ecoli.sk/files/documents/btk/whole blood dna maxi preparation kit \(solution\).pdf](http://www.ecoli.sk/files/documents/btk/whole blood dna maxi preparation kit (solution).pdf)>
- [13] Applied Biosystems [Citované: 14. marec 2013]
<http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042998.pdf>
- [14] Applied Biosystems [Citované: 14. marec 2013]
<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_041329.pdf>
- [15] Chater R., Chihab K. A., Rabés J. P. (2006) Clin. Chim. Acta. 373, p. 62
- [16] Homer V. M., Marais A. D., Charlton F. (2008) Atheroscl. 196(2), p. 659
- [17] Taylor A., Patel K., Tseke J. (2010) Clin. Genet. 77, p. 97

Vývinové štádiá nostokálnej cyanobaktérie *Rivularia haematites* tvoriacej stromatolity v Šujskom rašelinisku v Rajeckej doline

Terézia Balážová¹, František Hindák²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra botaniky, Révová 39, 81102 Bratislava 1, Slovenská republika; balazova.t@gmail.com

²Slovenská akadémia vied, Botanický ústav, Dúbravská cesta 9, 84523 Bratislava 4, Slovenská republika

Abstrakt

In a swampy-rivulet in Šujské rašelinisko, C Slovakia, the nostocalean cyanobacteria *Rivularia haematites* formed macroscopic colonies, which can be characterized as the recent stromatolites. Colonies were hemispherical up to irregularly oval, to 12 cm in diameter wide and 3 cm high, their colour was blue-green, dark green to brown. During vegetational season from May to November 2012 three steps of the filament development could be distinguished: (i) filaments blue-green, without heterocytes (early spring), (ii) filaments blue-green, with sporadically formed heterocytes (early summer), (iii) filaments ramified, always with basal heterocytes and yellow to brown stratified sheaths (summer to autumn).

KLúčové slová: *Nostocales; Rivularia haematites; life cycle; stromatolites; Šujské rašelinisko.*

Úvod a formulácia cieľa

Pomenovanie stromatolit (lat. stroma-vrstvy, gr. lithos-kameň) prvý krát použil Kalkowsky v roku 1908 [1]. Stromatolity sú vrstevnaté vápenaté alebo kremičité horniny, ktoré vznikali dlhodobým rastom mikroorganizmov, najmä cyanobaktérií, najstaršie majú 3,5 miliardy rokov [2]. Recentné morské stromatolity sú dnes veľmi vzácne. Majú tvar nepravidelných kopcovitých útvarov až bochníkov vyčnievajúcich z plytkého dna oceánu. Sú známe napríklad zo zálivu Shark Bay (Austrália) [3]. Stromatolity náhle zmizli asi pred 5 miliónmi rokov, ich náhly zánik zapríčinili pravdepodobne herbivorné mäkkýše, ktoré sa rozšírili práve v tejto dobe [4].

Recentné sladkovodné stromatolity sú menej známe a nevenovala sa im taká pozornosť ako fosílnym morským stromatolitom. Z cyanobaktérií ako ich pôvodcovia najviac prichádzajú do úvahy zástupcovia čeľade Rivulariaceae [5], kam patrí aj rod *Rivularia* (Roth) C.A. Agardh [6,7]. V našich podmienkach je pomerne častý druh *R. haematites* C.A. Agardh ex Bornet et Flahault, ktorú sme pozorovali aj v slatine Šujské rašelinisko v Rajeckej doline. Na Slovensku sa tento druh udáva z viacerých lokalít z okolia Banskej Bystrice, Vysokých Tatier a Spiša [8].

V nasledujúcej časti prezentujeme naše pozorovania vývinu vlákien a kolónií nostokálnej cyanobaktérie *R. haematites*, ktorá rástla na dne malého potoka v Šujskom

rašelinisku vo vegetačnej sezóne r. 2012.

Materiál a metódy

Skúmaná lokalita sa nachádza južne od obce Šuja. Jej súradnice sú: 49°03'44'' N, 18°37'13'' E, nadmorská výška je 475 m. Biotop predstavujú prameniskové slatiny v nive potoka pod svahom karbonátového masívu. Je v katastrálnom území obce Rajecká Lesná. Územím pretekajú dva pomaly tečúce potôčiky, z ktorých je jeden viac zarastený trstinou. Tieto potoky privádzajú vodu až k biotopu 7230 - slatiny s vysokým obsahom báz [9].

Šujské rašelinisko je prírodná rezervácia so 4. stupňom ochrany a rozlohou 10,8 ha. Rašelinisko je územím európskeho významu. Jeho identifikačný kód je SKUEV0255 a rozloha 13,48 ha [10]. Toto územie negatívne ovplyvnil odvodňujúci kanál a ťažba rašeliny v rokoch 1975-1976 [11]. Po ťažbe ostali jamy, tie vyplnila voda z potôčikov a pri väčšom prísune vody sa tu vytvárali rozsiahlejšie vodné plochy. Tento biotop osídľuje trstina, čo nie je priaznivý stav pri starostlivosti o rašelinisko, pretože trstina sa tu správa ako expanzívny druh a zarastajú ňou spoločenstvá šašiny hrdzavej a ostrice. V rámci manažmentových opatrení sa rašelinisko pod záštitou NP Malá Fatra pravidelne kosí a nadbytočná vegetácia sa z plochy odnáša. Ďalej za negatívny vplyv sa dá považovať aj súčasná ťažba dolomitu, kde vysoká prašnosť z povrchového lomu zapríčiňuje usadzovanie sedimentov vápencového a dolomitového štrku na území Šujského rašeliniska.

Druh *Rivularia haematites* bol sledovaný na lokalite PR Šujské rašelinisko vo vegetačnej sezóne roku 2012. Táto nostokálna sinica sa vyskytovala po takmer celej dĺžke dvoch meandrujúcich potočikov, ktoré pretekajú územím Šujského rašeliniska. Priemerná hodnota pH bola 8,23. Max. nameraná teplota počas odberov bola 19,8 °C (3.7.2012) a minimálna 2,4 °C (6.1.2013).

Vzorky boli odoberané v mesačných intervaloch (máj–november) do 20 mililitrových plastových nádob a časť z nich bola fixovaná formaldehydom s výslednou koncentráciou 4%.

Materiál sme určovali priamo po odbere vzoriek v algologickom laboratóriu Botanického ústavu SAV v Bratislave a potom priebežne sledovali v subkultúrach. Naše pokusy získať čistú kultúru neboli zatiaľ úspešné. Mali sme k dispozícii mikroskop Diaplan Leitz s fotografickým zariadením Wild Photoautomat MPS 45. Na určovanie sme použili citovanú literatúru [4, 8]. Teplota vody a pH boli merané priamo na lokalite prístrojom JENWAY 370.

Výsledky a diskusia

Makroskopické kolónie nostokálnej cyanobaktérie *Rivularia haematites* sa na lokalite vyskytovali v potôčiku. Boli rôznej veľkosti: od malých sotva viditeľných guľičiek až po veľké pologuľovité až oválne poduškovité kolónie do 12 cm v priemere, vysoké do 3 cm (obr.1 B). Boli tuhé, plstnaté, modrozelené až hnedé, a to v závislosti od polohy vo vode a tiež vegetačnej sezóny.

Na priereze mladých kolónií bolo spravidla možné odlíšiť 3 vrstvy nad sebou (obr.1 C, horné vrstvy). Spodná vrstva bola tmavá, zložená zväčša z kryštálov CaCO_3 , stredná bola zelená od vlákien *R. haematites* (s kryštálmi CaCO_3) a horná bola slizovitá s hyalínnymi koncami vlákien a s drobnými minerálnymi telieskami, ale kryštálov CaCO_3 bolo menej (obr.1 F). Vlákna cyanobaktérie boli kompaktné, prichytené bazálnou časťou na spoločný kamenistý substrát, viac-menej radiálne usporiadané, ku koncom zužované a hyalínne.

Vlákna aj kolónie sa v priebehu výskumu odlišovali prítomnosťou heterocytov, nepravým rozkonárením a farbou pošvy trichómov. Vo vývine *R. haematites* bolo možné rozlíšiť 3 štádiá:

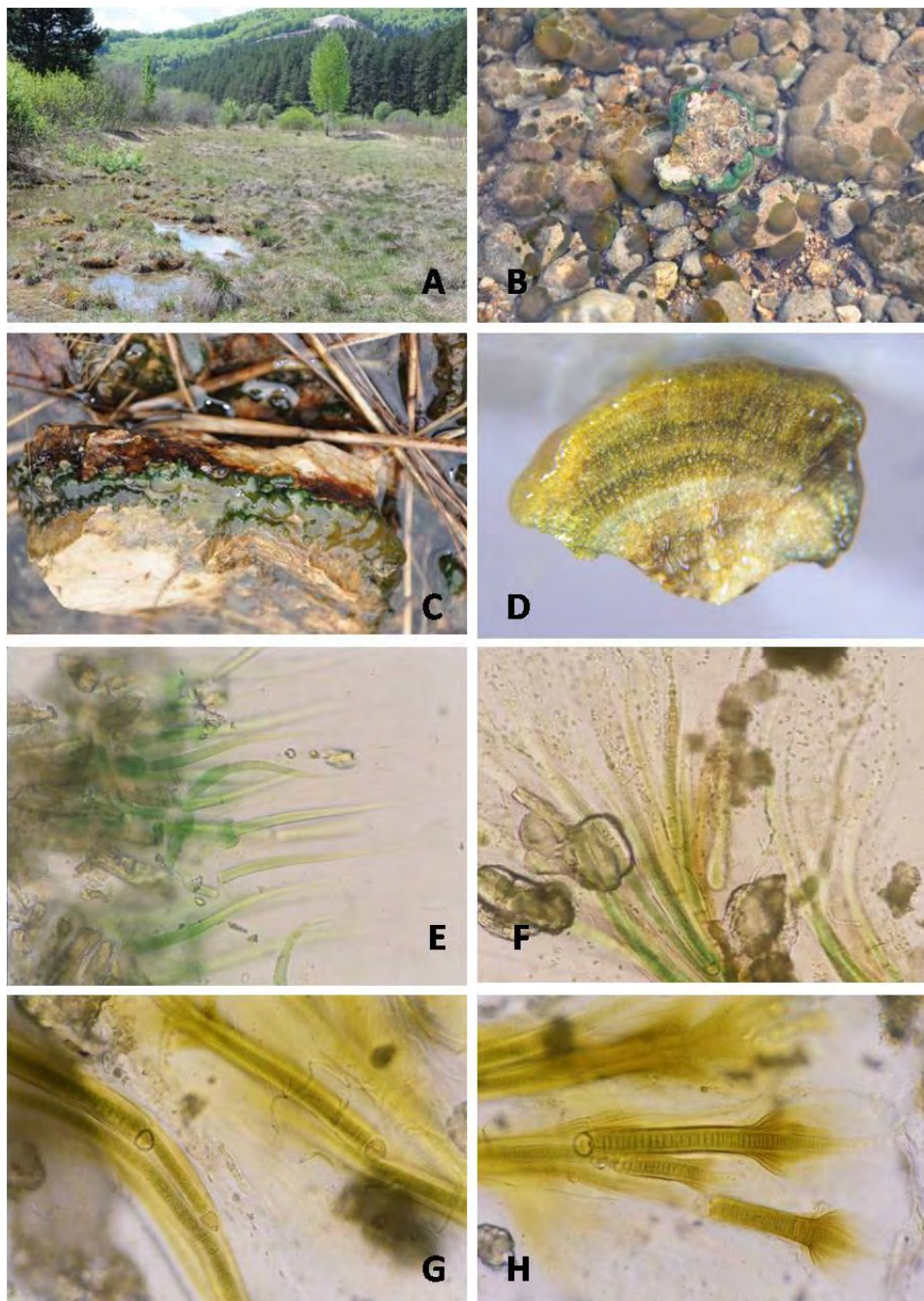
- 1) V prvom odbere 9.5.2012 kolónie mali zväčša jasne zelenú farbu a vlákna boli v slize kolónie jednotlivé, bez heterocytov, pošvy vlákien boli hyalínne, nevrstvovité alebo iba mierne vrstvovité (obr.1 F).
- 2) V odbere dňa 29.5. a 3.7. 2012 sa vyskytli prvé bazálne heterocyty, pošvy vlákien však boli hyalínne alebo iba mierne žltkavé (obr.1 G).
- 3) Od odberu 3.7.2012 až do posledného odberu 28.10.2012 bolo dobre utvorené nepravé rozkonárenie a pošvy boli výrazne žlto až hnedo zafarbené (obr.1 G), na koncoch vlákien často rozšírené do tvaru písmena A (obr.1 H). V dôsledku toho povrch kolónie bol zelenohnedý až hnedý.

Opis kolónií a vlákien druhu *Rivularia haematites* zo Šujského rašeliniska:

Makroskopické kolónie (obr.1 B-D) poduškovité, guľovité až oválne alebo nepravidelné, vrstvovité, prestúpené CaCO_3 , neskoršie celkom z kamenelé, do 12 cm v priemere, vysoké do 3 cm, kompaktné, plst'ovité, modrozelené, tmavo zelené alebo hnedasté, prichytené na kamenistý alebo štrkovitý podklad. Vlákna v kolónii \pm radiálne husto vedľa seba uložené, ku koncom postupne zužované, dlhé do 200 μm alebo aj dlhšie, na báze u mladých vlákien 3-5- (7) μm široké, u starších vlákien do 10 μm , na koncoch dlho vlasovito vytiahnuté, hyalínne. Pošva u mladých vlákien tenká, hyalínna, u starších vlákien hrubá, vrstvovitá, žltá až žltohnedá, 1-3 μm hrubá, na konci vlákien náhle rozšírená, do 15-20 μm široká, akoby roztrapatená. Rozkonárenie nepravé, utvárané až u starších vlákien. Heterocyty bazálne,

jednotlivé, oválne, pologuľovité až kónické, do 7 μm široké. Bunky rozlične dlhé, v dolnej časti mladých vlákien do 4 μm , u starších vlákien do 2-3 μm , v hyalínnej vlasovitej časti do 10 μm dlhé alebo aj dlhšie.

Výskyt: PR Šujské rašelinisko, 49°06'24'' N, 18°61'85'' E, prichytené na kamenitom dne malého potôčika, miestami súvisle pokrývali kamenitý substrát, priemerné pH vody 8,23.



Obr.1 A Šujské rašelinisko, 23.6.2012; B rôzne veľké poduškovité kolónie cyanobaktérie *Rivularia haematites* na kameňoch; C, D detail kolónií *R. haematites*; E mladé vlákna *R. haematites* bez heterocytov; F nepravé rozkonárenie vlákien s bazálnymi heterocytmi; G detail nepravého rozkonárenia a vrstvomitej pošvy vlákien; H konce vlákien s rozšírenými pošvami; foto T. Balážová (obr. A-D), F. Hindák (obr. E-H).

Záver

Kolónie nostokálnej cyanobaktérie *Rivularia haematites* rastúce v Šujskom slatinnom rašelinisku dosahovali až 12 cm v priemere. Boli prichytené na drobnom vápenitom kamenitom podklade plytkého potôčika a mali výrazné vrstvovanie. Vyzrážané kryštály CaCO_3 sa usadzoval v slize medzi vláknami kolónie, ktoré sa takto postupne menili na horninu. Podľa viacvrstvovej štruktúry a petrifikácie ich možno charakterizovať ako stromatolity, aké nachádzame aj inde na Slovensku [8] a takisto aj v zahraničí, napr. v rieke Drogorija v Slovinsku [12], či v potoku Westerhöfer v Nemecku [13].

Naše pozorovania dokazujú, že na presné určenie mikroorganizmov má veľký význam sledovanie počas celej vegetačnej sezóny. Dôležité taxonomické znaky, akými sú pri *R. haematites* tvorba heterocytov a nepravé rozkonárenie či inkrustácia pošiev vlákna, sa vyskytujú až na konci vývinového cyklu.

Doterajšie výsledky treba doplniť ďalšími pozorovaniami v nasledujúcich vegetačných sezónach, napr. pri stanovení veku stromatolitov, pri štúdiu systému narastania kolónii s použitím elektrónovej mikroskopie.

Pod'akovanie

Správe NP Malá Fatra ďakujeme za povolenie výskumu v Šujskom rašelinisku (T.B.). Práca bola financovaná s podporou projektov VEGA 2/130/10 a 2/0073/13 (F.H.).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Kalkowsky E. (1908) Z. Deutsch.Geol. Gesellschaft 60, p.68.
- [2] Round F.E. (1981) The ecology of algae. Cambridge University Press, Cambridge, p. 492.
- [3] Japan Geosciense Union [Citované : 5. marec 2013]
<http://www2.jpгу.org/meeting/2010_disc2/program/PDF/B-BG005/BBG005-21_e.pdf>
- [4] Kalina T., Váňa J. (2005) Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Univerzita Karlova v Praze, Nakl. Karolinum, p.73.
- [5] Whitton B.A., Mateo P. (2012) Rivulariaceae. In: Whitton B. (Ed.) Ecology of Cyanobacteria II. Springer, Dordrecht, Heidelberg, New York, London, p. 561.
- [6] Starmach K. (1966) Cyanophyta – sinice, Glaukophyta – glaukofity. PWN, Warszawa, p. 579

- [7] Kondrateva N.V. (1968) Siňo-zeleni vodorosti – Cyanophyta, časť 2 Klas Gormogonieví – Hormogoniophyceae. Naukova dumka, Kyiv, p. 422
- [8] Lhotský O., Rosa K., Hindák F. (1974) Súpis siníc a rias Slovenska. Veda VSAV, Bratislava, p. 204
- [9] Štátna ochrana prírody SR [Citované: 6. marec 2013]
<<http://www.sopsr.sk/natura/index.php?p=4&sec=6&biotop=7230>>
- [10] Natura 2000 [Citované: 2. január 2013]
<http://files.npmalafatra.sk/200000102-cd7a2ce739/Mociar_Suj_rasel.pdf>
- [11] Urbanová V. (1986) Rašelinisko Šuja. In: Badík M. Vlastivedný zborník Považia 15, . vyd. – Nové Zámky, p.245
- [12] Hindák F. (2008) Colour atlas of cyanophytes. Veda, Bratislava, figs 738-741
- [13] Hodačová A. (2011) Sinice spojené se stromatolitovými biofilmy v německém potoce Westerhöfer (Diplomová práca) Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, p. 1

Identifikácia promótorov a expresia vybraných neuropeptidov priadky morušovej

Branislav Bednár, Dušan Žitňan, Ivana Daubnerová

Slovenská akadémia vied, Ústav Zoológie SAV, odd. Molekulárnej fyziológie, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovenská republika; bedn.bran@gmail.com

Abstrakt

Insect ecdysis is hormonally regulated process which provides an opportunity to study complex events from gene expression, through the release of bioactive compounds that leads to precisely defined behaviors and other functions. Behavioral patterns accompanying various phases of ecdysis are controlled by endocrine Inka cells and specialized neurons of the central nervous system (CNS). Inka cells produce ecdysis triggering hormone (ETH) which activates specialized neurons through ETH receptors (ETHR-A and ETHR-B). In the silkworm *Bombyx mori* activation of a specific neuronal network expressing ETHR-A leads to production of cGMP and secretion of several neuropeptides, including bursicon and allatostatin-CC (AST-CC). To understand interactions between these molecules we analyzed elevation of cGMP levels and developmental expression of these neuropeptides. For functional studies we used recombinant baculoviruses to identify promoters for bursicon and AST-CC and generated a stable transgenic strain overexpressing ETHR-A in this network.

Kľúčové slová: *ekdýzia; bombyx mori; burzikón; allatostatín cc; bakulovírus; piggyBac*

Úvod a formulácia cieľa

Hmyz ako skupina živočíchov patrí k najúspešnejším a najrozšírenejším organizmom na našej planéte. Vývin hmyzu od larvy po imágo zahŕňa opakované zvliekanie starej kutikuly pomocou hormonálne regulovaných, špecifických behaviorálnych prejavov nazývaných ekdyziálna sekvencia. Túto možno rozdeliť na tri základné fázy a to pre-ekdýzia, ekdýzia a post-ekdýzia. Úspešnosť ekdýzie je závislá od koordinovanej génovej expresie, kontrolovanej rôznymi peptidovými, steroidnými a juvenilnými hormónmi, zodpovedných za vytváranie novej kutikuly a ostatných tkanív potrebných pre ďalšie štádium.

Kritickým endokrinným signálom, ktorý vyvolá zastavenie prijímania potravy a tvorbu novej kutikuly, je vylučovanie ekdysteroidov do hemolymfy [1]. Ekdysteroidy regulujú expresiu rôznych génov a riadia viacero dôležitých procesov vo vývine hmyzu. Ekdysteroidy svojim pôsobením v endokrinných Inka bunkách aktivujú expresiu *eth* génu, ktorý kóduje pre-ekdýziotropný hormón (PETH) a ekdýziotropný hormón (ETH) [2]. Okrem toho ekdysteroidy indukujú expresiu ETHR a citlivosť centrálnej nervovej sústavy (CNS) na ETH. Lokalizáciou ETH receptora (ETHR) pomocou *in situ* hybridizáciou, v neurónoch CNS u druhu *Manduca sexta* sa podarilo odhaliť cieľové bunky pre ETH [3]. Jednou zo skupín buniek produkujúcich ETHR- A je aj sieť neurónov L₁/ IN 704. Známym princípom aktivácie

uvedenej siete neurónov je vzrast hladín cGMP, ktorý je asociovaný so zvýšenou excitabilitou predchádzajúcou behaviorálnym prejavom[4][5]. Produkcia cGMP v homologickej sieti L₁/IN-704 neurónov bola počas ekdýzie detegovaná u veľkého počtu fylogeneticky rôznych druhov[6]. Tieto špecifické neuróny produkujú neuropeptidy CCAP (kardioaktívny peptid kôrovcov) v L₁ aj IN-704 a MIP (myoinhibičný peptid) v IN-704 ktoré sa priamo zúčastňujú regulácie ekdýzie.

Okrem CCAP a MIP produkuje sieť L₁/IN-704 u *M. sexta* aj burzikón. Pokusmi s krídlami *M. sexta* bolo dokázané, že burzikón je zodpovedný za plasticitu aj sklerotizáciu kutikuly čo sú deje sprevádzajúce poslednú fázu ekdýziálnej sekvencie – post-ekdýziu[7].

V našej práci sa zameriavame na druh *Bombyx mori*. Jeho najväčšou výhodou ako modelového organizmu je najmä veľkosť, ktorá umožňuje nie len lepšie štúdium nervovej sústavy a iných tkanív, ale aj lepšie pozorovanie zmien fenotypu v prípade zásahov do genómu. Navyše genóm priadky morušovej je plne sekvenovaný, čo umožňuje využívanie rôznych transgénnych prístupov.

Expresia a funkcia niektorých neuropeptidov nie je u priadky morušovej doposiaľ preštudovaná. V našej práci sa zameriavame na expresiu a funkciu neuropeptidov burzikónu a allatostatínu CC (AST-CC) produkovaných sieťou L₁/IN 704. AST-CC je nový peptid, ktorý bol predikovaný ako produkt génu *ast-CC* [8]. Tento gén bol identifikovaný ako paralóg už známeho génu, kódujúceho allatostatínu C u hmyzu. Bioinformatickými postupmi obidva gény zistili u viacerých druhov hmyzu, vrátane zástupcov *Diptera*, *Lepidoptera* a *Coleoptera*[8].

Burzikón je heterodimerický proteínový hormón, ktorého expresiu a funkciu pri tmavnutí a sklerotizácii kutikuly poznáme predovšetkým u múch a *M. sexta*, avšak u *B. mori* nie je tento jeho úloha preskúmaná. Predpokladáme, že u priadky morušovej môže tiež hrať úlohu dôležitého regulačného faktora. Z týchto dôvodov je objasnenie expresie a funkcie týchto neuropeptidov veľmi dôležité. Na opísanie expresie využívame *in situ* hybridizáciu s cDNA próbami značenými digoxygenínom spolu s imunohistochemickým farbením pomocou protilátok proti rôznym neuropeptidom. Na funkčnú analýzu neuropeptidov sme využili dva transgénne postupy. Prvým bola identifikácia *upstream* regulačných oblastí (promótorv) pre gény kódujúce burzikón a AST-CC pomocou bakulovírusového expresného systému [9]. Druhým nástrojom bolo použitie *piggyBac* transpozónu na prípravu stabilných transgénnych línií *B. mori*.

Materiál a metódy

Na opísanie expresie astCC bunkách CNS sme si pripravili dig-oxygenínom značenú cDNA próbu na základe sekvencie génu *fmgV41d19f* z genómovej databázy priadky morušovej. Pripravenú próbu sme použili na *in situ* hybridizáciu s nervovými páskami izolovaných z farátnych lariiev, kukiel a imág priadky morušovej. Po hybridizácii sme niektoré nervové pásy ďalej farbili imunohistochemicky s protilátkami proti CCAP a MIP. Po farbení sme preparáty zamontovali do glycerolu a pozorovali pod svetelným, fluorescenčným a konfokálnym mikroskopom. Podobne sme postupovali aj pri opise expresie neuropeptidu Burzikónu.

Pomocou imunohistochemického farbenia sme sledovali hladiny cGMP v bunkách CNS farátnych lariiev a kukiel priadky morušovej počas aktivácie ekdýzie napichnutím ETH.

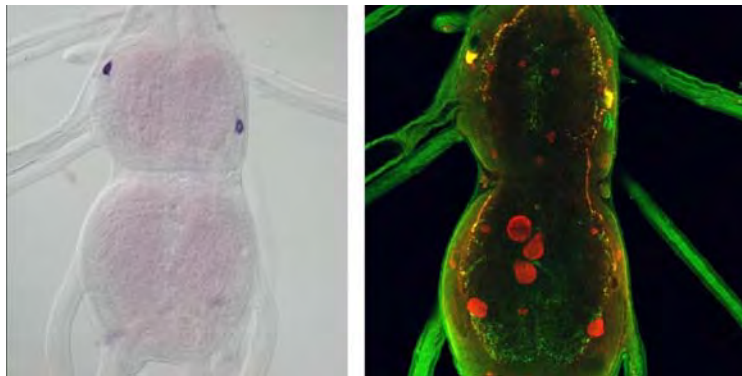
Na identifikáciu funkčných promótorov sme použili Bac-to-Bac® *Baculovirus Expression System* od firmy Invitrogen. Analyzovanú *up-stream* regulačnú oblasť sme najprv klonovali do pFAST Bac [EGFP] vektora, ktorý sme následne transformovali do buniek *E. coli* MAX Efficiency® DH10Bac™. V týchto bunkách došlo k transpozícii našej promótorovej kazety do prítomnej bakulovírusovej DNA. Rekombinantný bakmid sme použili na transfekciu do hmyzích Sf-9 buniek. Po dostatočnom namnožení vírusu sme ho napichávali v objeme 15-30 µl do čerstvo zvlečených lariiev piateho instaru priadky morušovej. Približne po 10 dňoch od injektácie vírusovej zmesi, sme z lariiev izolovali CNS a expresiu EGFP proteínu pozorovali pod fluorescenčným mikroskopom.

Na prípravu stabilnej transgénnej línie sme používali vektor *piggyBac* 3xP3DsRed. Do tohto vektora sme vložili génovu kazetu obsahujúcu identifikovaný astCC promótor, za ktorým bol umiestnený gén pre ETH receptor A. Pripravený plazmid *pBac*[astCC-ETHR-A3xP3DsRed] sme spolu s *helper* plazmidom napichávali do čerstvo nakladených vajíčok priadky morušovej. Húsenice vyliahnuté z napichaných vajíčok boli chované až do dosiahnutia dospelého štádia a krížené navzájom medzi sebou, alebo s motýľmi N4 línie. Larvy F1 generácie boli skrínované na prítomnosť červeného fluorescenčného proteínu dsRed v očiach.

Výsledky a diskusia

Pomocou *in situ* hybridizácie sa nám podarilo opísať expresiu astCC a burzikónu. Na základe následného imunohistochemického farbenia sme zistili, že oba tieto neuropeptidy sú produkované sieťou neurónov L₁/IN-704 (obr.1). Tieto bunky produkujú viacero

neuropeptidov (MIP, CCAP, burzikón) a sú centrálnymi regulátormi ekdýzie [10]. Zistili sme, že počas vývinu jedinca dochádza k zmenám v počte buniek exprimujúcich jednotlivé neuropeptidy. Najvýraznejšou zmenou prechádza expresia astCC.

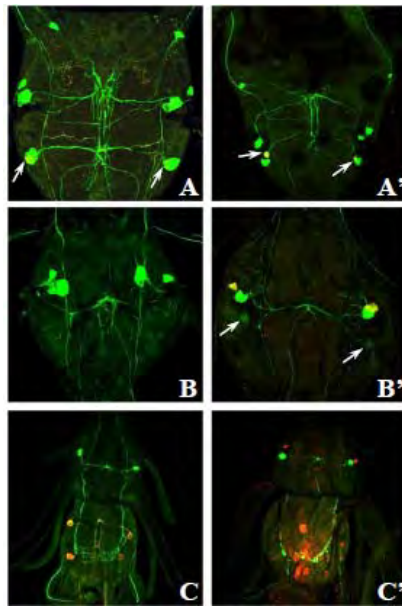


Obr. 1 Kolokalizácie expresie *ast-cc* s neuropeptidmi v terminálnom abdominálnom gangliu (TAG) farátnej larvy priadky morušovej. (A) TAG po *in situ* hybridizácii s próbou na *ast-cc* mRNA. (B) To isté ganglion imunohistochemicky farbené s protilátkami proti CCAP(zelené) a MIP(červené, kolokalizácia MIP/CCAP -žlté).

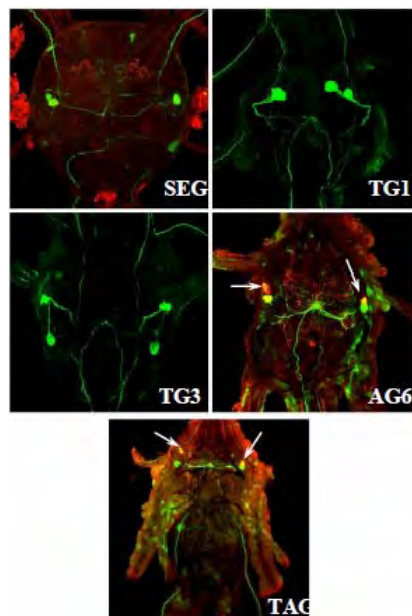
Pomocou imunohistochemie sme sledovali aj produkciu cGMP v sieti $L_1/IN-704$ po napichnutí ETH do lariev. Okrem tejto siete dochádza k aktivácii ďalších neurónov známych ako $L_{4,5}$ v abdominálnych gangliách a vo VMN neurónoch terminálneho ganglia (obr.2). Ich funkcia nie je doposiaľ známa. Zvyšovanie hladín cGMP naznačuje aktiváciu daných neurónov v rôznych fázach ekdyziálnej sekvencie.

Pomocou bakulovírusového expresného systému sa nám podarilo identifikovať funkčné promótor pre AST-CC a beta podjednotku burzikónu. V CNS lariev infikovaných rekombinantými bakulovírusom dochádzalo k expresii EGFP len v tých neurónoch, v ktorých bol identifikovaný promótorový fragment aktívny. V prípade AST-CC promótor bol EGFP exprimovaný v sieti $L_1/IN-704$ celej CNS. Teda v tých istých bunkách ako sme detegovali expresiu AST-CC pomocou *in situ* hybridizácie. Aktivitu promótoru pre beta podjednotku burzikónu sme okrem očakávaných buniek podhltanového a hrudných ganglií pozorovali aj v bunkách $L_1/IN-704$ všetkých abdominálnych ganglií (obr.3).

Na objasnenie funkcie astCC sme pripravili stabilnú transgennú líniu s použitím *piggyBac* transpozómu. Pripravená línia niesla transgén vo forme ETHR-A umiestneného za astCC promótorom. Cieľom bolo pripraviť líniu, ktorá by konštitutívne exprimovala ETHR-A v bunkách, v ktorých je astCC promótor aktívny. Takúto líniu sa nám podarilo úspešne pripraviť avšak miera expresie ETHR-A nie je dostatočná pre uskutočnenie ďalších *in vivo* analýz.



Obr. 2 Produkcia cGMP v CNS farátnej larvy (A – C) a farátnej kukly (A' – C') priadky morušovej. Imunohistochemická detekcia cGMP (zelená). (A) Kolokalizácia cGMP farbenia v IN–704 v SEG s protilátkou proti MIP (šípky, žltá). (B) cGMP farbenie v TG1. (C) Kolokalizácia cGMP s BMS vo VMN v TAG (oranžová). (A') Kolokalizácia cGMP s protilátkou proti MIP v IN–704 v SEG farátnej kukly (šípky, žltá). (B') Kolokalizácia cGMP s protilátkou proti MIP v IN–704 v AG4. Neidentifikované neuróny farbené cGMP protilátkou v AG4 (šípky). (C') Dvojité imunohistochemické farbenie s protilátkami proti cGMP a MIP v TAG. L1 bunky: zelené; IN–704: červené.



Obr. 3 Detekcia expresie EGFP v bunkách CNS lariev priadky morušovej infikovaných rekombinantným bakulovírusom Burs β – EGFP. Podhltanové ganglion (SEG) farbené s protilátkou proti CCAP (červená, slabá reakcia). Expresia EGFP v jednom páre L1/IN-704 v TG1 aTG3. AG6 farbené protilátkou proti CCAP (červená) a jeho kolokalizácia s EGFP v bunkách IN–704 (oranžová, šípky) EGFP je v sieti L1/IN-704 exprimované nešpecificky. Imunohistochemické farbenie TAG s protilátkou proti CCAP (červená) a jeho kolokalizácia s EGFP v bunkách IN–704 (oranžová, šípky). V zadnej časti TAG vidno slabú expresiu EGFP vo VMN.

Záver

Allatostatín CC a burzikón sú neuropeptidy produkované u priadky morušovej v sieti L₁/IN-704, ktorej aktivácia je charakteristická zvýšením hladín cGMP v úvodných fázach ekdýzie. Na funkčnú analýzu týchto neuropeptidov sme identifikovali ich promótori a pripravili stabilnú transgénnu líniu s astCC promótorom. Táto línia však nie je dostatočná na identifikáciu funkcie, preto je potrebné pripraviť ďalšie línie a funkčné analýzy.

Pod'akovanie

Práca bola podporená grantmi NIH USA GM67310, APVV 51039105 a VEGA 2/0132/09. Pod'akovanie patrí aj Ing. Ladislavovi Rollerovi PhD. z Ústavu Zoológie SAV za cenné rady a pomoc pri príprave cDNA prób.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Riddiford L. M., Hewes R. S., Truman J. W., (1994) *Journal of Neurobiology*. 25, p. 819
- [2] Žitňan D., Ross L. S., Žitňanová I., et al. (1999) *Neuron*. 23, p. 523
- [3] Kim Y. J., Žitňan D., Cho K. H., et al. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103, p. 14211
- [4] Žitňan D., Adams M. E. (2000) *J. Exp. Biol.* 203, p. 1329
- [5] Žitňan D., Hollar L., Spálovská I., et al. (2002) *J. Exp. Biol.* 205, p. 3459
- [6] Ewer J., Truman J. W. (1996) *J. Comp. Neurol.* 370, p. 330
- [7] Dai L., Dewey E. M., Žitňan D., et al. (2008) *J. Comp. Neurol.* 506, p. 759
- [8] Veenstra J. A. (2009) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, p. 161
- [9] Daubnerová I., Roller L., Žitňan D. (2009) *Gen Comp Endocrinol.* 162, p. 36
- [10] Žitňan D., Kim Y. J., Žitňanova I., et al. (2007) *Gen. Comp. Endocrinol.* 153, p. 88

Matematický model interakcie bakteriofág-baktéria

Gábor Beke^{1,2}, Lubos Klucar², Matej Stano²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika; bekegabor@post.sk

²Ústav molekulárnej biológie SAV, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovenská republika

Abstrakt

Bacteriophages, viruses which infect bacteria, can be successfully used in treatment of bacterial infections and eliminating of undesirable bacterial population in food and bio-fermentation. We have prepared modified version of mathematical model, which can simulate dynamics of interaction between phage and its bacterial host under specific growth conditions. The model includes experimentally obtained variables of bacterial growth on glucose, efficiency of phage infection, temperature and pH. In future, we will employ this model in assessment of required phage dose in devitalisation of food pathogens.

Kľúčové slová: simulácia, matematický model, bakteriofágy

Úvod a formulácia cieľa

Bakteriofágy (alebo len fágy), tiež nazývané bakteriálne vírusy, sú vírusy prokaryotov. Bakteriofágy sú všadeprítomné a sú jedným z najhustejšie zastúpených biologických entít v prírode. Prvýkrát ich nezávisle popísali Twort (1915) a d'Herelle (1917). Na základe ich životného cyklu môžeme bakteriofágy zaradiť do dvoch skupín – lytické (virulentné) a lyzogénne (temperované). Výsledkom lytického životného cyklu je lýza bakteriálnej bunky a následné uvoľnenie nových fágov do prostredia. V lyzogénnom životnom cykle sa genóm bakteriofága integruje do genómu hostiteľa. Bakteriofág a jeho hostiteľská bunka vstupujú do symbiotického vzťahu, v ktorom sa hostiteľská bunka ďalej delí a prenáša zo sebou aj fágový genóm cez nedefinovaný počet bunkových línií [1].

Narastajúci výskyt baktérií rezistentných voči antibiotikám zdôraznil potrebu alternatívnych stratégií v boji proti patogénnym baktériám. V dôsledku toho sa v posledných dvadsiatich rokoch väčšina fágových výskumov zamerala na využitie fágov pri eliminácii nežiaducich baktérií. Keďže zatiaľ neboli potvrdené žiadne nežiaduce účinky, fágy majú perspektívu stať sa ideálnym nástrojom v boji proti patogénnym baktériám v potravinách [2]. Interakcia medzi fágom a baktériou je parazitická [3]. Keďže replikácia bakteriofága vyžaduje smrť bakteriálnej bunky, môžeme túto interakciu nazývať aj predáciou. V prípade temperovaných fágov môžeme hovoriť o mutualizme [4].

Kvantitatívne aspekty interakcie fága s hosťiteľom sú popísané v rôznych štúdiách. Väčšina týchto modelov bola vyvinutá v rámci štúdií, ktoré sa týkali potenciálnych terapeutických využití proti baktériám rezistentným na antibiotiká [5], prípadne štúdií, ktoré skúmali infekciu *E. coli* a jej špecifické fágy [6, 7]. Niektoré štúdie sa na modelovanie interakcie fága a hosťiteľa v moriach zamerali z ekologického hľadiska [8, 9]. Modely pre ekologické štúdie sú zložitejšie a zahŕňajú aj miestnu heterogenitu. Modely môžeme klasifikovať podľa rôznych vlastností do dvoch skupín.

Podľa časového oneskorenia:

- modely, ktoré pozostávajú zo sústavy plynulých obyčajných diferenciálnych rovníc [10],
- modely, ktoré popisujú dynamiku s oneskorenými diferenciálnymi rovnicami [6, 8, 11]. Infikované bunky lyzujú len po latentnej perióde, fágové častice vznikajú z infikovaného hosťiteľa po časovom posune.

Podľa východiskového modelu bakteriálneho rastu:

- modely, ktoré vychádzajú z Verhulstovho (Logistického) modelu [12]:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \left[1 - \frac{dN}{N_{asymp}} \right] \quad \text{[I.]}$$

- modely, ktoré vychádzajú z Monodovho modelu [12]:

$$\frac{dR}{dt} = -\mu_{\max} \varepsilon N \frac{R}{K + R} \quad \text{[II.]}$$

$$\frac{dN}{dt} = \mu_{\max} N \frac{R}{K + R} \quad \text{[III.]}$$

Jednotlivé parametre sú definované v Tab. 1.

Naším cieľom bolo vytvoriť matematický model kombinovaním už existujúcich modelov, ktorý by presnejšie popísal interakciu bakteriofága s baktériou. Takýto model chceme v budúcnosti použiť pre modelovanie eliminácie patogénnych baktérií v potravinách.

Materiál a metódy

Pre simuláciu diferenciálnych rovníc s časovým posunom sme použili Berkeley Madonna software (<http://www.berkeleymadonna.com/>), ktorý slúži na veľmi rýchle riešenie a analýzu diferenciálnych rovníc. Použili sme verziu je 8.3.18 na pracovnej stanici s operačným systémom Windows XP.

Výsledky a diskusia

Pri našej práci sme vychádzali z Levinovho modelu z roku 1977, upraveného autormi Bohannan a Lenski [13]. Tento model popisuje rast bakteriálnej kultúry v regulovanom kultivačnom zariadení – chemostate. Pozostáva zo štyroch diferenciálnych rovníc. Rovnica dR popisuje aktuálnu koncentráciu glukózy v danom čase v systéme, dN popisuje aktuálnu hustotu bakteriálnej populácie a dM popisuje hustotu infikovaných baktérií, ktoré vznikli z baktérií. Do modelu bolo potrebné zahrnúť aj populáciu infikovaných baktérií, pretože aj infikované baktérie konzumujú glukózu (primárny zdroj energie), pričom nastáva kompetícia medzi populáciou baktérií a populáciou infikovaných baktérií o zdroj energie. Bakteriofágy sa viažu na povrch infikovaných baktérií a s tým sa znižuje počet voľných fágov v systéme. dP popisuje hustotu bakteriofágov – „predátorov“ baktérií.

Tab. 1 Definície parametrov.

Symbol	Definícia
R	koncentrácia glukózy v chemostate
N	hustota baktérií
M	hustota infikovaných baktérií
P	hustota bakteriofágov
R_0	koncentrácia glukózy v zásobníku
ω	miera prítoku a odtoku
ε	účinnosť rastu
μ	špecifická rastová hodnota
μ_{\max}	maximálna špecifická rastová hodnota
N_{asyp}	nosná kapacita systému
K	koncentrácia glukózy, pri ktorej je rast polovičný – Monodova konštanta
δ	adsorpčná hodnota bakteriofágov
β	počet vzniknutých fágov z jednej baktérie
τ	latentná perióda
$e^{-\omega\tau}$	časť baktérií, ktoré sú odmyté ešte pred lýzou
$N(t-\tau)$	hustota baktérií v čase $t - \tau$

$$\frac{dR}{dt} = (R - R_0)\omega - \frac{\varepsilon\mu_{\max}(N+M)R}{K+R} \quad \text{[IV.]}$$

$$\frac{dN}{dt} = \frac{\mu_{\max}NR}{K+R} - \delta NP - \omega N \quad \text{[V.]}$$

$$\frac{dM}{dt} = \delta NP - \delta N(t-\tau)P(t-\tau)e^{-\omega\tau} - \omega M \quad \text{[VI.]}$$

$$\frac{dP}{dt} = \beta\delta N(t-\tau)P(t-\tau)e^{-\omega\tau} - \delta NP - \omega M - dP \quad \text{[VII.]}$$

Parametre sú definované v Tab. 1.

Hodnoty potrebné pre simulácie boli získané z publikácií a boli stanovené pre bakteriofág T2 a hostiteľa *Escherichia coli* [13]. Hodnoty sú uvedené v Tab. 2. Ostatné neuvedené hodnoty predstavovali premenné simulácie.

Tab. 2 Hodnoty potrebné pre simulácie interakcie bakteriofág T2 a hostiteľa *E. coli*.

Symbol	Hodnota
R_0	0,1 – 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
ω	0,1 – 0,5 h^{-1}
ε	2 x μg
μ_{\max}	0,7726 h^{-1}
K	0,0727 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
δ	2 x 10^{-7} ml
β	98
τ	0,5 h
d	0,0 – 0,5

Do modelu sme zahrnuli aj teplotu a pH ako parametre, ktoré vplyvajú na rast baktérií. μ_{\max} je definované ako funkcia optimálnej rastovej hodnoty, teploty a pH [14].

$$\mu_{\max} = \mu_{\text{opt}} \cdot \tau(T) \cdot \rho(\text{pH}) \quad \text{[VIII.]}$$

$$\tau(T) = \frac{(T - T_{\max})(T - T_{\min})^2}{(T_{\text{opt}} - T_{\min})[(T_{\text{opt}} - T_{\min})(T - T_{\text{opt}}) - (T_{\text{opt}} - T_{\max})]} \quad \text{[IX.]}$$

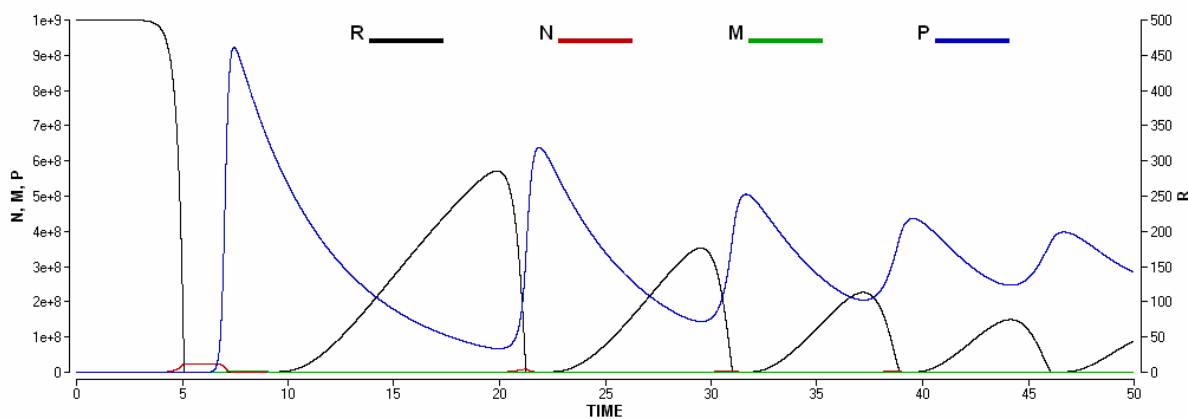
$$\rho(\text{pH}) = \frac{(\text{pH} - \text{pH}_{\min})(\text{pH} - \text{pH}_{\max})}{(\text{pH} - \text{pH}_{\min})(\text{pH} - \text{pH}_{\max}) - (\text{pH} - \text{pH}_{\text{opt}})^2} \quad \text{[X.]}$$

Parametre a dáta, ktoré sme použili pre simulácie pre *E. coli* O157:H7 boli stanovené experimentálne [14] a sú uvedené v Tab. 3.

Tab. 3 Definícia rastových parametrov teploty a pH pre *E. coli* O157:H7.

Symbol	Definícia	Hodnota
T	aktuálna teplota	premenná hodnota
T _{min}	minimálna teplota	3,06 °C
T _{opt}	optimálna teplota rastu	41,10 °C
T _{max}	maximálna teplota rastu	45,06 °C
pH	aktuálna pH	premenná hodnota
pH _{min}	minimálne pH rastu baktérií	3,88
pH _{opt}	optimálne pH rastu	7,2
pH _{max}	maximálne pH rastu	12,17
μ _{opt}	optimálna rastová hodnota	2,635 h ⁻¹

Výsledok simulácie je zobrazený na Obr. 1. Graf znázorňuje osciláciu populácie baktérii a fágov v dynamickom systéme, ktorý je ovplyvňovaný prítokom zdroja energie (glukóza) a odtokom časti populácie baktérií a fágov.



Obr. 1. Simulácia modelu podľa [IV. – VII.] s maximálnou špecifickou rastovou hodnotou, ktorá bola definovaná v [VIII.]. Iniciačné hodnoty pre simulácie boli: $R[0] = 0,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, $N[0] = 1 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$, $M[0] = 0 \text{ cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$, $P[0] = 1 \times 10^8 \text{ pfu} \cdot \text{ml}^{-1}$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6,0$. Ostatné hodnoty sú uvedené v Tab. 2 a Tab. 3.

Záver

Do známeho modelu interakcie bakteriofág-baktéria sme integrovali maximálnu špecifickú rastovú hodnotu, ktorá je funkciou teploty a pH. Model sme graficky znázornili pomocou vizualizačného programu, ktorý zobrazuje simulácie priamo závislé od vstupných

údajov. Tento model by sme v budúcnosti chceli experimentálne overiť na kultúrach baktérií a fágov popísaných na našom pracovisku.

Pod'akovanie

Práca bola finančne podporená grantom APVV-0098-10.

Použitá literatúra

- [1] Mahy, B. W. J., van Regenmortel, M. H.V. (2010) Desk Encyclopedia of general virology, Academic Press, Waltham, Massachusetts, USA, p. 3
- [2] Mahony J, McAuliffe O, Ross RP, van Sinderen D. (2011) Curr. Opin. Biotechnol. 22/(2) ,p. 157
- [3] Bull, A. T. and Slater, J. H. (1982) Microbial interactions and community structure, in: A. T. Bull and J. H. Slater, (eds.) Microbial Interactions and Communities, Volume I , Academic Press, London, p. 13
- [4] Lenski R. E. (1985) Dynamics of interactions between bacteria and virulent bacteriophage in: K. C. Marshall (ed.) Advances in Microbial Ecology, Volume 10, Plenum Publishin Corporation, p. 1
- [5] Kasman, M. L., Kasman, A., Westwater, C., Dolan, J., Schimidt, G. M., and Norris, J.S. (2002) J. Viro. 76(11), p. 5557
- [6] Levin, B. R., F. M. Stewart, and L. Chao. (1977) Am. Nat. 111(977), p. 3
- [7] Rabinovitch, A., Fishov, I., Hadas, H., Einav, M., and Zaritsky, A., (2002) J. Theor. Biol. 216(1), p. 1
- [8] Beretta, E., and Kuang, Y. (2001) Nonlinear Anal. Real World Appl. 2, p. 35.
- [9] Middleboe, M. (2000) Microb. Ecol. 40, p. 114
- [10] Beretta, E., and Kuang, Y. (1998) Math. Biosci. 149, p. 57
- [11] Lenski, R. E., and Levin, B. R. (1985) Am. Nat. 125, p. 585
- [12] Peleg, M., and Corradini, M. G. (2011) Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 51(10), p. 917
- [13] Bohannan, B. J., Lenski, R. E. (2000), Am. Nat. 156(4), p. 329
- [14] Rosso, L., Lobry, J. R., Bajard, S., Flandrois, J. P. (1995) Appl. Environ. Microbiol. 1995, 61(2), p. 610

Optimalizácia procesu transformácie a regenerácie transgénnych rastlín z listových explantátov *Drosera rotundifolia* L.

Eva Bíliková, Alžbeta Blehová, Renáta Švubová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyziológie rastlín,
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko; ebbilikova@gmail.com

Abstrakt

Browning and necrosis of transformed cells/tissues, and difficulty to regenerate transgenic plants from the transformed cells/tissues (recalcitrance) are common in *Agrobacterium*-mediated transformation process in many plant species. In addition, most crop transformation methods that use NPTII selection produce a significant number of nontransgenic shoots, called “shoot escapes” even under stringent selection conditions. The main aim of this study was to establish a suitable method for the efficient stable transformation of *Drosera rotundifolia* leaf explants by the adaptation and optimisation of previously reported protocols. Since the regeneration of chimeric or non-transgenic regenerants remains the problem accompanied with *Drosera* transformation. In this study, stability of *Drosera* transformation by *A. rhizogenes* versus *A. tumefaciens* was tested by using combined selection for antibiotic resistance and visual selection of green fluorescent protein (GFP).

Kľúčové slová: *Drosera rotundifolia*; *Agrobacterium*; rekalcitrancia; nekróza, chiméry; GFP.

Úvod a formulácia cieľa

Rosička okrúhlohlístá, ale aj ostatné druhy rodu *Drosera*, sú okrem mäsožravosti, zaujímavé aj produkciou sekundárnych metabolitov, ktoré sa využívajú v modernej fytoterapii a biomasa získaná z rastlín pestovaných *in vitro* sa používa na prípravu fytofarmaceutík [1]. Mäsožravé rastliny sa používajú v tradičnom liečiteľstve predovšetkým v Číne a Južnej Amerike, kde sa uplatňujú pri liečbe nádorových a parazitárnych ochorení [2]. Zo sekundárnych metabolitov, ktoré sú zodpovedné za ich liečivé účinky, sú najznámejšie naftochinóny (plumbagín a 7-metyljuglón) a flavonoidy (kaempferol a quercetín) [3]. V jednotlivých zástupcoch čeľade Droseraceae bola potvrdená prítomnosť predovšetkým jednoduchých 1,4-naftochinónov, ako napr. juglón, lapachol, lawson, menadión a plumbagín [4]. Práve týmto naftochinómom sa pripisujú cytotoxické účinky a je známe, že v podmienkach *in vitro* indukujú bunkovú smrť v prípade viacerých línií nádorových buniek napr. HEPA-3B (hepatom), KB (nazofaryngeálny karcinóm), HeLa (cervikálny epiteliálny karcinóm), HPC (ľudský karcinóm prostaty) [5, 6, 7]. Napriek viacerým problémom ako je rekalcitrancia [8], nekróza [9] alebo apoptóza [10] transgénnych buniek ale i regenerácia netransgénnych resp. chimerických výhonkov [11, 12], ostáva prenos cudzorodých génov pomocou baktérií stále najpoužívanejšou technikou. Efektivita tejto techniky transformácie úzko súvisí so schopnosťou transgénnych buniek realizovať svoj morfogénny potenciál. Napriek viacerým stratégiám ostáva tento krok produkcie transgénnych rastlín stále

problematický, pretože ani vysoké koncentrácie selekčného antibiotika neeliminujú regeneráciu veľkého množstva chimérických alebo netransgénnych rastlín [13]. Jednou z najväznejších príčin, prečo nie sú transgénne bunky schopné regenerácie je ich nekróza. Deng a kol. [14] na bakteriálnej T- DNA dokázali prítomnosť dvoch génov (*aviR*, *luxR*), expresia ktorých môže v konečnom dôsledku indukovať smrť rastlinných buniek. Keďže mŕtve transgénne bunky nie sú schopné realizovať svoj morfogénny potenciál, často aj na médiách s prídavkom selekčných látok, dochádza prednostne k regenerácii netransgénnych buniek a produkcii tzv. „escapov“. Existuje viacero hypotéz, ktoré sa snažia vysvetliť tento fenomén. Podľa viacerých autorov [15, 16, 17] sú netransgénne bunky v morfogénnych meristémoch obklopené transgénnymi a tie im tvoria prirodzenú ochranu pred selekčným antibiotikom. Regenerácia „escapov“ môže byť podľa Park a kol. [18] aj dôsledkom dočasnej expresie génov rezistencie a Birch [19] vysvetľuje neefektívnu selekciu transgénnych buniek dlhodobou perzistenciou *A. tumefaciens* v medzibunkových priestoroch hostiteľskej rastliny. Regeneráciu chimérických rastlín je možné vysvetliť aj skutočnosťou, že meristemoidy ktoré vznikajú *de novo* sú zvyčajne mnohobunkového pôvodu [15, 17]. Transformácia rastlín pomocou *A. rhizogenes* je jednou z techník o ktorých sa predovšetkým v ostatných rokoch veľa diskutuje v súvislosti so zvýšenou produkciou sekundárnych metabolitov [20]. V literatúre však existuje len veľmi málo údajov o úspešnej transformácii mäsožravých rastlín rodu *Drosera* [21, 22].

Cieľom predkladanej práce bolo optimalizovať techniku transformácie listových explantátov rosičky okrúhloľistej tak, aby sa potlačili procesy nekrózy. Na selekciu transgénnych rastlín sme okrem antibiotík využili aj markerový *gfp* gén, ktorý je zodpovedný za syntézu GFP (Green Fluorescent Protein), najväčšou výhodou ktorého je ľahká vizualizácia jeho fluorescence v živých bunkách a pletivách [23].

Materiál a metódy

Materské rastliny rosičky okrúhloľistej (*Drosera rotundifolia* L.) boli kultivované v podmienkach *in vitro* na agarom spevnenom MS médiu (fotoperiódou dlhého dňa, intenzita difúzneho osvetlenia $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, teplota $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). Na transformáciu sme použili izolované listové explantáty rosičky, ktoré sme poranili pomocou sterilnej ihly. Poranené listy sme 15 min. infikovali v suspenznej kultúre *A. tumefaciens*, kmeň LBA4404 s *gfp*-ABD2 [24] alebo *A. rhizogenes* kmeň Arqual [25] s binárnym vektorom pBIN-m-*gfp*-ER [26]. Génová kazeta v oboch prípadoch okrem markerového *gfp* génu obsahovala aj selekčný *nptII* gén. Baktériou infikované listy sme 48 hod. kokultivovali na bezhormónovom agarom spevnenom

½ MS médiu, bez prídavku antibiotík. Pred prenosom na regeneračné SIM médium (½ MS s 0,01 mg.l⁻¹ NAA a 2 mg.l⁻¹ BAP) ale aj s prídavkom antibiotík cefotaxímu a kanamycínu (500 mg.l⁻¹), sme listy opláchli v tekutom MS médiu, ktoré obsahovalo 200 mg.l⁻¹ cefotaxímu. Keďže je známe, že predovšetkým počas prvých dvoch týždňov kultivácie na SIM médiu dochádza k výraznej nekróze listov, sme v tejto časti experimentov testovali niekoľko regeneračných postupov. Časť baktériou infikovaných listov sme 2 týždne kultivovali na svetle (fotoperiódá dlhého dňa, intenzita difúzneho osvetlenia 120 μmol.m⁻².s⁻¹, teplota 23 ± 2 °C). Druhú časť listov sme kultivovali za tých istých fyzikálnych podmienok, ale do regeneračného SIM média (½ MS s 0,01 mg.l⁻¹ NAA a 0,05 mg.l⁻¹ BAP) sme aplikovali glutatión (100 mg.l⁻¹). Tretia časť listov bola kultivovaná na SIM médiu bez antioxidantu a v tme pri teplote 23 ± 2 °C. Po dvoch týždňoch boli všetky explantáty v pravidelných 2 týždňových intervaloch prenášané na čerstvé SIM médium (½ MS s prídavkom 0,01 mg.l⁻¹ NAA, 2 mg.l⁻¹ BAP s prídavkom antibiotík cefotaxímu a kanamycínu (500mg.l⁻¹) a kultivované pri rovnakých fyzikálnych podmienkach (fotoperiódá dlhého dňa, intenzita difúzneho osvetlenia 120 μmol.m⁻².s⁻¹, teplota 23 ± 2 °C).

Na vizuálnu selekciu transgénnych buniek ale aj regenerovaných výhonkov sme použili fluorescenčný mikroskop (Axioskop 2 plus, Carl Zeiss, filtrová sada 16 a 25).

Stabilnú integráciu nami použitých transgénov v GFP pozitívnych regenerantoch sme potvrdili pomocou PCR analýz. DNA bola izolovaná pomocou DNazol (Invitrogen). S použitím špecifických primerov (F:5'TTGGGATCTTTCGAAAGGGC 3', R: 5' ACCCAGATCATATGAAGCGG 3') sa amplifikovalo 415 bp *gfp* génu. Program cyklera: počiatková denaturácia - 94 °C, 5 min (1x), denaturácia - 94 °C, 1 min (35x), anelácia primerov - 54 °C, 1 min (35x), elongácia - 72 °C, 1 min (35x), konečná elongácia - 72 °C, 7 min (1x), 4°C ∞. Produkty PCR boli elektroforeticky separované na 1,2 % agarózovom géli s prídavkom etídium bromidu.

Výsledky a diskusia

Efektivita jednotlivých transformačných protokolov úzko súvisí so schopnosťou transgénnych buniek realizovať svoj morfogénny potenciál. Jednou z príčin, prečo nie sú transgénne bunky schopné regenerácie, je ich hnednutie a nekróza. Súčasne štúdie potvrdzujú, že indikátormi hnednutia a nekrózy pletív sú reaktívne formy kyslíka (ROS) [10]. Hirsikorpi a kol. [21] zaznamenali iba mierne červenanie listov rosičky v prípade ich kultivácie na ½ MS s prídavkom 0,01 mg.l⁻¹ NAA a 2 mg.l⁻¹ BAP a antibiotík cefotaxímu (200 mg.l⁻¹) a kanamycínu (400 mg.l⁻¹). V našich experimentoch sme pri použití toho istého

transformačného protokolu zaznamenali až 100% nekrózu listov. Prídavok antioxidantu glutatiónu čiastočne eliminuje tento problém a z celkového počtu baktériou infikovaných listov nám úplne znekrótizovalo približne 85 %. Tento výsledok je v súlade so skôr publikovanými výsledkami [13]. Najlepšie výsledky nekrózu len 10 % infikovaných listov rosičky sme dosiahli v prípade keď boli tieto počas prvých dvoch týždňov kultivované na SIM médiu a v tme. Vizuálne sme GFP fluorescenciu v okolí miesta vpichu, ale aj na listových stopkách predovšetkým v miestach kde došlo k ich poraneniu, zaznamenali medzi 10 až 14. dňom od infekcie. Silný fluorescenčný signál sme pozorovali aj v stopkách a hlavičkách tentákul. Aj v prípade keď do regeneračného média boli aplikované vysoké koncentrácie cefotaxímu (500 mg.l^{-1}) *A. tumefaciens* ale aj *A. rhizogenes* dlhodobo prežívajú v medzibunkových priestoroch listov rosičky, ale k šíreniu infekcie nedochádza. Viaceré sekundárne metabolity, ktoré syntetizujú mäsožravé rastliny rodu *Drosera* sa vyznačujú výraznými antibakteriálnymi účinkami, a podľa Królicka a kol. [22] tieto s veľkou pravdepodobnosťou výrazne limitujú efektivitu procesu transformácie.

Regeneráciu kompletných rastlín sme zaznamenali po 42 dňoch kultivácie na SIM médiu. Z výsledkov PCR analýz vyplýva, že v prípade transformácie listov rosičky pomocou *A. tumefaciens* kmeň LBA4404, je približne 13 % regenerantov stabilne transgénnych. Podstatne vyššiu, až 17% efektivitu transformácie uvádzajú Hirsikorpi a kol. [21]. Nižšiu, len 9% efektivitu transformácie sme dosiahli v prípade, keď listové explantáty *D. rotundifolia* boli transformované pomocou *A. rhizogenes* kmeň Arqua1, pričom v mnohých prípadoch sme pozorovali zmeny v morfológii často albinických listov. Len o niečo vyššiu efektivitu transformácie (10 %) uvádzajú Królicka a kol. [13] pri transformácii listov a stopiek *D. capensis* var. *alba* pomocou *A. rhizogenes*. Uvedení autori nepozorovali žiadne zmeny v morfogéneze transgénnych rastlín. Prítomnosť *rolB* a *rolC* génov sa prejavila zvýšenou syntézou ramentaceónu.

Jednou z najčastejších stratégií pri eliminácii regenerácie „escapov“ je aplikácia vyššej koncentrácie selekčného činidla [20]. Z výsledkov našich experimentov jednoznačne vyplýva, že ani zvýšená koncentrácia antibiotík v regeneračných (SIM) médiách nerieši problém regenerácie chimérických alebo netransgénnych výhonkov, pravdepodobne preto, že rosička podobne ako iné rastlinné druhy napríklad ľan [15] alebo citrusy [16] sa vyznačuje nešpecifickou toleranciou voči antibiotikám. Problémy spojené s regeneráciou netransgénnych výhonkov a chimérických rastlín v prípade citrusov [27] riešili použitím markerového *gfp* génu. Detailná analýza fluorescencie GFP proteínu potvrdila, že väčšina regenerantov sú chiméry, ktorých bazálna časť je GFP negatívna, a listy sú GFP pozitívne.

Regeneráciu chimérických rastlín, ktoré sú tvorené z transgénnych aj netransgénnych buniek, je možné vysvetliť skutočnosťou, že meristemoidy sú zvyčajne mnohobunkového pôvodu a základom pre ich formovanie sú epidermálne ale aj subepidermálne bunky listov *D. rotundifolia* L. [28]. Aj v prípade marhuľe [17] a ľanu [29] boli vypracované efektívne transformačné protokoly, ktoré viedli k proliferácii veľkého množstva GFP pozitívneho kalusu, ale regenerácia transgénnych výhonkov nebola zaznamenaná. V transgénnych kalusových bunkách ľanu detegovali [29] nízke hladiny endogénnej IAA a *cis* a *trans* zeatínu, ktoré sú podľa uvedených autorov nedostatočné pre aktiváciu expície génov zodpovedných za diferenciáciu stonkových výhonkov.

Záver

Táto práca bola zameraná na optimalizovanie techniky transformácie listov rosičky s cieľom eliminovať ich nekrózu. Modifikácia fyzikálnych podmienok v prvých fázach kultivácie na regeneračnom (SIM) médiu mala výraznejší efekt na potlačenie tohto fenoménu, ako aplikácia glutatiónu. PCR analýzy potvrdili, že oba použité kmene baktérií je možné použiť na transformáciu listov rosičky, ale ani vysoké koncentrácie kanamycínu (500mg.l^{-1}) neriešia problém regenerácie netransgénnych alebo chimérických rastlín, čím sa výrazne znižuje možnosť ich využitia v praxi na produkciu sekundárnych metabolitov.

PodĎakovanie

Táto práca je súčasťou grantového projektu Vega 1/0502/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Turcus V., Cachita-Cosma D., Craciun C. (2008) *Studia Universitatis Vasile Goldis Arad, Seria Stiintele Vietii* 18, p. 107
- [2] Babula P., Adam V., Havel L., et al. (2009) *Current Pharmaceutical Analysis* 5, p. 47
- [3] Banasiuk R., Kawiak A., Królicka A. (2012) *BioTechnologia* 93 (2), p. 87
- [4] Babula P., Mikelova R., Adam V., et al. (2006) *Česká a Slovenská Farmacie* 55, p. 151
- [5] Takashi S., Satoh T., Kusaka N., et al. (2004) *Cancer Gene Therapy* 11, p. 317
- [6] Chakrabarty S., Roy M., Hazra B., et al. (2002) *Cancer Letters* 188 (1-2), p. 85
- [7] Higa R.A., Aydos R.D., Silva I.S., et al. (2011) *Acta Cirúrgica Brasileira* 26 (2), p. 125
- [8] Pietropaolo J., Pietropaolo P. (1986) *Carnivorous Plants of the World*. Portland, Timber Press, p. 206
- [9] Franklin G., Conceicao L.F., Kombrink E., et al. (2008) *Planta* 227, p. 1401

- [10] Dan Y. (2008) *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 44, p. 149
- [11] Khanna H.K., Paul J.Y., Harding R.M., et al. (2007) *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8, p. 1048
- [12] Milliam S., Obert B., Preťová A. (2005) *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 82, p. 93
- [13] Blehová A., Balážová R., Matušíková I. (2010) 12. konference experimentální Biologie rostlin a 8. konference doktorandů experimentální biologie rostlin 2010, Sborník abstraktů, Praha, p. 67
- [14] Deng D., McGrath P.F., Robinson D.J., et al. (1994) *Ann. Appl. Biol.* 125, p. 327
- [15] Jordan M.C., McHughen A. (1988) *Plant Cell Rep.* 7, p. 281
- [16] Domínguez A., Cervera M., Pérez R.M., et al. (2004) *Molecular Breeding* 14, p. 171
- [17] Petri C., Webb K., Hily J.M., et al. (2008) *Molecular Breeding* 22, p. 581
- [18] Park C.B., Miller R.D., Xia J. (1998) SEG, 68th Annual Meeting, New Orleans, Louisiana, p. 874
- [19] Birch R.G. (1997) *Annu. Rev. Plant Biol. Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, p. 297
- [20] Bulgakov V.P. (2008) *Biotechnol. Adv.* 26, p. 318
- [21] Hirsikorpi M., Kämäräinen T., Teeri T., et al. (2001) *Plant Science* 162, p. 537
- [22] Królicka A., Szpitter A., Krzystof S., et al. (2010) *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 103 (3), p. 285
- [23] Hraška M., Rakovský S., Čurn V. (2006) *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 86, p. 303
- [24] Voigt B., Timmers A.C.J., Šamaj J., et al. (2001) *Eur. J. Cell Biol.* 84, p. 595
- [25] Ooms G., Hooykaas P.J., Van Veen R.J., et al. (1982) *Plasmid* 7, p. 15
- [26] Boisson-Dernier A., Chabaud M., Garcia F., et al. (2001) *Mol. Plant – Microbe Interact.* 14, p. 695
- [27] Ghorbel R., Juárez L., Navarro L., et al. (1999) *Theor. Appl. Genet.* 99, p. 350
- [28] Bobák M., Blehová A., Krištín J., et al. (1995) *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 43, p. 43
- [29] Bleho J., Obert B., Takáč T., et al. (2012) *Protoplasma* 249 (1), p.53

Rozšírenie a variabilita spoločenstiev zväzu *Vaccinion myrtilli* na území Krivánskej Malej Fatry a Oravských Beskýd

Silvia Bittnerová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra Botaniky, Révová 39,
811 02 Bratislava, Slovensko, bittnerova.silvia(at)gmail.com

Abstrakt

This paper deals with the documentation and mapping of dwarf shrub communities. We have focused on the dominant species – *Vaccinium myrtillus* in Krivánska Malá Fatra Mts. and Oravské Beskydy Mts. The 99 phytosociological relevés were analysed. The distribution of the studied phytocenosis is being influenced by soil conditions and environmental factors like slope, aspect, altitude, vegetation belt. We monitored differences of vegetation structure and environmental factors.

Kľúčové slová: Ekologické vplyvy; ordinačné metódy; subalpínske vresoviská.

Úvod a formulácia cieľa

Územie Národného parku Malá Fatra je nesmierne členité, čo sa odráža tiež na vegetačnej skladbe pohoria. Súčasná podoba vegetácie sa začala formovať v štvrtohorách po poslednom zaľadnení. Výrazný vplyv na distribúciu a rozšírenie rastlinných spoločenstiev má taktiež antropogénna činnosť. Charakter vegetácie, ktorý môžeme v súčasnosti vidieť v Malej Fatre, je dôsledkom valašskej kolonizácie v 16. storočí. V tomto období kolonizátori z Rumunska odlesnením, vypaľovaním a kľčovaním kosodrevinových a kríčkovitých porastov výrazne znížili hornú hranicu lesa, za účelom vytvárania pasienkov.

Podobný vývoj vegetačného krytu môžeme pozorovať aj v oblasti Oravských Beskýd, kde však vplyv pastierstva nebol až taký veľký a spoločenstvá tu neboli tak silne ovplyvnené vplyvom človeka. V súčasnosti sa tu už nepasie a vegetácia je ohrozovaná len rozvíjajúcim sa turizmom a budovaním rekreačných stredísk.

Spoločenstvá zväzu *Vaccinion myrtilli* Krajina 1933, ktoré sú predmetom tejto štúdie, sa vyskytujú na území Malej Fatry rozšírené najmä sekundárne ako sukcesné štádium po opustení pastvy. Nízke kríčkové spoločenstvá s dominantným druhom *Vaccinium myrtillus* sú acidofilné až mezofilné spoločenstvá subalpínskeho vegetačného stupňa. Sú to chionofilné spoločenstvá, teda ich rozšírenie závisí tiež od distribúcie snehovej pokrývky v pohorí [1].

Cieľom predkladanej práce je zmapovať rozšírenie a variabilitu fytoocenóz zo zväzu *Vaccinion myrtilli* Krajina 1933 na území Krivánskej Malej Fatry a Oravských Beskýd. Po adekvátnom vyhodnotení dát spoločenstvá porovnať a vyhodnotiť diverzitu spoločenstiev na študovaných územiach.

Materiál a metódy

Fytocenologický výskum bol realizovaný v Krivánskej Malej Fatre na území Národného parku Malá Fatra. Z tohto územia bolo vyhodnocovaných 83 fytocenologických zápisov získaných v období rokov 2010 – 2012. Ďalších 16 fytocenologických zápisov, z územia pohoria Oravské Beskydy, bolo zaznamenaných vo vegetačnej sezóne roku 2012. Zápisy boli získavané metódami zürišsko-montpelliarskej školy [2]. Používali sme 7-člennú Braun-Blanquetovu stupnicu abundancie a dominancie rozšírenú u stupne 2a, 2b, 2m [3].

Zápisy boli uložené v databázovom programe TURBOVEG [4] a následne exportované do programu JUICE [5], kde boli dáta upravené na ďalšie potrebné analýzy. Pri numerickom vyhodnocovaní dát boli úplne vylúčené machorasty a lišajníky, pre ich nerovnomerné určenie v jednotlivých zápisoch.

Ordinácia bola robená pomocou balíka programov CANOCO 4.5 [6]. Na výpočet dĺžky gradientu, ktorý vypovedá o variabilite dát, bola použitá unimodálna analýza DCA (Detrended correspondence analysis). Následne bola použitá priama lineárna gradientová analýza RDA (Redundancy analysis) vhodná na vyhodnotenie homogénnych dát a environmentálnych premenných prostredia otestovaných Monte Carlo permutačným testom. Ako environmentálne premenné boli použité nadmorská výška (Altitude), pokryvnosť voľných skál na stanovišti (Co-bare rock), množstvo surového humusu (Co-litter), pokryvnosť machorastov a lišajníkov (Co-moss), oslnenie stanovišťa (Light), sklon svahu (Slope) a hodnota pH pôdy (Soil pH).

Jednotlivé taxóny boli určené priamo v teréne, prípadne dodatočne determinované podľa prác [7, 8]. Nomenklatúra jednotlivých taxónov bola zjednotená podľa Zoznamu nižších a vyšších rastlín Slovenska [9]. Syntaxonomické názvoslovie bolo zjednotené podľa práce [10].

Výsledky a diskusia

Vyhodnocovali sme 99 fytocenologických zápisov získaných v období rokov 2010 – 2012 na území Krivánskej Malej Fetry a Oravských Beskýd. Pri nepriamej ordinácii DCA bol vypočítaný dĺžkový gradient na prvej osi 2,930. Preto bola zvolená priama ordinačná metóda na ďalšiu analýzu dát. Pri vyhodnotení dát sme priamo do analýz zahrnuli environmentálne premenné. Použitá bola priama lineárna technika RDA, ktorá je vhodná na vyhodnocovanie homogénnych dát. O homogénnosti dát vypovedá aj celková variabilita spoločenstva (Total inertia) s hodnotou 6,282.

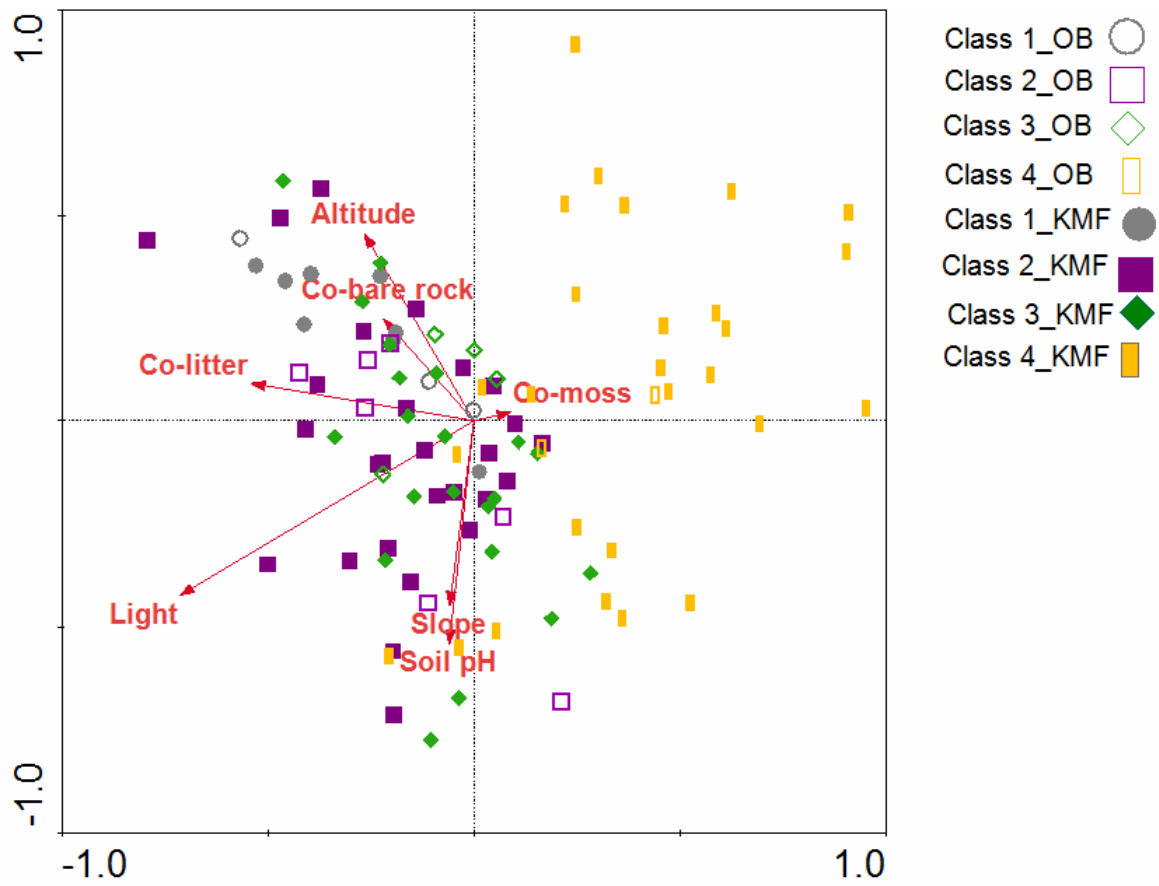
Na ordinačných grafoch (obr. 1, obr. 2) sú kvantitatívne premenné prostredia

vyjadrené šípkami v smere ich rastu. Významnosť týchto environmentálnych premenných priamoúmerne stúpa dĺžkou šípky.

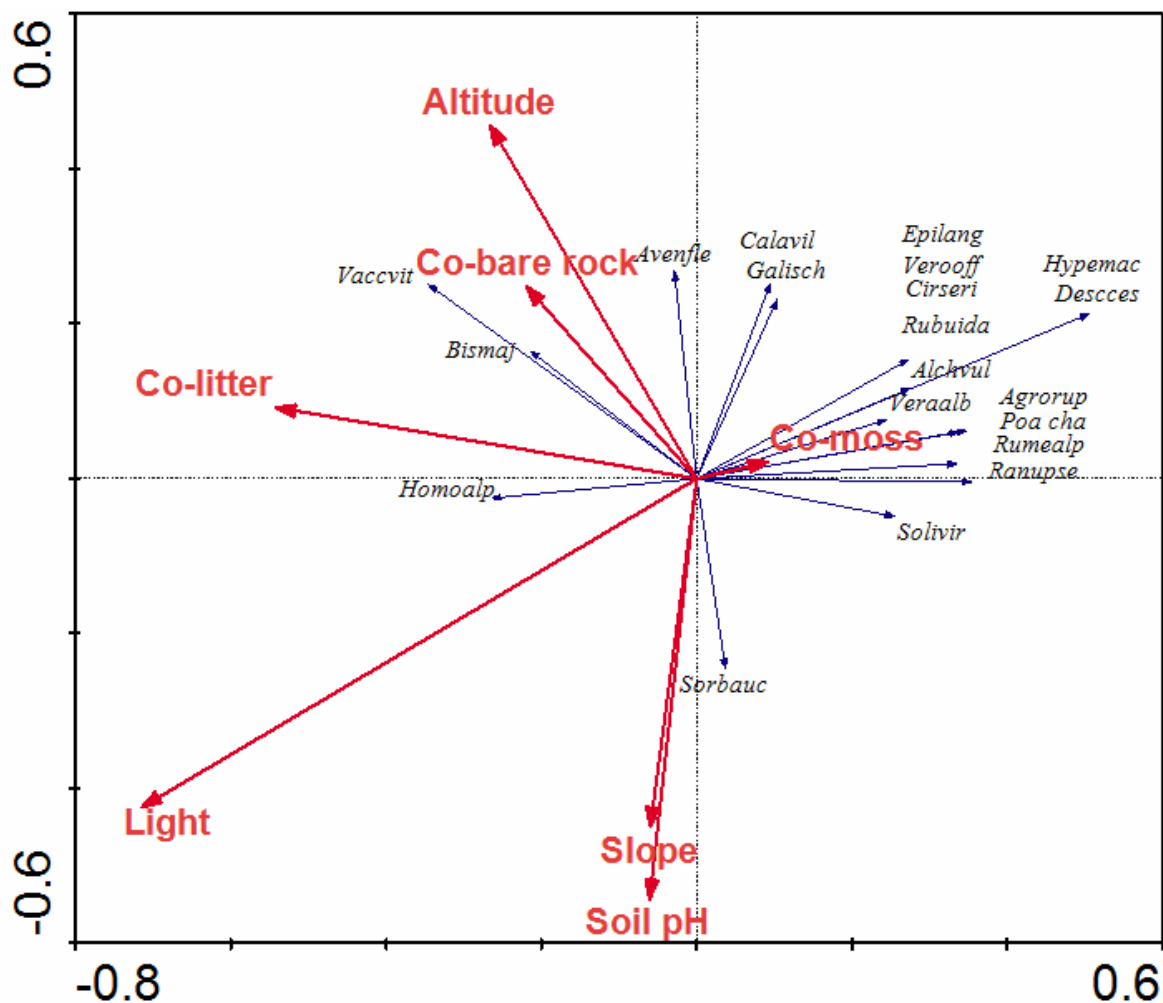
Najväčšiu výpovednú hodnotu má faktor oslnenia (Light). Z ordinačného grafu (obr. 1) je zrejmé, že spoločenstvá negatívne korelujúce s týmto faktorom sú hlavne porasty vyskytujúce sa ako ekotonové spoločenstvá na okraji lesov, prípadne spoločenstvá lesných čistín v supramontánnom vegetačnom stupni (skupina: Class 4). Približne pozitívne korelujúce spoločenstvá s faktorom nadmorskej výšky (Altitude) a oslnenia (skupina: Class 1) sú spoločenstvá subalpínskeho vegetačného pásma. Toto dokazuje tiež pozitívna korelácia druhov typických pre subalpínske pásmo, ako napríklad *Vaccinium vitis-idaea*, *Homogyne alpina*, *Bistorta major*, *Avenella flexuosa* (obr. 2). Naopak, v pravej časti grafu vidíme druhy charakteristické pre spoločenstvá, ktoré vznikli ako sukcesné štádium na rúbaniskách, bývalých pasienkoch a podobne. Príkladom môžu byť druhy *Deschampsia cespitosa*, *Hypericum maculatum*, *Rubus idaeus*, *Epilobium angustifolium*, *Poa chaxii*, *Rumex alpinus*, *Alchemilla vulgaris* agg.

Spoločenstvá zo skupín Class 2 a Class 3 sú typickými spoločenstvami zo zväzu *Vaccinion myrtilli*, preto je ich distribúcia v grafe viac-menej rovnomerná.

Faktor nadmorskej výšky a množstva rastlinného opadu (Co-litter) približne pozitívne korelujú. Zatiaľ čo pôdna reakcia (Soil pH) je v negatívnej korelácii s nadmorskou výškou. Toto poukazuje na to, že pH pôdy výrazne ovplyvňuje vrstva surového humusu a so zvyšujúcim sa percentom nerozloženého organického materiálu sa zvyšuje acidita.



Obr. 1 Ordinačný graf lineárnej RDA analýzy – závislosť environmentálnych premenných a zápisov (KMF = Krivánska Malá Fatra, OB = Oravské Beskydy)



Obr. 2 Ordinačný graf lineárnej RDA analýzy – závislosť environmentálnych premenných a druhového zloženia. Zobrazené sú druhy s váhou (species weight range) > 4 %. (názvy rastlín sú tvorené prvými štyrmi písmenami rodového mena a prvými tromi písmenami druhového mena)

Záver

Rozšírenie a variabilita spoločenstiev s dominantným druhom *Vaccinium myrtillus* závisí od mnohých faktorov. Spoločenstvá majú svoje optimum výskytu v subalpínskom vegetačnom pásme, no fragmentárne sa vyskytujú aj v montánnom a supramontánnom stupni. Fytocenózy sa vyskytujú na stanovištiach s kyslým geologickým substrátom, najmä na žule a kremenci. Môžu sa však vyskytovať aj na stanovištiach so zásaditým podkladom, kde sa vyvinuli ako sekundárne spoločenstvá, kedy opad a rozkladajúci sa surový humus okysľuje vrchnú časť pôdneho profilu.

Spoločenstvá zväzu *Vaccinion myrtilli* vyskytujúce sa na území Krivánskej Malej Fatry a Oravských Beskýd sú morfológicky veľmi podobné a ordinačné analýzy nepreukázali výrazné rozdiely medzi študovanými spoločenstvami napriek tomu, že Oravské Beskydy sú flyšové pohorie, zatiaľ čo spoločenstvá na území Malej Fatry sú rozšírené najmä na kremenci

a žule.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Šibík J., Kliment J., Jarolímek I., et al. (2007) Loiseleurio-Vaccinietea. In: Kliment J. & Valachovič M. (eds.) Rastlinné spoločenstvá Slovenska. 4. Vysokohorská vegetácia. VEDA, Bratislava, p. 283
- [2] Josias Braun-Blanquet (1964) Pflanzensoziologie. Grundzüge der Vegetationskunde. Springer Verlag, Wien, p. 865
- [3] Barkman J.J., Doing H., Segal S. (1964) Acta Bot. Neerl. 13, p. 394
- [4] Hennekens S.M., Schaminée J.H.J. (2001) J. Veg. Sci. 12, p. 589
- [5] Tichý L. (2002) J. Veg. Sci. 13, p. 451
- [6] TerBraak C.J.F., Šmilauer P. (2002) CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide. Software for canonical community ordination (version 4.5). Biometris, Wageningen & České Budějovice, p. 500
- [7] Dostál J., Červenka M. (1991) Veľký kľúč na určovanie rastlín. I. SNP, Bratislava, p. 61
- [8] Kubát K., Hrouda L., Chrtek J.j., et al. (2002) Kľúč ke květene České republiky. Academia, Praha, p. 48
- [9] Marhold K., Hindák F. (1998) Zoznam nižších a vyšších rastlín Slovenska. Veda, Bratislava, p. 687
- [10] Kliment J., Šibík J., Šibíková I., et al. (2010) Biologia. 656(2), p. 965

Agresívne správanie samcov línií prepelíc japonských selektovaných na vysoký a nízky obsah testosterónu v žĺtku

Daniela Blahutová¹, Michal Zeman^{1,2}, Monika Okuliarová¹

¹*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, danielablahutova@gmail.com*

²*Slovenská akadémia vied, Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Moyzesova 61, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovenská republika*

Abstrakt

Maternal androgens in the egg may significantly influence offspring. Effects of experimentally increased yolk androgens levels on competitive and aggressive behavior have been found in both young and adult birds, although the physiological mechanisms beyond these effects are not clear. In our experiment, we analyzed the effects of maternal testosterone on aggressive behavior of adult male Japanese quail by a comparison of two lines selected for high (HET) and low (LET) yolk testosterone levels. Effects of maternal testosterone on hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis were evaluated by a measurement of plasma testosterone concentrations. No differences in aggressive behavior were found between the LET and HET males, although LET quail tended to be more dominant in the mutual interactions with HET quail. Plasma testosterone concentrations did not differ between the LET and HET males indicating that selection for egg testosterone content did not influence basal biosynthesis of this androgen in males.

KLúčové slová: *agresívne správanie; maternálny testosterón; prepelica japonská.*

Úvod a formulácia cieľa

Matka prostredníctvom ukladania maternálnych hormónov do vajcového žĺtku môže ovplyvniť fenotyp svojho potomstva a prispôbiť ho tak na prevládajúce podmienky prostredia [1]. Maternálne účinky na jednotlivé typy správania jedinca môžu zohrať významnú úlohu pri jeho prežití počas rôznych stupňov ontogenézy a rovnako môžu ovplyvniť aj reprodukčný úspech dospelých zvierat [2]. Agresívne správanie pomáha vytvárať hierarchické vzťahy medzi zvieratami a následne dominantným jedincom poskytuje výhody zaistením prioritného prístupu k zdrojom potravy, lepšiemu teritóriu a výhody pri výbere sexuálneho partnera [3]. Niekoľko etologických štúdií poukázalo na možný vplyv maternálnych androgénov na agonistické prejavy správania bez pozorovaných pohlavne špecifických účinkov [4, 5, 6]. Zaznamenaná bola aj pozitívna korelácia medzi množstvom deponovaného maternálneho testosterónu a postavením juvenilných jedincov kanárika divého (*Serinus canaria*) v sociálnej hierarchii [7].

Mechanizmus účinku maternálnych androgénov v žĺtku na agresívne správanie a dominantný status nie je úplne jasný. Zmeny v správaní môžu nastať priamym následkom trvalých modifikácií hypotalamovo-hypofyzárno-gonadálnej osi alebo zmien v citlivosti na

androgény zvýšením hustoty androgénových receptorov v mozgu a na periférii [8]. Pri injekčnej aplikácii testosterónu do žltku vajec vrabca domového (*Passer domesticus*) sa hladiny cirkulujúceho progesterónu, testosterónu, 5 α -dihydrotestosterónu a 17 β -estradiolu nelíšili medzi experimentálnou a kontrolnou skupinou vyliahnutých mláďat [4]. Zmeny správania dospelých jedincov by mohli byť spôsobené aj nepriamo prostredníctvom zmien v správaní a sociálnom prostredí mláďat [9].

Za účelom definovania vplyvu maternálnych androgénov na fyziologické a behaviorálne charakteristiky boli na našom pracovisku vytvorené genetické línie prepelíc japonských (*Coturnix japonica*) selektované na vysoký (HET) a nízky (LET) obsah testosterónu v žltku [10]. V predchádzajúcom experimente sme nezistili rozdiely v reprodukčnom správaní medzi LET a HET samcami v prípade, že sa páрили so samicami z vlastnej línie. Samce z LET línie však vykazovali kratšiu latenciu ku kopulácii a vyšší počet kopulácií v pároch s HET v porovnaní s LET samicami, čo môže odrážať skôr vplyv maternálneho testosterónu v žltku na receptivitu samice [11].

Cieľom našej práce bolo analyzovať dôsledky vyšších koncentrácií testosterónu v žltku na agresívne správanie dospelých samcov na základe porovnania dvoch línií s odlišným obsahom maternálnych androgénov deponovaných do vajca prirodzeným spôsobom. Zároveň sme hodnotili možné účinky maternálneho testosterónu na hypotalamo-hypofýzo-gonadálnu os stanovením plazmatických hladín testosterónu.

Materiál a metódy

Ako experimentálne zvieratá boli použité dospelé samce prepelice japonskej z chovu Ústavu biochémie a genetiky živočíchov SAV (ÚBGŽ SAV) v Ivanke pri Dunaji. Prepelice pochádzali zo šiestej generácie z línií selektovaných na vysoké (HET) a nízke (LET) hladiny testosterónu vo vajcovom žltku. Dospelé zvieratá boli chované v individuálnych klietkach, s neobmedzeným prístupom k vode a krmivu (HYD 10). Svetelný režim (LD) bol 14:10 h so začiatkom svetlej fázy o 6:00 hod. Samcom bola vo veku 27 týždňov odobratá vzorka krvi z podkrídlovej žily a vo veku 30 týždňov boli podrobené testu agresívneho správania.

Test agresívneho správania prebiehal v chovnej miestnosti, v drevenom boxe (48x48x40 cm) s priehľadnou prednou stenou. Box bol rozdelený kartónom na dve polovice. Testovali sme vždy v páre jedného samca z LET a jedného samca z HET línie s porovnateľnou hmotnosťou. Každý pár sme testovali dvakrát v ten istý deň. Po aklimatizácii na nové prostredie v dĺžke 1 minúty sme odstránili kartónovú stenu a následne samotný test trval 5 minút. Zaznamenávali sme dĺžku vzájomnej interakcie (celkový čas vzájomnej

interakcie samcov) a hodnotili sme intenzitu dominantného správania (samec naháňa druhého samca v snahe vyskočiť naňho a primäť ho k submisívnemu postaveniu kopulujúcej samice) na základe prideleného skóre, ktoré sme sčítali z oboch pokusov. Jeden bod sme prideliť pasívnym samcom, 2 body pokiaľ boli oba samce rovnako aktívne a nedal sa jednoznačne určiť dominantný samec a 3 body sme dali samcovi, ktorý bol jednoznačne dominantný. Správanie bolo analyzované z videozáznamov.

Na zistenie koncentrácie testosterónu v plazme sme použili metódu rádioimunoanalýzy, ktorá využíva kompetíciu medzi izotopom značeným a neznačeným hormónom v obsadzovaní väzbových miest špecifickej protilátky. Ako značený izotop sme využili [1,2,6,7 – ^3H]-testosterón s aktivitou pracovného roztoku 8 000 – 10 000 DPM (PerkinElmer, USA) a ako špecifickú protilátku sme použili králičie sérum pripravené oproti testosterónu naviazanému v pozícii 3 cez karboxymetyloxím na hovädzí sérový albumín (Dr. D. Píčová, Výskumný ústav SPOFA, Jílové u Prahy, ČR). Vzorky plazmy dospelých prepeličích samcov sme riedili s fosfátovým pufrom (pH = 7,5) s 0,1% azidom sodným a 0,1% želatínou 20-krát (5 μl plazmy a 95 μl pufru/ skúmavku). Výsledné koncentrácie sme vypočítali na základe kalibračnej krivky, ktorú sme pripravili nariedením štandardu testosterónu (4-androsten-17 β -ol-3-one, Steraloids, Inc., USA) v rozsahu od 1,56 pg do 100,00 pg testosterónu na skúmavku. Voľnú a viazanú frakciu testosterónu sme oddelili pridaním 0,5% roztoku aktívneho uhlia s 1% roztokom dextransu a následnou centrifugáciou 10 minút pri 3000 ot./ min. a pri 4°C. V supernatante s viazanou frakciou testosterónu sme odmerali rádioaktivitu na beta – počítači pre tekuté vzorky (Packard Tri-Carb 2900 TR, Canberra, USA). Vzorky boli merané v rámci jedného stanovenia s variačným koeficientom 9%.

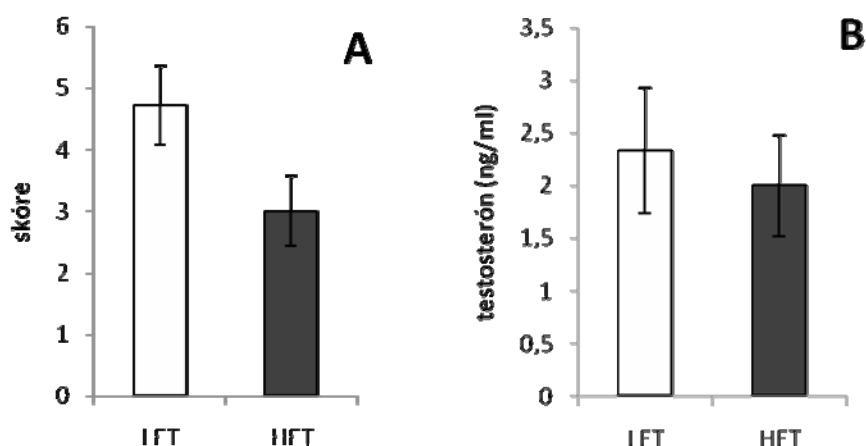
Skóre zo zaznamenávaného agresívneho správania a koncentrácia testosterónu v plazme nezodpovedali normálnemu rozdeleniu, a preto sme na štatistickú analýzu použili neparametrický Mann-Whitney-U test, v ktorom sme vzájomne porovnali hodnoty pre LET a HET samce. Na štatistickú analýzu dĺžky vzájomnej interakcie sme použili neparametrický Wilcoxonov test, v ktorom sme vzájomne porovnávali hodnoty z prvého a druhého pokusu.

Výsledky a diskusia

V teste agresívneho správania sme zaznamenali numericky vyššie skóre (súčet prvého a druhého pokusu) LET v porovnaní s HET samcami, hoci tento rozdiel sa pohyboval nad hranicou štatistickej významnosti ($U = 11$; $p = 0,097$) (Obr. 1A). V prvom pokuse sme zaznamenali rovnaký trend pre LET samcov ($U = 11$; $p = 0,097$), zatiaľ čo v druhom

opakovanom pokuse sa skóre samcov z LET a HET línií nelíšilo ($U = 12,5$; $p = 0,13$). V dĺžke interakcie medzi prvým a druhým pokusom nebol zaznamenaný významný rozdiel ($Z = 0,338$; $p = 0,735$). Predpokladali sme, že samce v druhom pokuse budú už v stabilnejšej sociálnej hierarchii a na jej udržanie budú potrebovať menej času ako v prvom pokuse. Hladiny testosterónu v plazme samcov sa nelíšili medzi LET a HET líniou ($U = 18$; $p = 0,73$) (Obr. 2A).

Naše výsledky ukazujú tendenciu poklesu agresívneho správania HET samcov vyliahnutých z vajíčok s vyšším obsahom testosterónu v žĺtku, pričom absencia signifikantných rozdielov pravdepodobne odráža malú vzorku pokusných zvierat. Predchádzajúce práce [4, 5, 6] ukázali skôr stimulačný účinok zvýšeného testosterónu v žĺtku na agresívne správanie. Nevýhodou použitých experimentálnych prístupov v týchto prácach boli málo definované koncentrácie testosterónu v žĺtku a tak injekčná aplikácia hormónu nemusela vždy odrážať fyziologické zvýšenie testosterónu vo vajci. Selektácia na vysoký a nízky obsah maternálneho testosterónu v žĺtku neovplyvnila bazálnu produkciu testosterónu v plazme u samcov. Na základe pozorovaných rozdielov v agresívnom správaní však môžeme predpokladať zmenu na úrovni reaktivity HPG osi alebo na úrovni citlivosti androgénových receptorov.



Obr. 1 Celkové skóre dosiahnuté v teste agresívneho správania (A) a koncentrácie testosterónu v plazme (B) samcov z línie selektovanej na nízke hladiny testosterónu vo vajcovom žĺtku (LET: $n = 7$) a samcov z línie selektovanej na vysoké hladiny testosterónu vo vajcovom žĺtku (HET: $n = 7$). Hodnoty sú udávané ako priemer \pm S.E.M

Záver

Vyhodnotením prejavov agresívneho správania samcov prepelice japonskej z línií divergentne selektovaných na obsah maternálneho testosterónu v žĺtku sme zistili, že samce

z LET línie mali numericky vyššie celkové skóre v porovnaní so samcami z HET línie, čo by mohlo znamenať vyššiu agresivitu a dominanciu LET samcov. Na potvrdenie získaných výsledkov a vplyvu maternálneho testosterónu na agresívne správanie je však potrebné rozšíriť súbor experimentálnych zvierat, čo budeme spolu s aplikáciou testosterónu do vajec v presne definovaných koncentráciách selektovaných línií realizovať v ďalších experimentoch.

Pod'akovanie:

Práca bola podporená grantom APVV 0047-10 a VEGA 1/0686/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Groothuis T. G. G., Müller E., von Engelhard N., et al. (2005) *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, p. 329
- [2] Groothuis T. G. G., Carere C. (2005) *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29(1), p. 137
- [3] Hau M. (2007) *BioEssays* 29, p. 133
- [4] Partecke J., Schwabl H. (2008) *Develop. Neurobiol.* 68, p.1538
- [5] Eising C. M., Müller W., Groothuis T. G.G . (2006) *Biol. Lett.* 2, p. 20
- [6] Strasser R., Schwabl H. (2004) *Behav. Ecol. Sociobiol.* 56, p. 491
- [7] Schwabl H. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, p. 11446
- [8] Pfannkuche K. A., Gahr M., Weites I. M., et al. (2011) *Gen. Comp. Endocr.* 172, p. 487
- [9] Carere C., Balthazart J. (2007) *Trends Endocrinol. Metab.* 18 (2), p. 73
- [10] Okuliarová M., Groothuis T. G. G., Škrobánek P., Zeman M. (2011) *Am. Nat.* 177 (6), p. 824
- [11] Blahutová D., Okuliarová M., Zeman M. (2012) Študentská vedecká konferencia Prif UK 2012, Zborník recenzovaných príspevkov, Bratislava, SR, p. 37

Analýza mutácií v alfa-synukleínovom géne (*SNCA*) u slovenských pacientov postihnutých Parkinsonovou chorobou

Csaba Bognár¹, Marian Baldovič¹, Ľudovít Kádasi^{1,2}, Andrea Zatlková^{1,2}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, Bratislava 4, 842 15, Slovenská republika, bognar@fns.uniba.sk

²Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Slovenská akadémia vied, Vlárská 5, Bratislava 833 34, Slovenská republika

Abstract

Parkinson disease (PD) is a chronic neurodegenerative movement disorder characterized by selective loss of nigrostriatal dopaminergic neurons and formation of Lewy bodies. Mutations responsible for the recessive early-onset PD (EOPD) were identified in *parkin* (*PARK2*), *DJ-1* (*PARK7*) and *PTEN-induced kinase 1* (*PINK1*), while mutations within *Leucine-rich repeat kinase 2* (*LRRK2*) and *α-synuclein* (*SNCA*) are associated with autosomal dominant, late onset form of PD. To detect the most common mutations (A30P, E46K, A53T) in exons 2, 3 of the *SNCA* gene, we sequenced in both direction 160 unrelated Slovakian patients with familial or sporadic PD. However, none of these mutations was identified in our cohort. We have found two novel silent mutations (c.45T>C, p.V15V; c.96G>A, p.K32K), one intronic polymorphism (c.121+11C>T, IVS3+11C>T, rs35135226) in exon 2 of *SNCA* gene. But in the exon 3 we did not observe any variation after sequencing. However, we could not completely exclude the possibility that the patients carry other mutations or rearrangements within *SNCA* gene.

Kľúčové slová: Parkinson disease; alpha-synuclein; *SNCA* gene; p.V15V, p.K32K, polymorphisms

Úvod a formulácia cieľa

Parkinsonova choroba (Parkinson disease- PD) je po Alzheimerovej chorobe druhé najčastejšie neurodegeneratívne ochorenie a v priemere postihuje viac ako 1% populácie vo veku nad 55 rokov a viac ako 3,5% nad 75 rokov. Ide o progresívne ochorenie s veľmi variabilným vekom nástupu (priemer 60 rokov). Podľa odhadov je na svete postihnutých touto chorobou asi 4 milión obyvateľov. Táto choroba sa prejavuje hlavne u starších osôb. Postihuje obidve pohlavia, aj keď štatistiky ukazujú, že muži sú viac náchylní na toto ochorenie. PD bola dlhú dobu považovaná za nehereditárnu chorobu. Napriek tomu, že rozsiahle štúdie pokúšali nájsť environmentálne rizikové faktory pre vznik choroby, genetické varianty sa považujú dnes za hlavný kauzatívny faktor [1,2].

V závislosti od veku nástupu rozoznávame tri formy PD. Juvenilná forma (YOPD- young/juvenile onset Parkinson's disease) pri ktorom prvé príznaky sa objavujú pred 20. rokom života. Skorá forma (EOPD- early onset PD), často označovaná aj ako rodinná s nástupom medzi 20 a 50. rokom života jedinca. Neskorá forma (LOPD- late onset PD), ktorá je sporadická, nastupuje po 50. roku života [3,4]. Idiopatická PD vykazuje charakteristické patomorfologické zmeny v oblasti mozgu, ako je strata a depigmentácia neurónov v

pigmentovaných jadrách mozgového kmeňa. Vo väčšine prípadov sú v mozgu prítomné aj eozinofilné vnútrobunkové inklúzne telieska, nazývané aj Lewyho telieska [5, 6].

Žiaľ, terapia ktorá by dokázala úplne vyliečiť PD dodnes nie je známa. Sú dostupné viaceré lieky na účinné potláčanie príznakov, hlavne vo včasných štádiách ochorenia. Lieky ktoré nahrádzajú nedostatok dopamínu (Levodopa), alebo napodobňujú jeho účinok (dopaminergná liečba): agonisty dopamínu, anticholinergiká, a inhibítory monoaminoxidáz. PD je jednoznačne multifaktoriálne ochorenie, na vzniku príznakov hrajú významnú úlohu aj environmentálne faktory [7,8,9]. Napriek tomu sú známe už rôzne gény, ktorých mutácie môžu spôsobovať vznik Parkinsonovej choroby (*PARK2*, *LRRK2*, *SNCA*, *ATP13A2*, *P2A6G*, *PINK1*, *DJ-1*, *GYGIF2*, *GBA*, a iné).

V roku 1996 bol popísaný prvý lokus pre PD- PARK1. V tomto lokuse našli v jednej rodine s autozomálne dominantnou (AD) formou PD prvú bodovú mutáciu A53T v géne *SCNA*. Gén bol mapovaný na chromozómovú pozíciu 4q21-q23. Produktom génu je alfa-synukleín, čo je hlavnou zložkou obsahu Lewyho teliesok. PD pacienti s mutáciou v *SCNA* mali podobné klinické príznaky a patologické nálezy ako pacienti s idiopatickou formou ochorenia, vrátane dobrej odpovede na liečbu s Levodopou a prítomnosť Lewyho teliesok. Priemerný vek pri nástupe príznakov bol 46 rokov [10]. Tá istá mutácia (p.Ala53Thr v exóne 4 génu *SCNA*) ako u prvej talianskej rodiny bola nájdená aj u 9 gréckych rodín [11]. Tento objav poukázal na možnosť efektu zakladateľa u spoločného predka. Iná mutácia (p.Ala30Pro v exóne 3) bola nájdená v nemeckej rodine [12].

V jednej veľkej PD rodine s AD typom dedičnosti našli silnú genetickú väzbu s oblasťou 4p15, a lokus pomenovali ako PARK4 [13]. Neskôr však zistili, že haplotyp na 4p sa vyskytoval aj u zdravých členov rodiny. V roku 2003 Singleton a kol. našli haplotyp kosegregujúci s ochorením v blízkosti markera DS42460 na chromozóme 4q. [14]. Takisto zistili že triplikácia tejto dlhšej chromozómálnej oblasti obsahujúci až 17 génov (4q), spôsobuje triplikáciu aj celého génu *SCNA* [15]. Triplikácie *SCNA* spôsobujú skorší nástup príznakov, rýchlejšiu progresiu a horšie fenotypové prejavy PD (demenciu, vegetatívnu dysfunkciu) ako duplikácie toho istého lokusu. U sporadickej forme PD sa našli aj polymorfizmy v tomto géne, ktoré zvyšujú riziko vzniku ochorenia [16].

Proteín *SCNA* pozostáva zo 140 aminokyselinových zvyškov. Za fyziologických podmienok je alfa-synukleín nezbalený presynaptický proteín s nízkou tendenciou zaujať špecifickú sekundárnu štruktúru [17]. Tvorí asi 1% všetkých bielkovín v CNS, a jeho agregáty sú hlavnou súčasťou Lewyho teliesok [6]. Takéto depozity alfa-synukleínu nájdeme aj u ďalších neurodegeneratívnych ochorení, ktoré sa spoločne nazývajú synukleinopatie

(demencia s Lewyho telieskami, multisystémová atrofia, a iné). Konformačné chovanie alfa-synukleínu reaguje na zmeny vonkajších vplyvov. Ako monomér dokáže pôvodne nezbalený proteín vytvoriť rôzne sekundárne štruktúry a má schopnosť polymerizovať. Polymerizácia postupuje od dimérov k morfológicky odlišným oligomérom a protofibrilám a je zakončená tvorbou nerozpustných agregátov. Agregáciu indukuje zvýšená koncentrácia samotného alfa-synukleínu, zmena pH, alebo prítomnosť kovov [17]. Tvorba inklúzií bola preukázaná aj pri pôsobení organických rozpúšťadiel [18] a látok podobných herbicidom (napr. paraquat) [19]. Fosforylácia a ďalšie posttranslačné modifikácie alfa-synukleínu môžu takisto ovplyvniť jeho rozpustnosť [20]. Presná funkcia tohto proteínu ešte nie je známa. Existujú dôkazy o jeho vplyvu na funkciu vezikúl, synaptickú plasticitu, metabolizmus dopamínu [21]. Najnovšie štúdie predpokladajú že SNCA proteín je priónu podobný (prion-like) proteín, keďže môže mať rôzne konformácie. Pri fyziologických podmienkach zaujme neštrukturovanú alebo alfa-helixovú štruktúru, a patologická forma naopak vytvára oligomery alebo fibrily, ktoré sú bohaté na beta-skladané listy. Navyše agregovaný alfa-synukleín je schopný transferu medzi bunkami. [22].

Bodovú mutáciu c.157G>A (A53T) našiel prvýkrát Polymeropoulos a kol. v jednej veľkej talianskej rodine a v troch nepríbuzných gréckych rodinách [2]. Kruger a kol. identifikovali ako prvú mutáciu c.88G>C (A30P) u jedného pacienta s familiárnou formou PD [12]. Mutácia c.136G>A (E46K) v géne *SNCA* spôsobuje ľahšiu tvorbu fibríl [23], ktoré sú prítomné takisto aj pri poruchách odbúravania alfa-synukleínu v ubikvitín-proteazómovom systéme a v lyzozómoch [24]. Tieto tri mutácie sú doteraz jediné potvrdené patogénne bodové mutácie v géne *SNCA* a nachádzajú sa v druhom (A30P) a v treťom exóne (E46K, A53T).

Okrem vnútrobunkovej patológie bola toxická aktivita alfa-synukleínu preukázaná aj v extracelulárnom priestore, kde agregáty vyvolali mikrogliaálnu aktiváciu a uvoľnenie zápalových cytokínov [25].

Hlavným cieľom predloženej práce bolo prispieť k rozvoju molekulárnej diagnostiky Parkinsonovej choroby na Slovensku. Chceli sme rozšíriť spektrum analyzovaných génov, a tým aj zvýšiť si pravdepodobnosť záchytu patogénnych mutácií u PD pacientov. Sekvenovaním exónov 2 a 3 génu *SNCA* sme chceli nájsť najčastejšie patogénne bodové mutácie (A30P, E46K, A53T). Následne bioinformaticky spracovať získané výsledky a konfrontovať ich s existujúcimi databázami. Konečným cieľom bol popis nájdených mutácií a polymorfizmov u slovenských pacientov s Parkinsonovou chorobou, stanovenie ich spektra a frekvencie.

Materiál a metódy

Analýzy boli uskutočnené na súbore 160 DNA vzoriek od slovenských pacientov vo vekovom rozmedzí 36-90 rokov, diagnostikovaných na Parkinsonovu chorobu na II. Neurologickej klinike LFUK, Nemocnice Akademika Ladislava Dérera, pracovisko Kramáre. DNA bola izolovaná z periférnej krvi odobratej do skúmaviek s antikoagulačnou látkou EDTA pomocou izolačného kitu Qiagen–GENTRA Puregene blood kit (Qiagen) podľa postupu doporučeného výrobcom. Amplifikáciu exónov 2 a 3 génu *SNCA* sme uskutočnili pomocou nami navrhnutých primerov, ktoré sme dizajnovali s Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Ako referenčnú sekvenciu sme zvolili transkript SNCA-001 ENST00000394986 z databázy www.ensembl.org.

Vzorky boli analyzované priamym DNA sekvenovaním pomocou BigDye Terminator v1.1 cycle sequencing kit na prístroji ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (od firmy Applied Biosystems, USA). Hrubé dáta sme analyzovali Sequencing Analysis Software v5.2. Následná analýza sekvencií bola uskutočnená softvérom Chromas Pro ver3.1 (Technelysium, Australia).

Výsledky a diskusia

Pomocou sekvenovania 2. a 3. exónu génu *SNCA* sme našli rôzne sekvenčné varianty. Dve doteraz nepopísané tiché mutácie: c.45T>C (p.V15V)- podľa predikčných software-ov <http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/> a <http://www.umd.be/HSF/> táto zmena neovplyvní mechanizmus splicingu; a druhú tichú mutáciu c.96G>A (p.K32K)- ktorá podľa spomenutých programov potenciálne môže negatívne ovplyvniť zostrih, zničením oblasti ESRS (exonic splicing regulatory element). Našli sme aj jeden už popísaný intronický polymorfizmus: c.121+11C>T (IVS3+11C>T, rs35135226) v exóne 2 génu *SNCA*. Tento polymorfizmus je veľmi zriedkavý v populácií európskeho pôvodu (frekvencia C/T alely je nižšia ako 0,002). Každá zmena bola pozorovaná v heterozygotnej forme. Pritom každá alela mala frekvenciu $q=0.003125$, (vždy 1 pacient bol nositeľom zo súboru 160 ľudí). V treťom exóne génu *SNCA* sme nenašli žiadnu sekvenčnú zmenu.

Mutácie v tomto géne sú zriedkavé aj v iných populáciách PD pacientov, avšak práve objavy týchto mutácií pomohli objasniť úlohu génu *SNCA* pri sporadických formách ochorenia [26,13,27]. U PD pacientoch našli aj duplikované/triplikované úseky

chromozomálnej oblasti nesúci *SNCA* [28]. Napriek tomu duplikácie a triplikácie nie sú častým javom u PD pacientov [29].

Záver

Aj keď sme našli iba tiché mutácie (c.45T>C (p.V15V), c.96G>A (p.K32K)) a polymorfizmus (rs35135226), má zmysel pokračovať v mutačnom skríningu lokusov asociovaných so vznikom PD, pretože tieto analýzy prispievajú k presnejšej diagnostike ochorenia, a tým aj k možnosti výberu efektívnejšej liečby, čo u pacientov napomôže minimalizovaniu nepríjemných vedľajších účinkov spôsobených užívaním nesprávnych liekov.

V budúcnosti by sme chceli rozšíriť spektrum už prebiehajúceho mapovania (*parkin*, *LRRK2*, *SNCA*) na ďalšie exóny, ešte nezahrnutých génov (*PINK1*, *DJ-1*), aby sme mohli zachytiť čo najširšiu škálu mutácií u slovenských pacientov s PD.

Pomocou MLPA metódy plánujeme hľadať prípadné prestavby exónov v génoch *parkin* a *PINK1*, duplikáciu/triplikáciu *SCNA* génu, a najčastejšie bodové mutácie v jednej reakčnej skúmavke naraz. Touto metódou by sme mohli pomôcť vyriešiť najzáhadnejšie mutácie v géne *parkin* (AR dedičnosť), pomocou sekvenovania sa v ňom nájde menej než 50% homozygotných alebo zložených heterozygotných mutácií.

PodĎakovanie

Chceme sa poďakovať všetkým pacientom a ich rodinám. Tento projekt bol financovaný z grantov VEGA 1/1288/12 a GUK/494/2013.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Benetin J., Cibulčík F., Turčáni P., et al. (2007) Ako žiť s Parkinsonovou chorobou. Lundbeck Slovensko s.r.o., Bratislava, p. 7
- [2] Polymeropoulos M. H., Higgins J. J., Golbe L. I., et al. (1996) *Science*. 274, p.1197
- [3] Elbaz A, Bower J. H., Maraganore D. M., et al. (2002) *J Clin Epidemiol*. 55, p.25
- [4] Fox et al.: *Human physiology*, 12th edition, The Tim McGraw-Hill companies, ISBN 978-0-07-337811-4, 2011
- [5] Braak H, Rüb U, Jansen S et al. (2005) *Neurology*. 64 p.1404
- [6] Wakabayashi K, Tanji K, Mori F, et al. (2007) *Neuropathology*. 2007; 27, 494
- [7] Nussbaum R. L., Polymeropoulos M. H. (1997) *Hum. Mol. Genet*. 6, p. 1687
- [8] Eriksen J. L., Wszolek Z., Petrucelli L. (2005) *Arch. Neurol*. 62, p. 353

- [9] Calne S., Schoenberg B., Martin W., et al. (1987) *Canad. J. Neurol. Sci.* 14, p. 303
- [10] Polymeropoulos M. H., Higgins J. J., Golbe L. I., et al. (1996) *Science*. 274, p.1197
- [11] Bostantjopoulou S., Katsarou Z., Papadimitriou A., et al. (2001) *Mov Disord.* 16, p.1007.
- [12] Kruger R., Kuhn W., Muller T., et al. (1998) *Nat Genet.* 18 p. 106
- [13] Farrer M., Wavrant-De Vrieze F., et al. (1998) *Ann Neurol.* 43 p. 394
- [14] Singleton A. B., Farrer M., Johnson B. (2003) *Science* 302, p. 187
- [15] Miller D. W., Hague S. M., Clarimon S. et al. (2004) *Neurology.* 62, p. 1835.
- [16] Fiala O., Ruzicka E: *Genetika Parkinsonovy nemoci, Cesk Slov Neurol N* 2009, 75 p. 419
- [17] Uversky V. N., Li J., Fink P. et al. (2001) *J Biol Chem.* 276, p. 10734
- [18] Munishkina L. A., Phelan C., Uversky V. N. et al. (2003) *Biochemistry.* 42, p. 2720
- [19] Manning-Bog A. B., McCormack A. L. et al. (2002) *J Biol Chem.* 277, p.1641
- [20] Smith W. W., Margolis R. L., Li X., et al. (2005) *J Neurosci.* 25, p. 5544
- [21] Yu S., Uéda K., Chan P. (2005) *Mol Neurobiol.* 31, p. 243
- [22] Dunning C. J., George S., Brundin P. (2013) *Prion.* 7, p.92
- [23] Greenbaum E. A., Graves C. L. et al. (2005) *J Biol Chem.* 280:7800
- [24] Vogiatzi T., Xilouri M., Vekrellis F. et al. (2008) *J Biol Chem.* 283, p.23542
- [25] Lee S. J. (2008) *J Mol Neurosci.* 34 p. 17
- [26] Chan P., Jiang X., Forno L. S. et al. (1998) *Neurology.* 50, p. 1136
- [27] Berg D., Niwar M., et al. (2005) *Mov Disord.* 20, p.1191
- [28] Ibanez P., Bonnet A. M., Debarges G. et al. (2004) *Lancet.* 364, p. 1169
- [29] Gispert S., Trenkwalder C., et al. (2005) *Arch Neurol.* 62, p. 96

Legius syndróm- identifikácia prevalencie mutácií v *SPRED1* géne v slovenskej populácii

Lenka Briatková¹, Martina Némethová³, Anna Bolčeková⁵, Tomáš Olčák², Denisa Ilenčíková⁶, Slávka Požgayová⁷, Ľudevít Kádaši⁸, Andrea Zaťková⁴

^{1,2,8}Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká Fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika, lenka.briatkov3@gmail.com

^{3,4}ÚMFG SAV, Laboratórium genetiky, Vlárská 5, 833 34 Bratislava, Slovenská republika

^{5,6,7}2. detská klinika LF UK a DFNSP v Bratislave, Limbová 1, 833 40 Bratislava, Slovenská republika

Abstrakt

Legius syndrome is a human autosomal dominant disorder affecting the Ras/MAPK signaling pathway. Because of its phenotypical similarity to the neurofibromatosis-1 it has been distinguished from NF1 recently, in 2007. Spred1 (Sprouty-related protein with an EVH1 domain) has a tumor suppressive activity and it is fundamental for inducing of negative regulation of Ras pathway by recruiting NF1 protein. Loss-of-function mutations in SPRED1 gene lead to café-au-lait spots, macrocephaly, lipomas or axillary freckling, in generally showing a lack of NF1 signs such as optic pathway glioma, osseous lesions, Lisch nodules or neurofibromas. Here we show a genetic analysis of slovak NF1 negative patients, distribution, type and clinical status of genetic variants found.

Kľúčové slová: *SPRED1*; Legius syndrome; NF1; Ras/MAPK signaling pathway; mutation

Úvod a formulácia cieľa

Ras/mitogénom-aktivovaná proteín kinázová (MAPK) dráha riadi bunkovú proliferáciu a diferenciáciu a poruchy ovplyvňujúce túto dráhu vedú k signifikantným fenotypovo sa prekrývajúcim ochoreniam zvaným rasopatie [1]. Mutácie vedúce k strate funkcie 444-aminokyselín dlhého inhibítora *SPRED1*, jedného z kľúčových regulátorov Ras/MAPK signalizácie, vedú k vzniku ľudského autozomálne dominantného ochorenia s názvom Legius syndróm [2]. *SPRED1* u *Homo sapiens* obsahuje 3 funkčné domény, EVH (exóny 1-3), SPR (exón7) a KBD (exón 7) doménu a je exprimovaný najmä v dospelom mozgu a niektorých fetálnych tkanivách, čo poukazuje na jeho úlohu vo vývine organizmu [3]. Gén *SPRED1* sa nachádza na chromozóme 15, pokrýva 104,92kb genomickej DNA a obsahuje 7 exónov.

V roku 2007 bola na základe genetickej analýzy zistená genotypová odlišnosť pôvodu neurofibromatózy typu 1 (*NF1*) od fenotypovo príbuzného Legius syndrómu [2]. Medzi charakteristické klinické prejavy Legius syndrómu patria *freckling* (30%), café au lait škvrny (90%), lipómy, makrocefália (>97 percentil; 42%) a problémy s učením (ADHD) [2,4,5,6,7,8]. Špecifickým znakom pre Legius syndróm u ľudí spĺňajúcich NIH diagnostické

kritériá pre neurofibromatózu 1 je absencia mutácií v *NF1* géne, malígneho rastu, Lischových nodulov a abnormalít kostí. Pozdĺž celého *SPRED1* génu boli identifikované rozdielne druhy patogénnych mutácií (posunové, bez zmyslu, so zmeneným zmyslom, zostrihové mutácie alebo *in-frame* delécie), no zatiaľ nebola nájdená spoľahlivá korelácia medzi genotypom a fenotypom [1].

Naším cieľom bola genetická analýza slovenských pacientov s *NF1* fenotypom, u ktorých neboli genetickou analýzou identifikované mutácie v *NF1* géne. Analyzovali sme u nich prevalenciu *SPRED1* variantov a na základe ich analýzy v on-line databázach sme určili klinický efekt na fenotyp.

Materiál a metódy

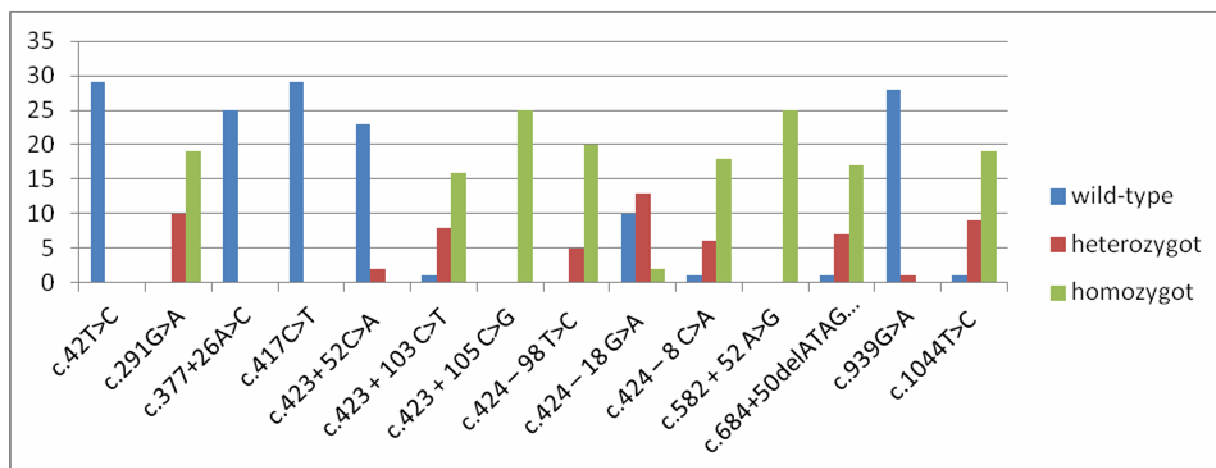
Periférna krv pacientov bola použitá na izoláciu DNA pomocou kitu NucleoSpin® Blood a na izoláciu leukocytov a ich krátkodobú kultiváciu. Po kultivácii bola pomocou Trizolu (Invitrogen™) izolovaná celková RNA. Podľa protokolu kitu SuperScript-First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen™) bola izolovaná RNA prepísaná do cDNA. Na amplifikáciu genomickej DNA a cDNA *SPRED1* génu boli použité primery publikované v článku „Germline loss-of-function mutations in *SPRED1* cause a *NF1*-like phenotype“ [4]. Fragment 3 pre *SPRED1* cDNA sme navrhli v online programe Primer3(v.0.4.0) [9]. Ako referenčná sekvencia bola použitá *SPRED1* sekvencia cDNA z Ensembl NM_152594.2 [10]. Na vizualizáciu jednotlivých fragmentov DNA po elektroforetickej separácii na 1% agarózovom géli sme použili vizualizačný systém Mini BIS Pro (Bioimaging systems). Následne boli PCR produkty prečistené polyetylénglykolom (20% PEG+2,5mmol.l⁻¹ NaCl) na odstránenie inhibítorov sekvenačnej reakcie. Na sekvenačnú reakciu bol použitý Big Dye® Terminator v.1.1/v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems). Pred vložením do sekvenátora ABI 3130xl sme sekvenačnú reakciu prečistili precipitačným roztokom NaOAc (1µl NaAc pH 4,6; 22µl EtOH; 5µl ultračistá voda) a pridali Hi-Di formamid (Applied biosystems). Na analýzu sekvencií sme použili programy ChromasPro v1.5 (Technelysium) a Sequence scanner v1.0 (Applied biosystems).

Výsledky a diskusia

Naším zámerom bolo pomocou genetickej analýzy krvi vyšetriť pacientov z rôznych oblastí Slovenska, u ktorých neboli identifikované *NF1* mutácie, na prítomnosť patogénnych mutácií vedúcich k vzniku rasopatie Legius syndrómu. Z približne 190 pacientov prijatých od roku 2008 na *NF1* diagnostiku bolo podrobených analýze *SPRED1* génu 41 *NF1* negatívnych

pacientov. U prvých 25 pacientov bola analýza uskutočnená len na úrovni gDNA. Týmto spôsobom však nie je možné zachytiť efekt splicingových mutácií, preto sme sa rozhodli pokračovať analýzou na úrovni cDNA. Zvýšila sa tým aj efektívnosť a rýchlosť sekvenovania, pretože sa znížil počet sekvenovaných fragmentov. Analýza na úrovni cDNA je ukončená u 10 pacientov a ďalších 29 je v štádiu spracovania. V prípade identifikácie variantu v cDNA overujeme jeho prítomnosť sekvenovaním príslušného exónu v gDNA.

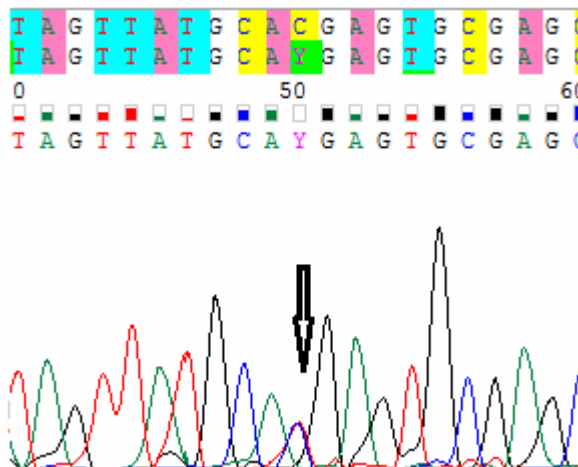
Z 35 pacientov, u ktorých bola analýza na úrovni gDNA alebo cDNA ukončená, sme iba v jednom prípade identifikovali patogénnu zmenu, nonsense mutáciu c.46C>T (p.Arg16*) v exóne 2 [4] v heterozygotnom stave (Obr.2), ktorá ovplyvňuje funkciu EVH-1 domény. U ostatných pacientov sme pozorovali len benígne varianty polymorfizmov, exonické c.42T>C [6], c.291G>A (Lys97Lys) [7], c.1044T>C(Val348Val) [11] a intronické c.424-18G>A [7,11], c.424-8C>A [7] a klinicky nepopísané varianty c.377+26A>C, c.417C>T(Asp139Asp), c.423+52C>A, c.423+103C>T, c.423+105C>G a c.424-98T>C [7], c.582+52A>G a c.684+50delATAG insTTAAATTAGTA, c.939G>A (Thr313Thr) na genomickej a cDNA úrovni [12]. Alelové zastúpenie polymorfných variantov v našej populácii je znázornené na obrázku 1. Nájdené polymorfizmy v homozygotnom stave by mohli indikovať heterozygotnú deléciu celého génu, ktorú by bolo možné odhaliť pomocou metódy MLPA.



Obr.1 Sledované varianty v *SPRED1* géne. Na x osi sú sledované polymorfizmy, na y osi sa nachádza počet pacientov s daným variantom. Ako wild-type uvádzame vždy prvú alelu uvedenú v zápise, napr. v prípade variantu c.423+52C>A je to alela C.

Variant c.42T>C bol popísaný [6] u probandov získaných z 19 centier v USA a Kanade. V slovenskej populácii sme pozorovali len „wild-type“ c.42T>T variant. Polymorfizmus c.424-18G>A nebol nikdy nájdený ako izolovaný variant, ale vyskytoval sa spolu

s c.291A>G, c.1044T>C a/alebo c.424-98T>C. Predikcia možného zostrihového efektu variantu c.424-18G>A nepreukázala vplyv na zostrihové miesta [7].



Obr.2 Patogénna mutácia c.46C/T v heterozygotnom stave. V hornom riadku je referenčná sekvencia, v druhom riadku je mutantná sekvencia pacienta.

V našom súbore sme identifikovali len 1 pacienta s Legius syndrómom. Symptómy podobné NF1 diagnóze sú variabilné a sú prítomné u viacerých typov ochorení patriacich medzi rasopatie (napr. Noonan, Leopard, Costello syndrómy). Ďalším krokom by mohla byť genetická analýza génov zodpovedných za ochorenia symptomaticky súvisiacich s Ras/MAPK signálnou dráhou.

Záver

Cieľom našej práce bolo identifikovať patogénne varianty v *SPRED1* géne u NF1 negatívnych pacientov, ktoré vedú k vzniku Legius syndrómu. Prostredníctvom sekvenovania cDNA a genomickej DNA sme odhalili 1 pacienta s patogénnou mutáciou c.46C>T a 31 pacientov s nepatogénnymi variantami. Výsledky môžu byť nápomocné pri diferenciálnej diagnostike. Potvrdením diagnózy Legius syndrómu u pacienta je možné poskytnúť pacientovi presnejšie informácie o potenciálnych rizikách spojených s fenotypovými prejavmi Legius syndrómu jeho ochorenia a zvoliť adekvátnu terapiu.

Pod'akovanie

Moje poďakovanie patrí vedúcej diplomovej práce Mgr. Andrei Zaťkovej PhD., Mgr. Martine Némethovej za odborné vedenie pri vedeckom výskume a pracovníkom katedry molekulárnej biológie za cenné rady. Osobitné poďakovanie patrí mojej rodine za veľkú podporu počas celého doterajšieho štúdia.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Brems H., Pasmant E., Van Minkelen R. (2012) *Hum. Mutat.* 33 (11), p.1538
- [2] Brems H., Chmara M., Sahbatou M., et al. (2007) *Nat Genet.* 39 (9), p.1120.
- [3] Engelhardt C. M., Bundschu K., Messerschmitt M., et al. (2004) *Histochem. Cell Biol.* 122 (6), p.527
- [4] Pasmant E., Sabbagh A., Hanna N. et al. (2009) *J. Med. Genet.* 46 (7), p.425
- [5] Spurlock G., Bennett E., Chuzhanova N. (2009) *J. Med. Genet.* 46 (7), p.431
- [6] Messiaen L, Yao S, Brems H (2009) *JAMA* 302 (19), p. 2111
- [7] Muram-Zborovski T.M., Stevenson D.A., Viskochil D.H. (2010) *J. Child. Neurol.* 25 (10), p.1203
- [8] Denayer E., Chmara M., Brems H. (2011) *Hum. Mutat.* (2011) 32 (1), p.1985
- [9] Primer3 [citované 17. február 2013] <<http://frodo.wi.mit.edu/>>
- [10] Ensembl databáza [citované 17. február 2013]
<http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000166068;r=15:38544527-38649450;t=ENST00000299084>
- [11] Hasle H., Bergsträsser E., Van den Heuvel-Eibrink M.M., et al. *Blood* (2010) 115 (12), p.2557
- [12] ARUP databáza [citované 4. marec 2013] <http://arup.utah.edu/database/SPRED1/SPRED1_display.php>

Štúdium interakcií DnaA proteínu s vybranými iniciačnými proteínmi v procese iniciácie replikácie v bunkách octových baktérií

Juraj Bugala, Viera Cimová, Martin Babič

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, juraj.bugala@gmail.

Abstract

In presented work we characterized interactions between DnaA protein and other replication proteins in the process of initiation of DNA replication. We amplified *dnaA* gene of *Acetobacter pasteurianus* 1513 and 3610 from chromosome. We cloned this gene into expression vectors pET28a+ and pET30a+, to ensure fusion of target protein with His-tag for the needs of the DnaA purification. With these constructs we transformed competent cells of *E.coli* B121 (DE3), we overexpressed and purified recombinant proteins on nickel column. We also cloned *dnaA* gene into vector pKT25 to verify its ability to interact with other replication proteins. For this purpose we used bacterial two hybrid system. We also cloned *dnaA* gene into the vector pBAD-GFPuv, to ensure the fusion of the target protein with a green fluorescent marker. All the prepared constructs and fusion proteins will be used in subsequent analyzes of *dnaA* protein interactions with other replications proteins.

Kľúčové slová: *DnaA* proteín; expresie; interakcia proteínov

Úvod a formulácia cieľa

V roku 2009 v laboratóriu Yoshinao Azuma[1] bol kompletne osekvenovaný genóm *Acetobacter pasteurianus* IFO 3281-01. Jedným z identifikovaných génov bol aj gén pre potenciálny DnaA proteín popísaný ako *dnaA* –like gén. Na základe nukleotidovej sekvencie genómu *Acetobacter pasteurianus* IFO 3281-01 sme navrhli PCR priméry na amplifikáciu génu *dnaA*.

Predkladaná práca je zameraná na charakterizáciu tohto proteínu, ktorý je iniciačný proteín replikácie a patrí do AAA+ rodiny proteínov. Má kľúčovú úlohu v procese iniciácie replikácie DNA v bunke. Je zložený zo štyroch domén, z ktorých má každá vlastnú špecifickú funkciu. V procese iniciácie interaguje so špecifickými väzobnými miestami v počiatku replikácie DNA a takisto interaguje s inými iniciačnými proteínmi [2]. Takisto sa podieľa na replikácii plazmidov [3]. Proteín DnaA bol intenzívne študovaný na modelovom organizme *E. coli*, ale nie u octových baktérií. Z výsledkov predchádzajúcich experimentov vyplývajú výrazné rozdiely medzi *dnaA* genóm z *E. coli* a z *A. pasteurianus* už na nukleotidovej úrovni (25-35 % identita), čo môže mať výrazný vplyv na spôsob akým daný proteín interaguje v bunkách octových baktérií.

V našej práci sa chceme preto sústrediť na objasnenie interakcií medzi iniciačnými replikačnými proteínmi izolovanými z *Acetobacter pasteurianus*. Tieto chceme sledovať *in*

in vivo pomocou bakteriálneho dvojhybrdného systému a takisto *in vitro* pomocou pull down assay a následného western blottingu. Takisto chceme overiť možnosť interakcie proteínu DnaA z octových baktérií s proteínom izolovaným z buniek *E. coli*.

Materiál a metódy

Použitý kmeň a plazmidy

V práci sme použili bakteriálny kmeň *Acetobacter pasteurianus* CCM 3610 a *Acetobacter pasteurianus* LMG 1513, klonovací vektor pGEM-Teasy, expresný vektor pET28a+ a pET30+, vektor pBAD-GFPuv a expresné bunky *E. coli* BL21 (DE3) a *E. coli* XL1 Blue.

Transformácia a indukcia expresie

Na transformáciu a indukciu expresie génu *dnaA* sme použili plazmid pET28/*dnaA*, pET30/*dnaA* a expresné bunky *E. coli* BL21 (DE3). Expresiu sme indukovali pridaním IPTG do výslednej koncentrácie 1 mmol.l⁻¹. Rekombinantom pBAD-GFPuv/*DnaA* sme transformovali bunky *E. coli* XL1 Blue a expresiu indukovali pridaním arabinózy do výslednej koncentrácie 0,2 %.

Elektroforéza v PAGE

Expresiu proteínu sme sledovali elektroforézou v 12 % SDS PAGE, ktorú sme uskutočnili podľa metódy popísanej Sambrook a kol. (1989) [4].

Purifikácia proteínov

Bunkovú kultúru po expresii sme centrifugovali pri 8000g 10 min. Pelet rozsuspendovali v homogenizačnom roztoku (50 mmol.l⁻¹ Tris-HCl pH 8,0, 0,3 mol.l⁻¹ NaCl, 5 % glycerol) a následne sonikovali. Suspenziu sme opäť centrifugovali, aby sme oddelili bunky po sonikácii od vodnej fázy obsahujúcej proteín. Túto sme potom nanášali na kolónku (His-Select Nicel Affinity Gel, Sigma) ekvilibrovanú roztokom (50 mmol.l⁻¹ Tris-HCl pH 8,0, 300 mmol.l⁻¹ NaCl a nabitú 1 mol.l⁻¹ roztokom NiSO₄·7H₂O). Nenaviazané proteíny boli odmyté ekvilibračným roztokom a rekombinantný proteín bol vytlačený rovnakým roztokom obsahujúcim gradient imidazolu v koncentráciách od 50 do 500 mmol.l⁻¹. Takto získané vzorky boli následne analyzované elektroforézou v PAGE.

Dvojhybridný systém

V práci sme použili EUROMEDEX BACTH System Kit (Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System Kit) podľa návodu výrobcu. Skumané proteíny sme klonovali do vektorov pKT25 resp. pUT18 a transformovali do buniek BTH101 (*E. coli* cya). Každý z týchto vektorov kóduje aj časť katalytickej domény adenylát cyklázy *Bordetella pertussis*

(fragmenty T25 a T18), ktoré sú neaktívne ak sú od seba oddelené. Ak sú fúzované s interagujúcimi proteínmi, heterodimerizácia týchto proteínov vedie ku komplemetácii T25 a T18 fragmentov, funkčnej katalytickej domény (cya⁺) a syntéze cAMP. Komplex cAMP/CAP zapína transkripciu génov *lac* operónu a preto umožní identifikáciu pozitívnych klonov na miskách s LB médiom, X-gal a IPTG.

Výsledky a diskusia

V predloženej práci sa zaoberáme štúdiom DnaA proteínu z kmeňov *Acetobacter pasteurianus* 1513 a *Acetobacter pasteurianus* 3610. Veľkosť DnaA proteínu sme určili v predchádzajúcej práci na 467 aminokyselín a 52,56 kilodaltonov [5].

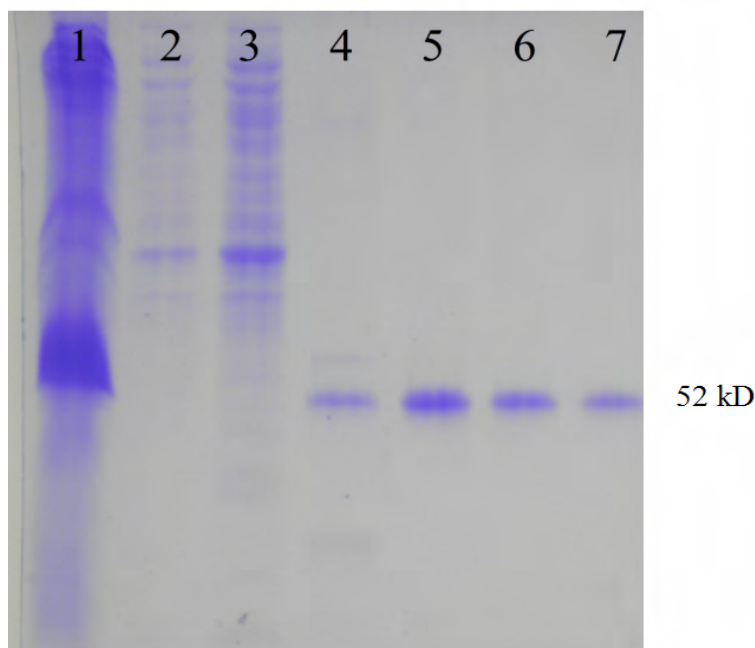


Obr. 1 Aminokyselínová sekvencia DnaA proteínu s vyznačenými α -helixami.

Gén *dnaA* sme amplifikovali PCR reakciou z chromozómu kmeňov *Acetobacter pasteurianus* 1513 a *Acetobacter pasteurianus* 3610, medzi ktorými je zhoda v poradí nukleotidov 81%, klonovali do vektoru pGEM-T easy a ligačnou zmesou sme transformovali kompetentné bunky *E. coli* XL1 blue. Správnosť klonov sme overili elektroforézou a PCR reakciou. Z pozitívnych rekombinantov sme gén vyštiepili restričnými endonukleázami BamHI a HindIII a klonovali ho do expresných vektorov pET28a+ a pET30a+. Pozitívne klony sme opäť overili PCR reakciou s primermi na *dnaA* gén. Takýmito klonmi sme transformovali expresné bunky *E. coli* BL21 (DE3). Takto sme zabezpečili vznik fúzneho

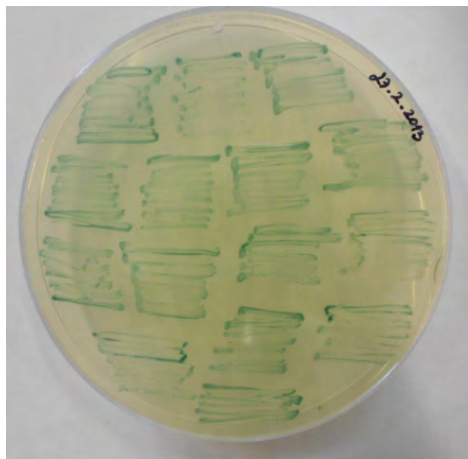
proteínu DnaA s His-tag značkou.

Z nočnej kultúry takto pripravených buniek sme preočkovali 200 μl na objem 100 ml LB média. Kultúru sme nechali rozrásť na 37 °C do optickej hustoty 0,6. Bunky sme indukovali pridaním IPTG do výslednej koncentrácie 1 mmol.l^{-1} . Inkubácia pokračovala pri rovnakých podmienkach ďalšie 3 hodiny. Nasledovala purifikácia proteínov podľa postupu uvedeného v časti Materiál a metódy (Obr. 2.).



Obr.2 PAGE gél, v 1. dráhe je nanášacia vzorka, v 2. a 3. premytá ekvilibračným roztokom, v dráhach 4 až 7 sú vzorky po premytí kolónky elučným roztokom s gradientom imidazolu

Na overenie schopnosti DnaA proteínu interagovať s uvedenými proteínmi sme využili BACTH system Kit od firmy Euromedex. Overili sme interakciu medzi DnaA a Hu proteínmi a medzi DnaA a Rep₂₀ izolovaným z plazmidu pAG20 z *Acetobacter aceti* 3620. Gén *dnaA* sme klonovali do vektoru pKT25. Gény *Hu* a *rep₂₀* do vektoru pUT18. Dvojicou pKT25DnaA a pUT18Hu alebo pKT25DnaA a pUT18Rep₂₀ sme transformovali bunky *E.coli* BTH101. Takéto bunky sme vysiali na misky s LB médiom obsahujúcim X-Gal (40 $\mu\text{g/ml}$), IPTG (0,5 mmol.l^{-1}), ampicilín a kanamycín a nechali rásť 48 h na 30 °C. V bunkách *E.coli* je expresia lacZ génu, ktorý kóduje β -galaktozidázu, pozitívne regulovaná cAMP/CAP. Preto ak klonované hybridné proteíny dokázali medzi sebou v bunkách interagovať, tvorili cAMP, bunky dokázali rozkladať X-Gal a boli modré. Potvrdili sme schopnosť interakcie Hu a DnaA proteínu (Obr. 3) a tiež DnaA a Rep₂₀ proteínu.



Obr.3 Štúdium interakcie proteínov Hu a DnaA pomocou bakteriálneho dvojhybridného systému v bunkách BTH101 na LB médiu s X-GAL (40 μ g/ml), IPTG (0,5 mmol.l⁻¹), ampilín (50 μ g/ml), kanamycín (50 μ g/ml)

Tiež sme *dnaA* gén klonovali do vektoru pBAD-GFPuv, aby sme vytvorili hybridný proteín DnaA-GFPuv. Tento fluorescenčne značený proteín využijeme v pull down assay a následnom western blottingu na vizualizáciu proteínov na membráne.

V ďalšej práci chceme optimalizovať podmienky exprese a purifikácie cieľového proteínu, overiť schopnosť interakcie DnaA proteínu s Ihf α , Ihf β a s DnaB. Tieto chceme sledovať *in vivo* pomocou dvojhybridného systému a takisto *in vitro* pomocou pull down assay a následného western blottingu. Takisto chceme overiť možnosť interakcie proteínu z octových baktérií s proteínom izolovaným z buniek *E. coli*.

Záver

V tejto práci sa nám podarilo pripraviť vektory pET28a+/DnaA a pET30a+/DnaA. Hybridné proteíny sme nadprodukovali a purifikovali. Overili sme schopnosť DnaA proteínu interagovať s Hu proteínom a takisto s plazmidovým replikačným proteínom Rep₂₀ využitím dvojhybridného systému BACTH system kit. Pripravili sme konštrukt pBAD-GFPuv/DnaA, ktorý využijeme v pull down assay.

Pod'akovanie

Uvedená práca bola vypracovaná v laboratóriu doc. RNDr. Jozefa Gronesa CSc., ktorému patrí aj moje poďakovanie za všestrannú pomoc.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Azuma, Y., Hosoyama, A., et al. (2009) Nucl. Acids Res. 37(17), p.5768
- [2] Iyer L.M., Leipe, D. D., Koonin, E. V., and Aravind, L. (2004) J. Struct. Biol. 2004, 146(1-2) p. 11
- [3] Del Solar, G. H., Giraldo, R., Ruiz-Echeverria, M. J., Espinosa, M. and Diaz-orejas, R. (1998) Microbio. and Mol. Bio. Rev. 62(2), p. 434
- [4] Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY,p. 6.36
- [5] Bugala J. (2012) Štúdium DnaA proteínu bunkách *Acetobacter pasteurianus* 3610 (Diplomová práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p. 37

Zmeny dennej aktivity u druhu *Romanogobio vladykovi* (Fang, 1943) na riekach východného Slovenska (predbežné výsledky)

Oldrich Černý¹, Ján Horváth¹, Ján Koščo²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra ekológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko; oldo.cerny@gmail.com

²Prešovská univerzita, Fakulta humanitných a prírodných vied, Katedra ekológie, Ul. 17 novembra 1, 081 16 Prešov, Slovensko

Abstrakt

Fish species assemblages and fish diel dynamics of Bodrog, Latorica and Tisa rivers are presented here. Small beach seine net (5x2 m; 6 mm of mesh size) operated on shallow riparian areas (beaches) was used for fish sampling. Changes in the distribution of *Romanogobio vladykovi* and its abundance during day between offshore and shallow inshore microhabitats were documented. In this case, two peaks of beach activity were observed during dusk and dawn. To assess the fish motivation for the use of shallow riparian areas length measurements were made. During the day there were bigger individuals present in the inshore microhabitats but with lower abundance. During the night the abundance rapidly increased but the length of individuals reduce.

Kľúčové slová: denná aktivita; *Romanogobio vladykovi*; dĺžka; záťahová sieť

Úvod a formulácia cieľa

Ryby sú mobilnou zložkou vodných ekosystémov a teda ich distribúcia na nížinných tokoch medzi príbrežnými habitatmi a voľnou vodou je výrazne závislá na dennej dobe. Druhovú zložku plytkých príbrežných zón sa mení medzi dňom a nocou, pričom rôzne druhy reagujú na zmeny intenzity osvetlenia odlišne. V prípade lentických biotopov sú tieto migrácie pomerne dobre preskúmané [1]. Vplyv dennej doby na aktivitu a veľkostnú štruktúru prítomných druhov je málo známy. Na overenie predpokladu, že aktivita a dĺžka rýb je v rôznej dennej dobe odlišná sme použili údaje o jednom z dominantných druhov rýb (*Romanogobio vladykovi*), ktoré sa vyskytovali v plytkých príbrežných zónach riek. O *Romanogobio vladykovi* sa predpokladá, že je to druh s výraznou nočnou aktivitou a obýva najmä piesčité dno nížinných tokov.

Materiál a metódy

Modelové lokality sú všetko plytké príbrežné biotopy. Na výskum sme vybrali lokality na riekach Bodrog, Latorica a Tisa. Lokalita na rieke Bodrog je neďaleko obce Zemplín. Pláž a substrát je tvorený piesčito-hlinitými naplaveninami. Lokalita na rieke Latorica sa nachádza pri obci Kamenná Moľva. Tu tak isto ako na rieke Bodrog pláž aj

substrát tvoria piesčito-hlinité naplaveniny. Na rieke Tisa sa lokalita nachádza pri obci Malé Trakany a pláž a substrát tvoria piesčité naplaveniny.

Údaje sme zbierali v roku 2012 v letnom období (august). Na zber sme použili malú záťahovú sieť (2x5m, 6 mm veľkosť očiek), na úseku dĺžky 100 m po prúde rieky, každé dve hodiny počas 24 - hodinového cyklu. Ulovené ryby sme určili na mieste do druhu, zmerali a následne vypustili po prúde pod oblasťou výlovu. Ryby sme určili podľa Kottelata a Freyhoffa [2] a dĺžku rýb sme určili ako dĺžku od špičky hlavy po poslednú šupinu násadca chvostovej plutvy (štandardná dĺžka).

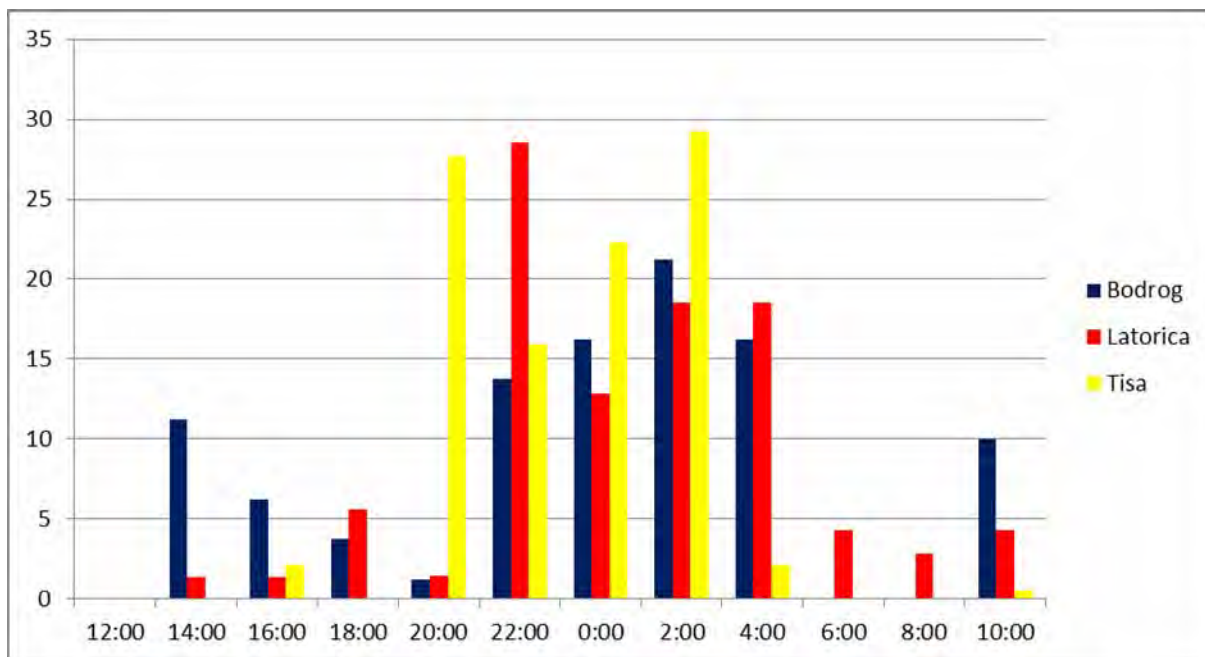
Na štatistické vyhodnotenie dát sme použili Kruskal – Wallisov (K-W) test a Mann-Whitney (M-W) párové porovnanie v programe PAST [3]. Vizuálne sme rozdiely zobrazili box plotmi. Zmeny v početnosti sme vyjadrili percentuálne a zobrazili v graficky v programe Excel.

Výsledky a diskusia

Na základe získaných údajov a ich vyhodnotení početnosti v jednotlivých záťahoch (obr. 1) môžeme vidieť rozdiely v dennej aktivite (na základe početnosti). Tieto rozdiely boli tak isto zaznamenané aj na riekach Morava a Váh [4] a k zhodným záverom a podobným výsledkom dospeli Wolter a Freyhof [5] na rieke Odra, kde zistili, že tento typický bentický druh je cez deň prítomný najmä v strede toku rieky a v litorálnej zóne sa zdržuje najmä v noci. Výrazné sú aj dva vrcholy aktivity u *Romanogobio vladykovi*, pričom prvý vrchol aktivity nastáva krátko po západe slnka v čase okolo 22:00 hodiny, následne dochádza k poklesu početnosti a chvíľu pred východom slnka (v rozmedzí od 2:00 do 4:00 hodiny) opäť stúpne, čo predstavuje druhý vrchol aktivity. Výnimku v tomto správaní sme pozorovali len na rieke Bodrog, kde počas celej noci stúpala početnosť a klesať začala až v čase východu slnka. Vysoké hodnoty početnosti *Romanogobio vladykovi* počas celej noci zistil aj Copp a Jurajda na rieke Morava [6]. Tieto dva vrcholy môžu súvisieť aj so všeobecným správaním väčšiny cyprinidov, ktoré dosahujú maximálnu aktivitu počas východu a západu slnka [7].

Pri analýze dĺžkovej štruktúry sme zistili, že počas dňa sa v príbrežnej zóne vyskytujú najmä väčšie jedince (obr. 2). Mann – Whitneyho test (tab. 1-3) tieto rozdiely potvrdil na rieke Bodrog ($p < 0,01$) a Tisa ($p < 0,05$). Najvýraznejšie sú rozdiely na rieke Bodrog, kde sa dĺžky jedincov tohto druhu výrazne líšia od dĺžky jedincov o 16:00. K opačným záverom dospel Kubečka a Duncan [8] na rieke Temža. Využitím hydroakustických metód sledovali najmä zmenu biomasy a dĺžku jedincov v litoráli a strede prúdu počas dňa. Vysoké hodnoty

biomasy v noci indikovali v pobrežných habitatoch väčšie jedince [9]. Príslušný druh rýb sa však hydroakustickým prístrojom nedal v tom čase určiť. Ďalšími pozorovaniami sa zistilo, že hlavnými druhmi určujúcimi zmenu biomasy a denných a nočných druhov je *Romanogobio vladykovi* a *Abramis bjoerkna* [8].



Obr. 1 Zmeny v početnosti počas dňa na riekach Bodrog, Latorica a Tisa

Tab. 1 M-W párové porovnanie rozdielov dĺžky počas dňa na rieke Bodrog (K-W test, $p < 0,01$)

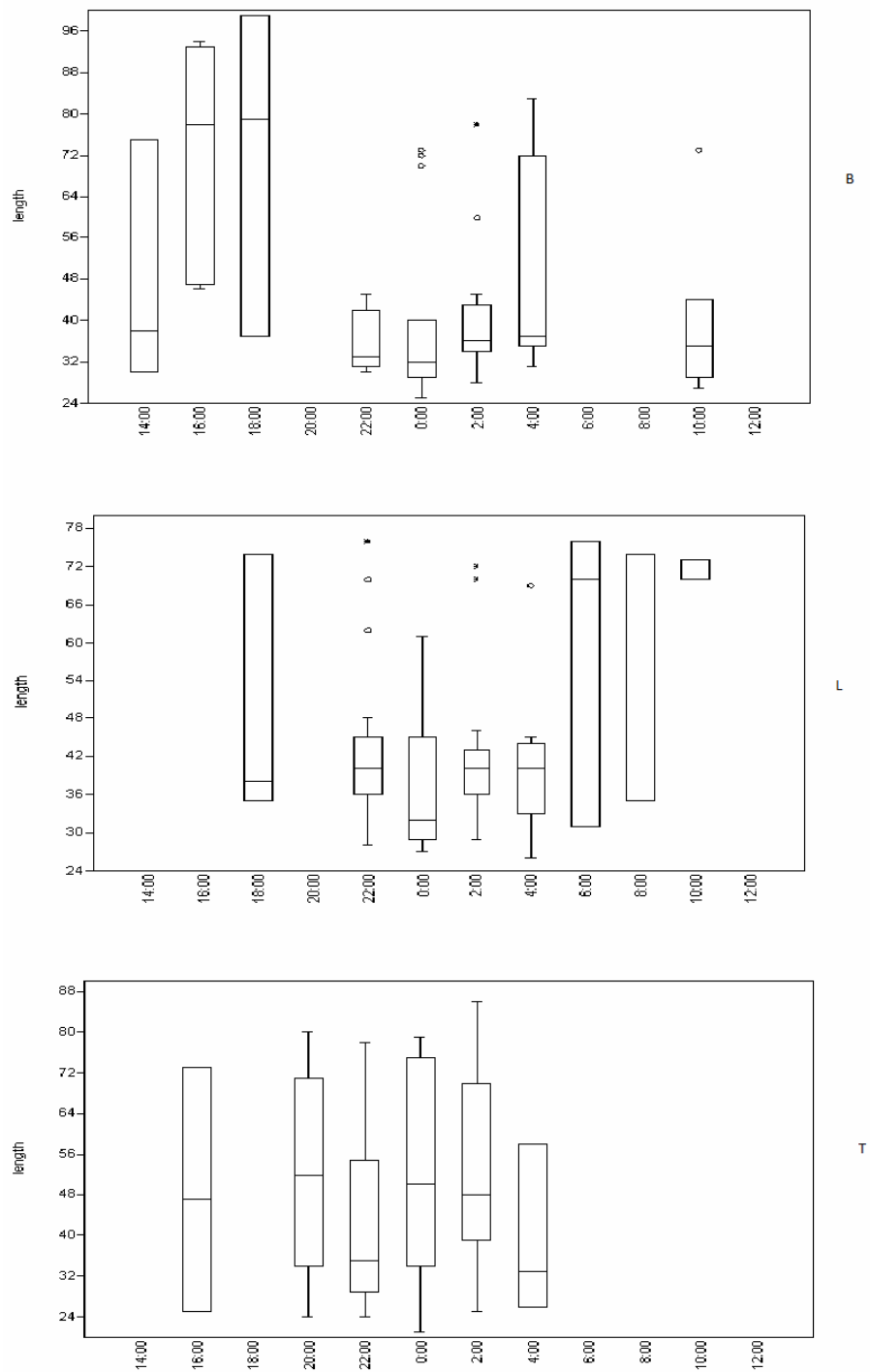
0	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	0:00	2:00	4:00	6:00	8:00	10:00	12:00
14:00	0	< 0,05	0,138	0,484	0,321	0,203	0,608	0,616	0,311	0,161	0,311	0,161
16:00	1	0	1	0,242	< 0,01	< 0,05	< 0,01	< 0,05	< 0,05	0,242	< 0,05	0,242
18:00	1	1	0	0,371	0,051	0,059	0,056	0,137	0,082	0,371	0,082	0,371
20:00	1	1	1	0	1	1	0,497	0,262	0,696	1	0,696	1
22:00	1	0,145	1	1	0	0,601	0,278	< 0,05	0,836	0,146	0,836	0,146
0:00	1	0,680	1	1	1	0	0,276	0,057	0,689	0,136	0,689	0,136
2:00	1	0,214	1	1	1	1	0	0,172	0,682	0,122	0,682	0,122
4:00	1	1	1	1	1	1	1	0	0,146	0,135	0,146	0,135
6:00	1	0,680	1	1	1	1	1	1	0	0,173	0,958	0,173
8:00	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0,173	1
10:00	1	0,680	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0,173
12:00	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

Tab. 2 M–W párové porovnanie rozdielov dĺžky počas dňa na rieke Latorica
(K-W test, $p = 0,172$)

	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	0:00	2:00	4:00	6:00	8:00	10:00	12:00
14:00		1	1	1	0,508	0,600	0,709	1	1	0,540	0,346	1
16:00	1		1	1	0,508	0,600	0,709	1	1	0,540	0,346	1
18:00	1	1		1	0,642	0,089	0,650	0,281	0,860	0,812	0,373	0,289
20:00	1	1	1		0,508	0,600	0,709	1	1	0,540	0,346	1
22:00	1	1	1	1		0,053	0,926	0,530	0,410	0,775	< 0,05	0,116
0:00	1	1	1	1	1		0,116	0,462	0,165	0,289	< 0,05	0,164
2:00	1	1	1	1	1	1		0,538	0,381	0,799	< 0,05	0,136
4:00	1	1	1	1	1	1	1		0,225	0,443	< 0,05	0,136
6:00	1	1	1	1	1	1	1	1		0,773	1	0,371
8:00	1	1	1	1	1	1	1	1	1		0,767	0,540
10:00	1	1	1	1	1	1	1	0,687	1	1		0,346
12:00	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

Tab. 3 M-W párové porovnanie rozdielov dĺžky počas dňa na rieke Tisa
(K-W test, $p < 0,05$)

0	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	0:00	2:00	4:00	6:00	8:00	10:00	12:00
14:00	0	0,289	1	0,095	0,105	0,098	0,094	0,289	1	1	1	1
16:00	1	0	0,289	0,714	0,630	0,785	0,952	0,885	0,289	0,289	0,724	0,289
18:00	1	1	0	0,095	0,105	0,098	0,094	0,289	1	1	1	1
20:00	1	1	1	0	< 0,05	0,915	0,426	0,504	0,095	0,095	0,974	0,095
22:00	1	1	1	1	0	< 0,05	< 0,05	0,936	0,105	0,105	0,467	0,105
0:00	1	1	1	1	1	0	0,757	0,349	0,098	0,098	0,968	0,098
2:00	1	1	1	1	1	1	0	0,433	0,094	0,094	0,757	0,094
4:00	1	1	1	1	1	1	1	0	0,289	0,289	0,724	0,289
6:00	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
8:00	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
10:00	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
12:00	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0



Obr. 2 Analýza dĺžkovej štruktúry *Romanogobio vladkovi* na riekach Bodrog (B), Latorica (L) a Tisa (T)

Záver

Dodnes nie sú úplne známe dôvody dennej dynamiky rýb, ale Wolter a Freyhof [7] zhrnuli pravdepodobné dôvody dennej dynamiky rýb v jazerách a riekach a sú vysvetľované:

1. environmentálnym gradientom, napr. obsahom rozpusteného kyslíka, [7, 8], teplotou vody [10], alebo rýchlosťou prúdenia [11];
2. potravnou aktivitou [11, 12, 13];
3. prítomnosťou predátorov [12]

Poznatky o dennej dynamike rýb na veľkých riekach poskytujú oveľa komplexnejšie údaje o ichthyofaune nížinného toku a mali by byť inkorporované v monitoringu ichthyofauny týchto tokov, pretože druhy obývajúce voľnú vodu sú dôležité indikátory ekologického stavu toku. Pre markantnú rozdielnosť vo výsledkoch a dennej aktivite *Romangobio vladykovi* budú nutné ďalšie pozorovania.

Pod'akovanie

Práca bola vypracovaná na základe podpory projektu VEGA 2/0080/11.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Pierce C. L., Corcoran A. M., Gronbach A. M. et al. (2001) *American Journal of Fisheries Management* 21(4), p. 918
- [2] Kottelat M., Freyhof J. (2007) *Handbook of European freshwater fishes*. Publications Kottelat, Cornol Switzerland, p. 1
- [3] Hammer Ř., Harper D. A. T., Ryan P. D. (2001) *Palaeontologia Electronica* 4(1), p. 9
- [4] Horváth J. (2012) Denná dynamika rýb v príbrežných zónach modelových nížinných tokov počas 24-hodinového cyklu. (Diplomová práca) *Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava*, p. 57
- [5] Wolter C., Freyhof J. (2004) *Journal of Fish Biology* 54(3), p. 632
- [6] Copp G., Jurajda P. (1999) *Aquatic Sciences* 61, p. 76
- [7] Baras E. (1996) *Underwater Biotelemetry*, Liège: University of Liège, Belgium, p. 51
- [8] Kubecka J., Duncan A. (1998) *Fish. Res.* 35 (1-2), p. 55
- [9] Kubecka J., Duncan A. (1998) *Fish. Res.* 35 (1-2), p. 115
- [10] Freyhof J. (1998) *Strukturierende Faktoren für die Fischgemeinschaft der Sieg*, Uni Bonn, Bonn, p. 164
- [11] Bischoff A., Scholten M. (1996) *Folia Zoologica* 45 (1), p. 13
- [12] Helfman G. S. (1993) *Behaviour of Teleost Fishes*, Springer, London, p. 479
- [13] Garner P. (1996) *Ecology of Freshwater Fish* 5, p. 175

Optimalizácia metód pre transgenézu priadky morušovej, *Bombyx mori*

Iveta Červenková^{1,2}, Ivana Daubnerová¹, Dušan Žitňan¹, Daniel Čižmár¹

¹*Slovenská akadémia vied, Ústav zoológie, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovenská republika; Ivet.cervenkova@gmail.com*

²*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, 842 15 Bratislava, Slovenská republika*

Abstrakt

Methods have been developed for germ-line transformation in the domesticated silkworm *Bombyx mori* using the transposons *piggyBac* and *Minos*, although the transformation efficiency is relatively low. We aim to establish a site specific recombination system for production of transgenic silkworms. Based on *Drosophila* transgenesis, we presume much higher efficiency of silkworm transformation in comparison with the *piggyBac* transposon. We recently prepared a transgenic silkworm strain containing attP site recognized by ϕ C31 integrase. This target strain will be used for ϕ C31 integrase-mediated recombination of the other construct with transgene and attB site resulting in integration of a transgene into a silkworm genome. To further improve efficiency of silkworm transgenesis, we identified several promoter regions of the cuticular gene *BmCPR3* that drives strong and specific expression of a marker protein in the silkworm epidermis. EGFP fluorescence on the entire silkworm surface will greatly improve screening of transgenic silkworms compared with 3xP3 driven marker expression in the eyes.

Key words: *Bombyx mori*; *piggyBac*; bakulovírusy; ϕ C31 integráza; *BmCPR3*; LCP18; LCP30

Úvod a formulácia cieľa

Metódy prenosu génov a genetickej manipulácie organizmov predstavujú významný nástroj na štúdium funkcie génov a objasnenie molekulárnej podstaty mnohých bunkových, fyziologických, vývinových i evolučných procesov. Priadka morušová (*Bombyx mori*) je vďaka dostupnosti kompletnej genómovej sekvencie [1] a značnej veľkosti tela ideálnym nedrozofilým modelovým organizmom v biológii hmyzu. Úspešná stabilná transformácia *B. mori* pomocou *piggyBac* transpozónu [2], ako aj prenos a expresia vnášaných génov prostredníctvom rekombinantných vírusov [3], priniesli možnosť aplikácie účinných metód funkčnej genetiky, ako je napríklad cielená expresia transgénu, inzerčná mutagenéza, RNAi a iné.

Efektívna príprava transgénnych jedincov závisí aj od použitia zreteľných markerov, viditeľných vo všetkých postembryonálnych vývinových štádiách. Najpoužívanejším markerom v súčasnosti je fluorescenčný EGFP proteín, ktorý sa pod kontrolou 3xP3 promótoru exprimuje špecificky v očiach *B. mori* [4]. Identifikácia transgénnych jedincov s použitím tohto promótoru však vyžaduje časovo náročný skrining. Cieľom tejto práce je prispieť k rozvoju transgénnych metód používaných u priadky morušovej a to prípravou molekulárneho markera, ktorý by uľahčil selekciu transgénnych jedincov. Ďalej chceme

zvýšiť účinnosť prípravy stabilných transgénnych línií *B. mori* a to aplikáciou systému miestne špecifickej rekombinácie. Metóda, ktorá je dnes rutinnou záležitosťou u *D. melanogaster*, priniesla výrazne vyššiu účinnosť transformácie v porovnaní s transpozónovým *P* elementom [5].

Materiál a metódy

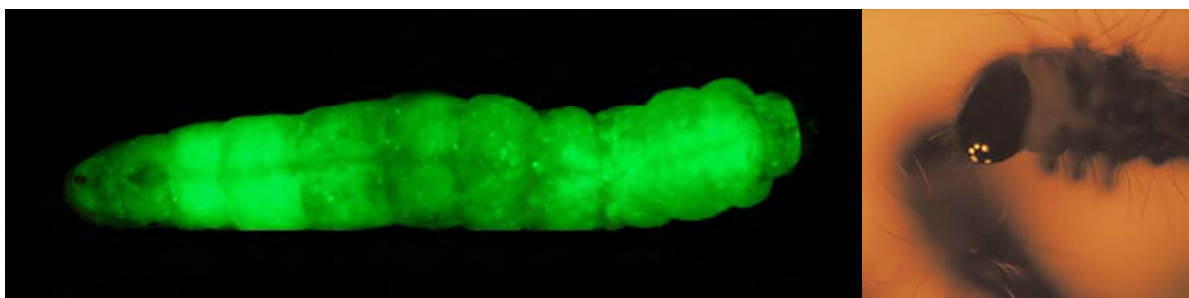
Na identifikáciu funkčných promótorov kutikulových génov bol použitý systém Bac-to-Bac® (Invitrogen). Sekvencia potenciálneho promótora spolu s *egfp* génom bola pomocou tohto systému vložená do genómu bakulovírusu. Rekombinantný vírus sa počas infekcie šíri v tkanivách *B. mori* a k expresii EGFP proteínu dochádza špecificky len v tých tkanivách, kde je testovaný promótor prirodzene aktívny.

Stabilné transgénne línie *B. mori* boli pripravené pomocou *piggyBac* transpozomálneho systému, ktorý pozostáva z dvoch plazmidových DNA. Jeden plazmid nesie cieľový gén obklopený terminálnymi repetíciami *piggyBac* transpozónu a druhý kóduje transpozázu. Plazmidové DNA sú napichávané do embryí *B. mori* do oblasti, kde sa formujú budúce zárodočné bunky. Enzým transpozáza sprostredkuje premiestnenie transgénu z donorového plazmidu do genómu budúcich gamét a po ich oplodnení je cudzorodá DNA prenesená do nasledujúcej generácie. Transgénne jedince v F1 generácii boli selektované na základe vneseného markera [2].

Výsledky a diskusia

Za účelom prípravy molekulárneho markera pre transgenézu *B. mori* sme si vybrali niekoľko kutikulových génov s cieľom identifikovať ich funkčnú promótorovú oblasť, ktorú by sme ďalej použili pre riadenie expresie fluorescenčného EGFP proteínu v epidermis transgénnych línií *B. mori*. Prítomnosť zeleného fluorescenčného proteínu na povrchu tela by výrazne uľahčila a zefektívnila rozlišovanie transgénnych a normálnych lariev v porovnaní so súčasným markerom, ktorý sa exprimuje v očiach *B. mori* [4]. Ideálny marker by mal byť tiež detegovateľný počas všetkých vývinových štádií. Na základe DNA microarray expresného profilu v epidermis *B. mori* [6] sme si preto zvolili gény *CPR3*, *LCP18* a *LCP30*, ktoré sú vo vysokej miere exprimované v larválnych štádiách. Pomocou systému Bac-to-Bac® (Invitrogen) sme pripravili rekombinantné bakulovírusové DNA so sekvenciou pre EGFP, umiestnenou za *upstream* oblasti vybraných kutikulových génov. Aby sme zvýšili pravdepodobnosť úspešnej identifikácie funkčných regulačných elementov, súčasne sme testovali dlhšiu aj kratšiu verziu každého promótora. Na overenie funkčnosti potenciálnych

promótorov sme pripravenými rekombinantnými bakulovírusmi infikovali húsenice *B. mori*. Ako sa vírus šíri v larvách *B. mori*, dochádza k expresii EGFP proteínu špecificky v tých tkanivách, kde je promótor prirodzene aktívny. V prípade BmCPR3p-EGFP sme fluorescenciu detegovali len v epidermálnych bunkách (Obr.1), pričom expresia proteínu bola rovnaká v prípade použitia oboch verzií promótorových fragmentov. Naopak pod kontrolou oboch verzií LCP18 promótoru sme expresiu EGFP zaznamenali nielen v epidermis, ale aj v ďalších tkanivách. Z toho dôvodu sme vylúčili možnosť využitia LCP18p pri príprave markera pre *piggyBac* vektor. Pri použití promótoru posledného testovaného génu *LCP30* sa EGFP exprimoval špecificky len v epidermis, ale jeho fluorescencia bola výrazne slabšia v porovnaní s LCP18p a BmCPR3p. Podobne ako v prípade LCP18p bola expresia EGFP proteínu slabšia pod kontrolou dlhšieho promótorového fragmentu, čo môže byť spôsobené prítomnosťou silencerových sekvencií v tejto oblasti. Rozhodli sme sa preto ďalej pracovať s kratšou, 1500 bp promótorovou sekvenciou kutikulového génu *CPR3*.



Obr. 1 Porovnanie expresie potenciálneho markera CPR3p-EGFP pre transgenézu *B. mori* so súčasným 3xP3-EGFP markerom. Na obrázku vľavo je znázornená expresia EGFP proteínu v kutikule lariev *B. mori* infikovaných rekombinantným bakulovírusom, ktorý vo svojom genóme nesie expresnú kazetu CPR3-EGFP. Možnosť použitia takéhoto markera pre transgenézu *B. mori* dodatočne overíme aj prípravou stabilnej transgéennej línie s CPR3-EGFP sekvenciou. Na obrázku vpravo je znázornená expresia DsRed proteínu pod kontrolou 3xP3 promótoru, ktorý sa v súčasnosti využíva pri príprave stabilných transgénnych línií *B. mori* [8]. 3xP3 promótor riadi expresiu markerového proteínu špecificky v očiach *B. mori*, čo vyžaduje časovo náročné rozlišovanie transgénnych a normálnych lariev

Keďže v súčasnosti používaný 3xP3 promótor je veľký približne 200 bp, testovali sme tiež funkčnosť kratších verzií promótoru CPR3, aby nedošlo k zníženiu účinnosti transformácie pri napichávaní *piggyBac* vektora do embryí *B. mori*. Všetky tri testované verzie CPR3p (208 bp, 532 bp a 823 bp) sa ukázali byť postačujúce pre riadenie silnej a špecifickej expresie EGFP proteínu v epidermis lariev *B. mori*. Keďže bakulovírusový expresný systém nemusí objektívne odrážať aktivitu kutikulového promótoru *in vivo*, je tiež potrebné pripraviť stabilnú transgénnu líniu CPR3p-EGFP. Tým by sme jednoznačne potvrdili expresný profil CPR3p-EGFP markera a možnosť jeho použitia pre transgenézu *B. mori*.

Expresnú kazetu CPR3-200p-EGFP sme inžerovali do *piggyBac* vektora, ktorý sme napichávali do vajíčok *B. mori* za účelom prípravy stabilnej transgéennej línie. Transgéenne jedince v F1 generácii by malo byť možné selektovať na prítomnosť fluorescenčného EGFP proteínu v epidermis. Ak sa nám prostredníctvom transgéennej línie CPR3-200p-EGFP podarí dokázať funkčnosť takéhoto markera pre stabilnú transgenézu *B. mori*, budeme môcť pripraviť *piggyBac* vektor s najkratším, 208 bp fragmentom CPR3 promótoru, v kombinácii s génom pre niektorý z fluorescenčných proteínov.

Cieľom tejto práce je tiež zvýšiť účinnosť prípravy stabilných transgéenných línií *B. mori* a to použitím systému miestne špecifickej rekombinácie. Na rozdiel od transpozónových vektorov, ktoré sprostredkujú prenos a integráciu cieľového génu do náhodnej genómovej pozície, systém miestne špecifickej rekombinácie umožňuje vnášať gény do špecifickej pozície v rámci genómu, a tak predísť nežiaducej dizrupcii endogénnych génov. Stratégia využíva miestne špecifické rekombinázy, ktoré katalyzujú *crossing-over* medzi dvoma špecifickými sekvenciami. Tento systém bol úspešne použitý na integráciu transgénu do bunkových línií *B. mori* [7] a neskôr bola dokázaná aktivita rekombináz ako napr. flipázy a Cre rekombinázy aj v húseniciach *B. mori* [8,9].

V tejto práci sa nám pomocou *piggyBac* transpozomálneho vektora podarilo pripraviť stabilnú transgéennú líniu *B. mori*, ktorá vo svojom genóme nesie cieľovú sekvenciu ϕ C31 integrázy. - attP. Ďalej sme pripravili konštrukt, ktorý obsahuje druhú cieľovú sekvenciu – attB, spolu s markerom pre *B. mori* 3xP3-EGFP. Takto pripravený konštrukt budeme napichávať do vajíčok nami pripravenej homozygotnej attP transgéennej línie spolu s helper plazmidom, kódujúcim ϕ C31 integrázu. Integráza sprostredkuje miestne špecifickú rekombináciu medzi attP a attB sekvenciami, čím dôjde k integrácii konštraktu do genómu *B. mori* v attP mieste. Posledným krokom bude porovnanie účinnosti prípravy transgéenných jedincov použitím systému miestne špecifickej rekombinácie oproti *piggyBac* transpozónovým vektorom. Aplikáciou systému miestne špecifickej rekombinácie prostredníctvom ϕ C31 integrázy sa u *D. melanogaster* podarilo zvýšiť účinnosť prípravy transgéenných jedincov až na 50% [5]. Vyššia efektivita ϕ C31 integrázy z bakteriofága ϕ C31 oproti iným rekombinázam je pravdepodobne spôsobená tým, že sprostredkuje rekombináciu medzi dvoma odlišnými sekvenciami attP a attB. Tým dôjde k vzniku hybridných sekvencií attL a attR, ktoré už nie sú rozpoznávané ϕ C31 integrázou. Bez prítomnosti ďalších fágových faktorov je rekombinácia jednosmerný proces, čo zabezpečuje stabilnú integráciu cieľového génu v genóme recipienta. Iné systémy, využívajúce Cre rekombinázu z P1 bakteriofága alebo kvasinkovú flipázu, katalyzujú rekombináciu medzi identickými sekvenciami *loxP* resp. *FRT*.

Značnou nevýhodou je, že tento proces je reverzibilný, čo môže viesť k opätovnej k excízii vnášaného génu a teda aj nižšej účinnosti prípravy transgénnych línií [10]. Na základe predchádzajúcich štúdií, ktorými bola dokázaná aktivita ϕ C31 integrázy v bunkách aj embryách *B. mori* [7,11], predpokladáme možnosť použitia systému miestne špecifickej rekombinácie aj na prípravu stabilných transgénnych línií *B. mori*.

Záver

Priadka morušová je vďaka dostupnosti genómovej sekvencie, rozvinutým transgénym metódam a značnej veľkosti tela populárnym modelovým organizmom v biológii hmyzu. Touto prácou chceme prispieť k rozvoju transgénnych metód používaných u *B. mori* a to prípravou molekulárneho markera, ktorý by zefektívnil časovo náročný skrining transgénnych lariev a tiež zvýšiť účinnosť prípravy stabilných transgénnych línií pomocou systému miestne špecifickej rekombinácie.

Doteraz sa nám podarilo identifikovať promótorové oblasti kutikulových génov *CPR3*, *LCP18* a *LCP30*. Ďalej sme sa rozhodli otestovať možnosť použitia CPR3p-EGFP ako markera pre transgenézu *B. mori*. *PiggyBac* vektor s expresnou kazetou CPR3-200p-EGFP sme napichávali do embryí *B. mori* za účelom získania stabilnej transgéennej línie. Transgéenne jedince by mali byť ľahko rozlíšiteľné na základe prítomnosti EGFP na povrchu tela, čo by výrazne urýchlilo selekciu transgénnych jedincov v porovnaní so súčasným markerom, exprimovaným v očiach *B. mori*.

Ďalej sa sme pripravili transgéennu líniu *B. mori* s cieľovou sekvenciou ϕ C31 integrázy (attP), ktorú použijeme ako recipientnú líniu pre napichávanie zhotoveného konštruktú s druhou rozpoznávanou sekvenciou (attB). Integráza z helper plazmidu by mala sprostredkovať inkorporáciu konštruktú do genómu *B. mori* v mieste attP. V poslednom kroku porovnáme účinnosť prípravy stabilných transgénnych línií *B. mori* miestne špecifickou rekombináciou oproti súčasnému *piggyBac* vektorovému systému.

Týmto spôsobom by sme chceli zefektívniť transgéenne metódy, používané u priadky morušovej, a tak uľahčiť štúdium regulácie vývinu, ako aj ďalších fyziologických a behaviorálnych procesov.

Práca bola podporená grantmi NIH USA GM67310, APVV 51039105 a VEGA 2/0132/09.

PodĎakovanie

Moje podĎakovanie patrí všetkým, ktorý sa nejakým spôsobom podielali na vzniku tejto práce. Predovšetkým Mgr. Ivane Daubnerovej, Mgr. Danielovi Čižmárovi a RNDr.

Dušanovi Žitňanovi, DrSc. za vedenie a konštruktívne pripomienky a mojej rodine a priateľom za sústavnú podporu.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Mita K., Kasahara M., Sasaki S., et al. (2004) DNA Research. 11, p. 27
- [2] Tamura T., Thibert C., Royer C., et al. (2000) Nat. Biotechnol. 18, p. 81
- [3] Iatrou K., Meidinger R. G. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, p. 3650
- [4] Thomas J. L., Da Rocha M., Besse A., et al. (2002). Insect Biochem. Mol. Biol. 32, p. 247
- [5] Groth A. C., Fish M., Nusse R., et al. (2004) Genetics. 166, p. 1775
- [6] Liang J., Zhang L., Xiang Z., et al. (2010) BMC genomics. 11, p. 173
- [7] Nakayama G., Kawaguchi Y., Koga K., et al. (2005) Molecular Genetics and Genomics. 275, p. 1
- [8] Long D., Zhao A., Chen X., et al. (2012). PLoS One. 7, p. 1932
- [9] Duan J., Hanfu X., Sanyuan M., et al. (2012). Transgenic Res. DOI 10.1007/s11248-012-9677-0.
- [10] Wimmer E. A. (2005). Nature Methods. 2, p. 580
- [11] Yonemura N., Tamura T., Uchino K., et al. (2012). Molecular Genetics and Genomics. 287(9), p. 731

A preliminary study on diversity and ecology of soil diatoms in urban habitats

Barbora Chattová, Bohuslav Uher

Masaryk University, Faculty of Science, Department of Botany & Zoology, Kotlarska 2, 61137 Brno, Czech Republic, email: bacha@email.cz

Abstract

This paper presents a floristic part of an ecological study of soil diatoms from urban habitats, which is conducted at the Department of Botany & Zoology of the Masaryk University under a project “Biodiversity of Central and Southern European cities: a comparative study of vascular plants, algae, cyanobacteria and molluscs“. So far 111 diatom species were identified from 84 soil samples from different urban habitats. The most frequently occurred diatom genera are Pinnularia, Hantzschia and Luticola. The cultivation on Petri dishes containing BBM medium repetitively revealed a presence of a high number of Cocconeis and Fragilaria taxa, which have been so far noted only from aquatic habitats.

Key words: *Diatoms, soil, urban habitats, species composition, cultivation.*

Introduction

Diatoms are characterized by an outer silica shell or frustule [1] that makes them easy to collect and preserve for further analysis. A large number of diatom taxa are able to survive in non-submerged or even dry habitats such as dry mosses and soils. So they are one of the most abundant algal groups in the terrestrial ecosystems. In his work on soil algae, Lund [2] defined the term 'soil diatoms' as “those growing on soil moistened solely by direct atmospheric precipitation”. In fact, together with bacteria and mould, they form a major part of the microbial biomass in soils. This study aims to enlarge our knowledge of the actual diatom communities that occur in the soils.

So far only a few studies of algae are published from urban habitats. Available papers on cyanobacteria and algae in urban environments have mainly focused on biodeterioration problems: Kapusta & Kováčik [3], Rindi et al. [4], Rindi & Guiry [5], Uher & Godyová [6], Uher & Kováčik [7], Uher [8] Uher et al. [9].

However, papers dealing with the actual soil diatom flora are scarce. Bunt [10] analysed the diatom composition in soils from Australian Macquarie Island, Škaloud [11] listed 23 diatom species in his study of aero-terrestrial algae and cyanobacteria of the Boreč Hill ventaroles and the highest number of diatom taxa listed Van de Vijver and Beyens [12] in a study on the soil diatom assemblages from the Ile de la Possession. They found 165

diatom taxa in 48 soil samples. The soil diatom flora remains poorly known and no studies have been conducted on soil diatoms in urban habitats.

Material and methods

Authors in available studies are using different sample designs, we used a standardized sampling protocol.

Sampling

Samples were collected in large cities (> 100,000 inhabitants) in different areas of Central Europe (at present time Antwerp, Hamburg, Linz, Salzburg, Bratislava, Praha, Ostrava, Brno, Krakow, Budapest, Ljubljana and Maribor). Plots were selected from aerial photographs before the fieldwork. The habitats included:

1. Historic centre with pre-18th century houses and paved or sealed area > 90%.
2. Boulevard built in 19th century with rows of trees, small lawns and paved or sealed area < 70%.
3. Residential area with family houses and private gardens, at least 30 years old.
4. Residential area with blocks of flats built in the 1960s-1980s, with scattered trees.
5. Unmanaged site on the periphery, abandoned for 5-15 years, dominated by herbaceous vegetation with scattered shrubs.
6. Recently disturbed site with predominant bare ground, vegetation cover < 20%.
7. City park with old deciduous trees (tree cover 20-50%) and regularly mown grassland.

Four soil samples were taken from each sampling site. After removing the vegetation cover the upper 3 cm of the soils were collected in 50 ml PVC bottles or plastic bags. 25 ml from each sample were fixed with 3% formalin and other 25 ml were preserved for further cultivation.

Slide preparation and counting

Diatom samples were prepared following the method of Van der Werff [13]. Small quantities of the samples were cleaned by adding 37% H₂O₂ and heated to 80°C for about 1h. The reaction was completed by addition of KMnO₄. Following digestion and centrifugation, the resulting clean material was diluted with distilled water to avoid excessive concentrations of diatom valves that may hinder reliable observations. Cleaned diatom valves were mounted in Pleurax or Naphrax®. Light microscope observations were conducted using a microscope Olympus IX71S8F-3.

Relative abundance counts were based on 400 valves counted in each slide. It sometimes proved difficult to obtain large counts with the soil material. Even after scanning entire slides, some samples yielded less than 300 valves. Considering the extreme environments involved, these numbers seemed acceptable [14].

Identifications were mainly based on Krammer & Lange-Bertalot [15, 16, 17, 18]

Cultivation

Cultivation is usually not used for diatoms, but in our case was necessary for exact identification of soil diatoms. Part of the field material was aseptically spread into test tubes and over the surface of Petri dishes containing BBM medium. The test tubes and Petri dishes were incubated in constant conditions at 20° C, cca. 60 % humidity, and 16:8 hours of light: dark.

Results and discussion

Species composition

A total of 111 taxa (including species, varieties and forms) were recorded from the first 84 samples, which is quite high for soil samples.

The genera that showed the highest species diversity were *Nitzschia* with 15 representatives, the second was *Navicula* with 10 members and the third was *Pinnularia* with 8 taxa.

The most abundant taxa were *Hantzschia amhioxys*, *Hantzschia abundans*, *Pinnularia borealis* and *Luticola mutica*.

The highest number of taxa (29) was recorded in a sample “HamPark”, taken in the city park of Hamburg. By contrast, only one taxa was identified in a soil sample “SalzKer” taken in a shrub in an abandoned site in Salzburg.

The mean number of taxa per sample is 9.

The most species diverse samples came from Hamburg and Antwerp, which are cities involved by the oceanic climate. On the contrary the species poorest samples are from Budapest and Krakow - cities with more continental climate.

Surprisingly a lot of so far believed “specifically aquatic diatoms” such as *Cocconeis pediculus*, *Cocconeis placentula* and *Fragilaria ulna* were reported from different soil samples. The presence of living cells in soils was proven also by the cultivation.

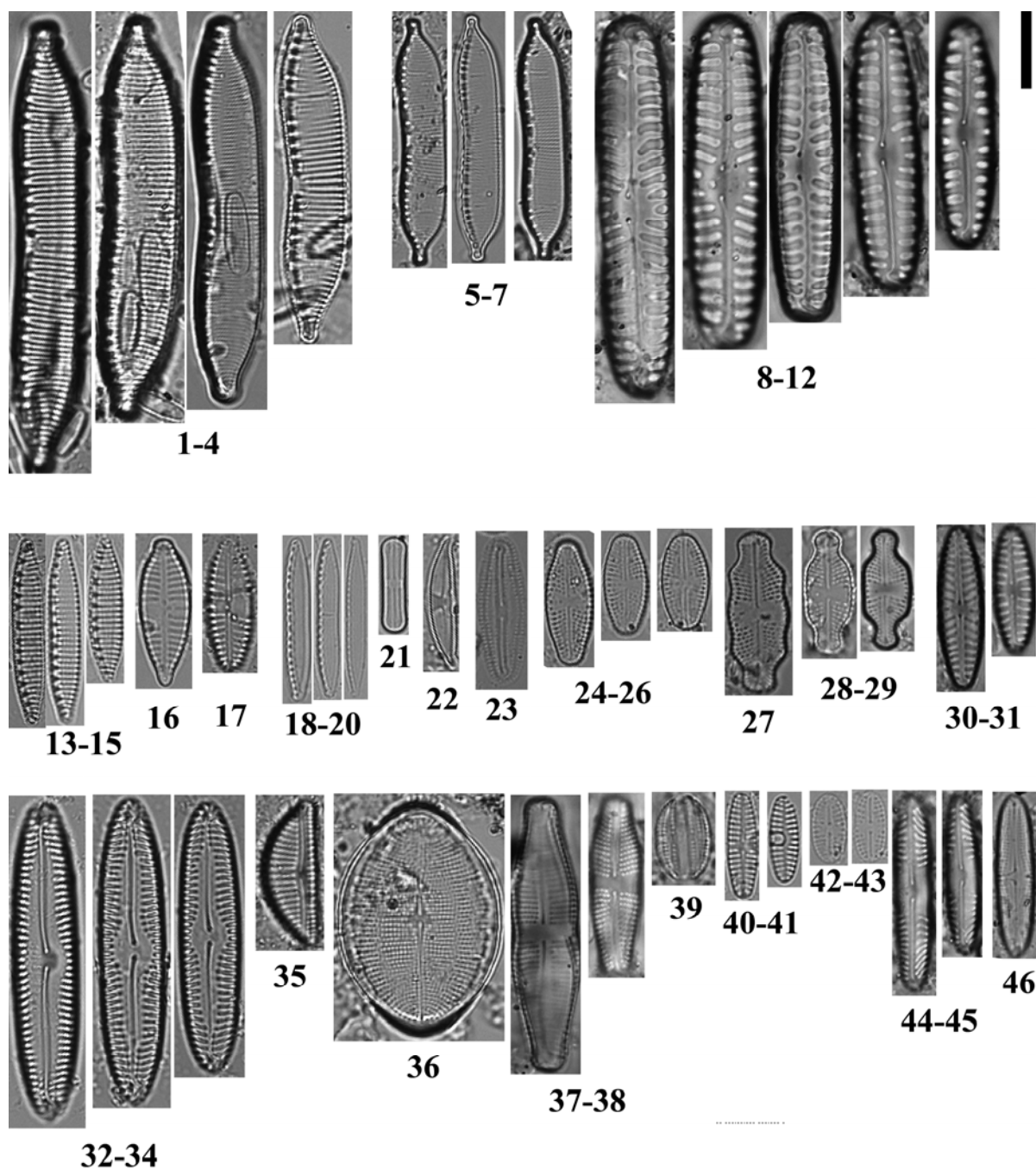


Fig. 1 The most abundant diatom species from soil samples in urban habitats: 1-4 *Hantzschia abundans*, 5-7 *Hantzschia amphioxys*, 8-12 *Pinnularia borealis*, 13-15 *Nitzschia amphibia*, 16 *Gomphonema parvulum*, 17 *Gomphonema tergestinum*, 18-20 *Nitzschia acidoclinata*, 21 *Diadesmis contenta*, 22 *Amphora montana*, 23 *Fallacia insociabilis*, 24-26 *Luticola mutica*, 27 *Luticola nivalis*, 28-29 *Luticola ventricosa*, 30-31 *Navicula cincta*, 32-34 *Pinnularia rupestris*, 35 *Encyonema silesiacum*, 36 *Cocconeis pediculus*, 37-38 *Achnanthes coarctata*, 39 *Amphora pediculus*, 40-41 *Planothidium frequentissimum*, 42-43 *Mayamaea atomus*, 44-45 *Pinnularia obscura*, 46 *Muelleria gibbula*. Scale bar 10 μm

Conclusion

A surprisingly diverse soil diatom flora was found in the soil samples from urban habitats, dominated by the genera *Pinnularia*, *Hantzschia* and *Luticola*.

The main parameter, which seems to be responsible for the species diversity is the moist oceanic climate. A modern elaborate study on soil diatom flora from urban habitats is extremely important and further research is necessary to understand all the conditions involving the soil diatom flora.

Acknowledgments

This survey was made possible with the logistic and financial support of the funding project of the Masaryk University No. MUNI/A/0757/2012.

References

- [1] Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. (1990) The diatoms. Cambridge University Press, Cambridge, UK, p. 32
- [2] Lund J.W.G. (1946) New Phytol. 45, p. 196
- [3] Kapusta M., Kováčik L. (2000) Bulletin SBS. 22, p. 15
- [4] Rindi F., Guiry, M.D., López-Bautista J.M. (2008) J. Phycol. 44, p. 1529
- [5] Rindi F., Guiry M.D. (2002) J. Phycol. 38, p. 39
- [6] Uher B., Godyová M. (2003) Študentská vedecká konferencia 2003, Zborník abstraktov prác diplomantov a doktorandov, Bratislava, SR, p.149
- [7] Uher B., Kováčik L. (2002) Fourth International Symposium on Biology and Taxonomy of Green Algae, Programme & Abstracts, Bratislava, SR, p. 87
- [8] Uher B. (2009) Fottea 9 (1), p. 81
- [9] Uher B., Aboal M., Kováčik L. (2004) Bulletin SBS. 10, p.77
- [10] Bunt J.S. (1954) Proc Linn Soc. 48, p. 34
- [11] Škaloud P. (2009) Fottea 9, p. 65
- [12] Van de Vijver B. & Beyens L., (1999) Eur. J. Soil Biol. 34 (3), p. 133
- [13] Van der Werff A. (1955) Verh. Int. Vereinigung Theor. Limnol. 12, p. 276
- [14] Beyens L. (1989) Polar Biol. 9, p. 423
- [15] Krammer K., Lange-Bertalot H. (1986) Bacillariophyceae 1. Teil, Naviculaceae. – In: Ettl H., Gerloff J., Heynig H. & Mollenhauer D. (ed.): Süßwasserflora von Mitteleuropa. 2 (1), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart & New York, DE, USA, p. 10

- [16] Krammer K. & Lange-Bertalot H (1988) Bacillariophyceae 2. Teil, Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. – In: Ettl H., Gerloff J., Heynig H. & Mollenhauer D. (ed.): Süßwasserflora von Mitteleuropa. 2 (1), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart & New York, DE, USA, p. 20
- [17] Krammer K. & Lange-Bertalot H. (1991) Bacillariophyceae 3. Teil, Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. In: Ettl H., Gerloff J., Heynig H. & Mollenhauer D. (ed.): Süßwasserflora von Mitteleuropa. 2 (1), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart & New York, DE, USA, p. 15
- [18] Krammer K. & Lange-Bertalot H. (1991) Bacillariophyceae 4. Teil, Achnantheaceae, Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema, In: Ettl H., Gerloff J., Heynig H. & Mollenhauer D.(ed.): Süßwasserflora von Mitteleuropa. 2 (1), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart & New York, DE, USA, p. 12

12 new species of the genus *Pinnularia* (Bacillariophyta) on Ile Amsterdam (TAAF, Southern Indian Ocean)

Barbora Chattová¹, Bart Van de Vijver², Ditmar Metzeltin³ & Marc Lebourvier⁴

¹Masaryk University, Faculty of Science, Department of Botany & Zoology, Kotlarska 2, 61137 Brno, Czech Republic, email: bacha@email.cz

²Domein van Bouchout, National Botanic Garden of Belgium, Department of Bryophyta and Thallophyta, B-1860 Meise, Belgium

³Am Stegskreuz 3b, D-65719 Hofheim, Germany

⁴Université de Rennes 1, UMR 6553 Ecobio CNRS, Station Biologique, F-35380 Paimpont, France

Abstract

The presented poster shows results of a taxonomic analysis of 250 samples from Ile Amsterdam (Southern Indian Ocean). The analysis resulted in the observation of 22 *Pinnularia* taxa (including species, varieties and forms). After a thorough morphological analysis, 12 taxa could not be identified using the currently available literature and were described as new taxa.

Key words: *Pinnularia*, Ile Amsterdam, diatoms, taxonomy, new species.

Introduction

Ile Amsterdam (77°34'E, 37°47'S), a young, small volcanic island situated in the southern Indian Ocean has a very isolated geographic position and is probably one of the remotest places in the world. The Ile Amsterdam belongs to the so-called sub-Antarctic region, bordered by the Antarctic Convergence in the south and the subtropical Convergence in the north. Together with the smaller Ile Saint-Paul forms a separate district within the Terres Australes *et* Antarctiques Françaises (TAAF).

The island has the shape of a small cone culminating at 880 m (Mont de la Dives) and has a temperate oceanic climate with a mean annual temperature of 14.0°C with minimum and maximum temperatures of 11.2°C in the coldest month (August) and 17.4°C in the warmest month (February). Relative humidity is high (> 80%) throughout the year, due to the frequency of low cloud ceilings.

The climate on the island shows a clear gradient from cold-temperate at the lower altitudes to almost cold sub-Antarctic at the top of the caldera (880m). Running water is almost absent on the island, restricted to some small rivers on the southern side of the island. Most water bodies are located in the ancient caldera. [1]

These geographic and physical features have resulted in the presence of a very typical

diatom (Bacillariophyta) flora dominated by species belonging to the genus *Pinnularia*. A total of 22 different *Pinnularia* taxa have been observed during a taxonomic analysis of aquatic, moss and soil samples. Twelve taxa did not correspond to any of the currently known species and are described as new species.

Material and Methods

Sampling locations were chosen in order to represent a maximum variability of habitat types ranging from small streams, lakes, bog ponds and temporary pools from all over the island. The samples were collected in PVC bottles and fixed with 3% formalin. Each sample is geographically localized using GPS and is accompanied by an elaborate site description.

The permanent slides for observation were prepared following the method described in Van der Werff [2]. Small parts of the samples were cleaned by adding 37 % H₂O₂ and heated to 80°C for 1h after which the reaction was completed by addition of KMnO₄. Following digestion and centrifugation (3 times 10 minutes at 3500 rpm), the material was diluted with distilled water to avoid excessive concentrations of diatom valves that could hinder reliable observations. Cleaned diatom valves were mounted in Naphrax[®]. Light microscope observations were conducted using an Olympus BX51 microscope equipped with Nomarski optics.

Identifications of Antarctic species are compared with descriptions in Bourrelly & Manguin [3], Le Cohu & Maillard [4] and Van de Vijver et al. [5].

Results and discussion

The genus *Pinnularia* is well-represented on the sub-Antarctic islands. When comparing the *Pinnularia* flora of Ile Amsterdam with the more southerly positioned sub-Antarctic islands (Prince Edward Islands, Archipel Crozet, Iles Kerguelen, Heard Island), we see, that only a few species are shared. Most (5 out of 7) of these shared species present a cosmopolite distribution. This result is confirmed by other biogeographic studies dealing with the sub-Antarctic diatom flora. In 2005, a biogeographic survey of the genus *Stauroneis* showed the presence of only one unknown species on Ile Amsterdam whereas on the other sub-Antarctica more than 10 new species were described [6].

A similar result was found in the genus *Eunotia* where only two out of five species were shared between Ile Amsterdam and the other sub-Antarctic islands [7]. The two species

shared by the islands were considered to have a cosmopolitan distribution whereas the three species restricted to Ile Amsterdam seem to be true endemic species.

The twelve new *Pinnularia* species (Tab.1), restricted on Ile Amsterdam can be considered being truly endemic for the island. The uniqueness of the island highlights also a presence of the rare, endemic Amsterdam albatross (*Diomedea amsterdamensis* Roux et al.). Endemic species on Ile Amsterdam are known also in vascular plants (e.g. *Plantago stauntoni* Reichardt) and lichens *Caloplaca amsterdamensis* (Aptroot & Ertz). Finally, in 2009, a new genus, *Microfissurata*, was described based on two species of which one was found on Ile Amsterdam (i.e. *Microfissurata australis* Van de Vijver & Lange-Bertalot). This suggests that Ile Amsterdam is sufficiently old and isolated for a speciation to occur in several biological groups.

Tab.1 List of new species of the genus *Pinnularia* from Ile Amsterdam

<i>Pinnularia amsterdamensis</i> Chattová, Van de Vijver & Metzeltin
<i>Pinnularia australogibba</i> Van de Vijver, Chattová & Metzeltin
<i>Pinnularia australogibba</i> var. <i>subcapitata</i> Van de Vijver, Chattová & Metzeltin
<i>Pinnularia isolata</i> Van de Vijver, Chattová & Metzeltin
<i>Pinnularia microcapitata</i> Van de Vijver, Chattová & Metzeltin
<i>Pinnularia myriamiae</i> Van de Vijver, Chattová & Metzeltin
<i>Pinnularia pseudohilseana</i> Van de Vijver, Chattová & Metzeltin
<i>Pinnularia subsinistra</i> Van de Vijver, Chattová & Metzeltin
<i>Pinnularia sylviae</i> Van de Vijver
<i>Pinnularia vlaminghii</i> Van de Vijver, Chattová & Metzeltin
<i>Pinnularia vixconspicua</i> Chattová, Van de Vijver & Metzeltin
<i>Pinnularia whinamiae</i> Van de Vijver

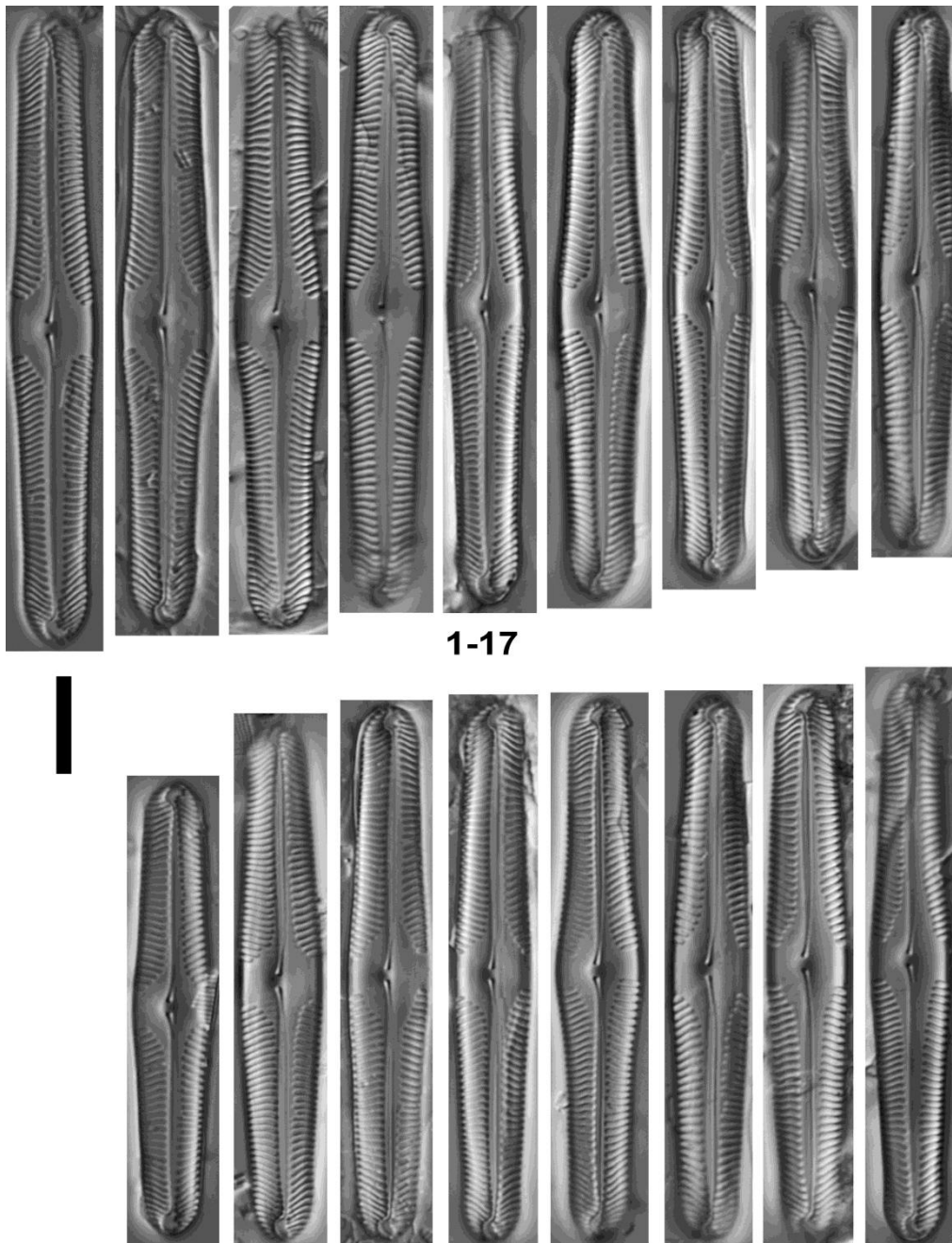


Fig. 2 (1-17) *Pinnularia amsterdamensis* Chattová, Van de Vijver & Metzeltin sp. nov. Scale bar 10 μm

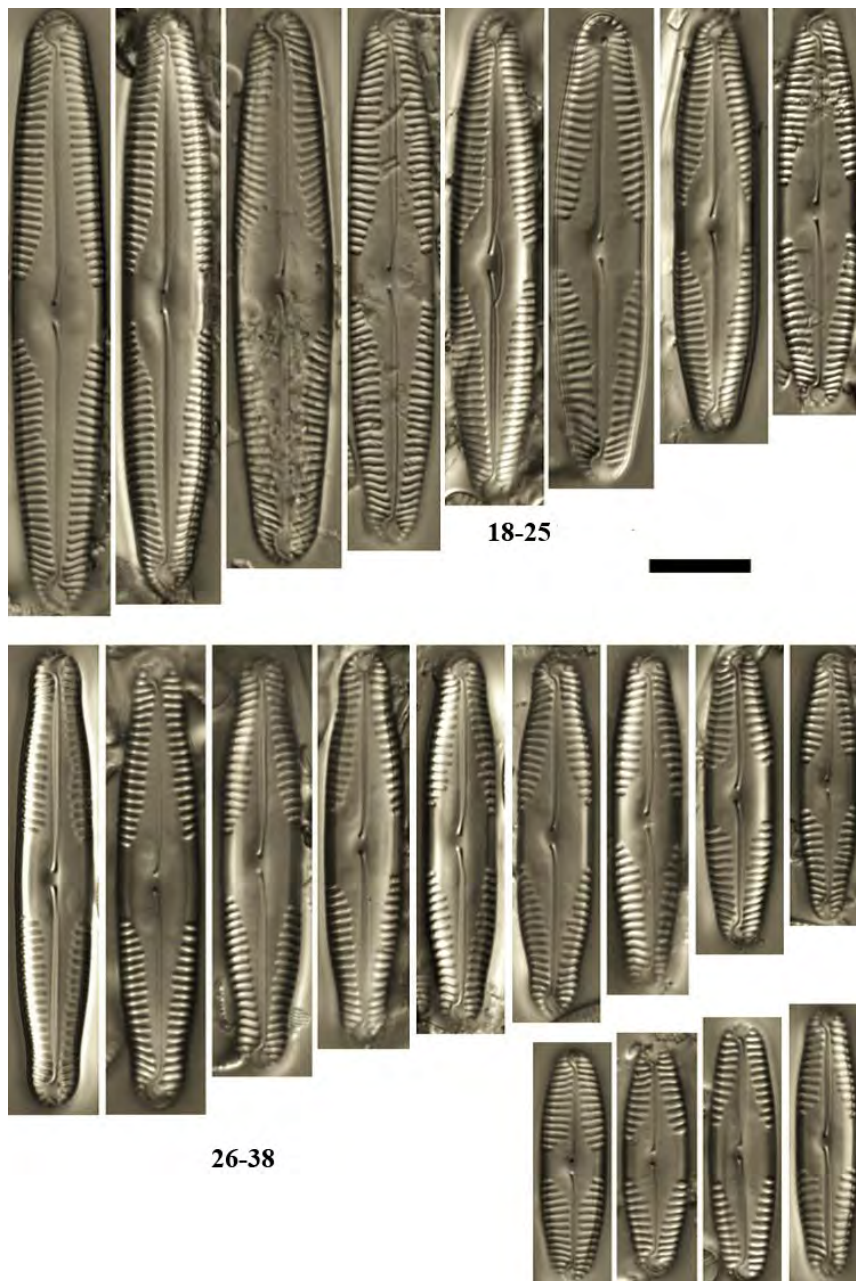


Fig. 3 (18-25) *Pinnularia australogibba* Van de Vijver, Chattová & Metzeltin sp. nov.,
 (26-38) *Pinnularia australogibba* var. *subcapitata* Van de Vijver, Chattová & Metzeltin var. nov.
 Scale bar 10 μ m

Conclusion

The large number of new *Pinnularia* species described from this small island is hardly surprising considering on one hand the unique features of Ile Amsterdam but on the other hand, the lack of detailed taxonomic studies on the Ile Amsterdam diatom flora.

The present study was intended to investigate the possible uniqueness of this island with regard to one genus and clearly demonstrated the unique floristic situation of Ile Amsterdam.

It is clear that further research will be necessary to investigate if similar biogeographical conclusions can be drawn for the entire diatom flora present on the island.

Acknowledgments

This survey was made possible with the logistic and financial support of the Institut Polair Français - Paul-Emile Victor (IPEV) in the frame of the Terrestrial Ecology program 136 (Dr. Yves Frenot & Dr. Marc Lebouvier). Additional funding was provided by the Science Foundation, Flanders (project: G.0533.07N) and by the Funding of the Masaryk University No. MUNI/A/0757/2012.

References

- [1] Van de Vijver B., Chattová B., Metzeltin D., et al. (2012) *Nova Hedwigia* 141, p. 201
- [2] Van der Werff A. (1955) *Verh. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.* 12, p. 276
- [3] Bourrelly P., Manguin E. (1954) *Mem. Inst. Sci. Madagascar* 5, p. 7
- [4] Le Cohu R., Maillard R. (1983) *Ann. Limnol.* 19, p. 143
- [5] Van de Vijver B., Frenot L., Beyens L. (2002) *Bibl. Diatom.* 46, p. 1
- [6] Van de Vijver B., Beyens L., Lange-Bertalot H. (2004) *Bibl. Diatom.* 51, p. 1
- [7] Van de Vijver B., Beyens L., Lebouvier, M. (2008) *Nova Hedwigia* 87, p. 113

Porovnanie účinku kvercetínu a jeho komplexov s hliníkom vo vybraných systémoch

Lenka Chodáková, Andrea Ševčovičová

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky,
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko; lenka.chodakova@gmail.com*

Abstrakt

Flavonoids have strong antioxidant properties *in vitro*, as they are able to scavenge reactive oxygen species (ROS) and reactive forms of nitrogen and chlorine. They also execute antioxidant activity by interaction with metals, primarily with Fe (II), Fe (III) and Cu (I), which participate in the reactions of generating free radicals. By metal ions sequestration, flavonoids can prevent the occurrence of metal-produced free radicals and protect potential biological targets of oxidative stress. Therefore, the total antioxidant potential of flavonoids is a combination of direct reaction with free radicals and metal ions chelation which may be responsible for the formation of reactive oxygen species. In our experiments, we focused on the comparison of the effect of quercetin and its complex with aluminum.

Kľúčové slová: flavonoidy; kvercetín; komplexy kvercetínu; hliník

Úvod a formulácia cieľa

Flavonoidy prvýkrát v roku 1930 popísal nositeľ Nobelovej ceny Albert Szent Gyorgyi. Donedávna bolo známych viac ako 6000 rôznych flavonoidov [1, 2, 3, 4], čo z nich robí najhojnejšie sa vyskytujúce rastlinné zlúčeniny. Flavonoidy sú jednou z podskupín rastlinných látok, ktoré sú schopné zabrániť účinku voľných radikálov, spôsobujúcich poškodenie proteínov, lipidov a nukleových kyselín [5, 6, 7]. Majú výrazné antioxidantné vlastnosti *in vitro*, pretože sú schopné vychytávať ako reaktívne formy kyslíka, tak aj reaktívne formy dusíka a chlóru. Pôsobia tiež ako vychytávače v ľudských bunkách *ex vivo*. Antioxidantná aktivita flavonoidov je odvodená od prítomnosti 3',4'-dihydroxy skupiny (=katechol), C4=O ketoskupiny, 3-hydroxyl substituenta a C2=C3 dvojitej skupiny [8]. Kvercetín (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavanon) patrí medzi flavonoly, jednej zo šiestich skupín flavonoidov. Antioxidantné aktivity kvercetínu boli prisudzované priamo jeho schopnosti vychytávať ROS prostredníctvom odoberania nespárených elektrónov atómov vodíka alebo prostredníctvom vychytávania kovov, v dôsledku čoho dochádza k zabráneniu vzniku hydroxylových radikálov vo Fentonovej reakcii [9]. Kvercetín obsahuje všetky štruktúry, ktoré sú zodpovedné za antioxidantnú aktivitu flavonoidov (katechol, 3-hydroxyl substituent, C2=C3 dvojité skupina) [8].

Flavonoidy taktiež vykazujú antioxidantnú aktivitu prostredníctvom interakcií s kovmi, primárne s Fe(II), Fe(III) a Cu(I), ktoré participujú v reakciách tvoriacich voľné radikály [10].

Flavonoidy sekvstrujú ióny kovov chelatáciou a predchádzajú vzniku kovmi produkovaných voľných radikálov, môžu teda ochraňovať potenciálne biologické ciele oxidačného stresu. Preto celkový antioxidačný potenciál flavonoidov je kombináciou priamej reakcie s voľnými radikálmi a chelatácie iónov kovov zodpovedných za tvorbu reaktívnych foriem kyslíka. Experimentálne dáta ukazujú, že cheláty efektívnejšie vychytávajú voľné radikály ako samotné voľné flavonoidy. Kostyuk a kol. [11] zistili, že komplexy rutínu, dihydrokvercetínu alebo epikatechínu s Fe(II), Fe(III), Cu(II) alebo Zn(II) sú efektívnejšie vychytávače radikálov ako voľné flavonoidy, vďaka získaniu ďalších superoxid dizmutázových centier. Tieto komplexy vykazovali zvýšenú účinnosť v ochrane bielych krviniek voči oxidatívne mu poškodeniu pôsobením azbestu *in vitro*. Zistilo sa, že hliník je zapojený v neurologických poruchách a ochoreniach kostného tkaniva. Komplexácia Al(III) s kvercetínom redukuje nadbytok hliníka v strave [12]. Prostredníctvom tvorby komplexov sa flavonoidy ukazujú ako vhodný antidot pri otravách ťažkými kovmi *in vivo* [13].

V našich experimentoch sme sa zamerali na spektroskopickú štúdiu kvercetínu a jeho komplexu s hliníkom, porovnanie jeho antioxidačnej aktivity a schopnosť pôsobiť DNA protektívne.

Materiál a metódy

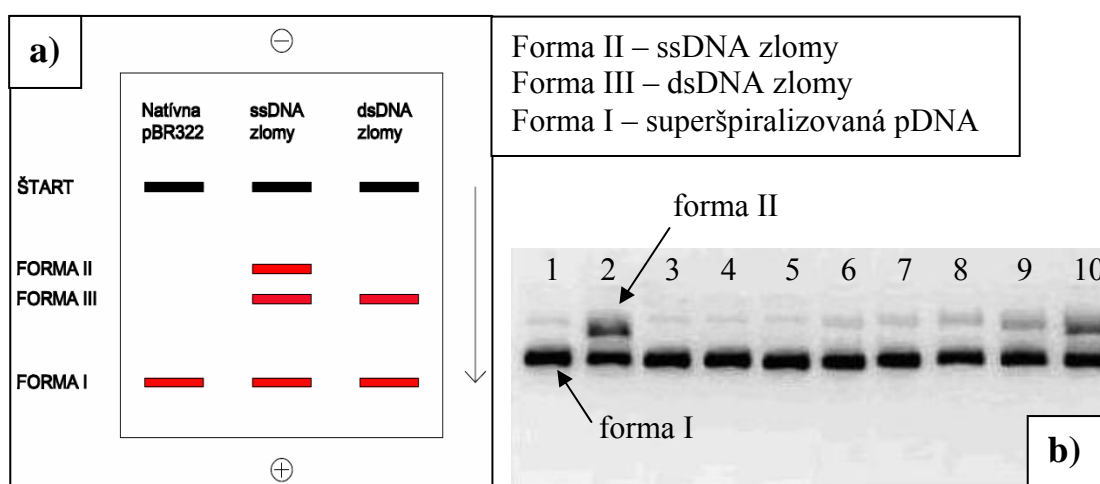
Pre účely spektroskopie kvercetínu a jeho komplexov s hliníkom sme kvercetín (50 μM) v pomere 1:1 alebo 1:9 zmiešali s vodným roztokom $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (1% w/v alebo 10% w/v). Následne sme pomocou spektrofotometra SCHOTT Instrument, UviLine 9400 zisťovali interakcie medzi kvercetínom a hliníkom.

Na stanovenie antioxidačnej schopnosti vybraných látok sa využíva metóda DPPH *assay* [14]. Vzorky s rôznymi koncentraciami kvercetínu alebo kyseliny askorbovej (50 μl) sme zmiešali s 950 μl zásobného roztoku DPPH radikálu a zmes sme inkubovali 30 minút pri laboratórnej teplote v tme. Následne sme merali zmenu absorbancie pri 517 nm v porovnaní s absorbanciou zásobného roztoku DPPH radikálu. Etanol sme použili ako blank. Scavengerová aktivita kvercetínu a kyseliny askorbovej bola prepočítaná na základe vzorca:

$$A_B - A_A / A_B \times 100 \quad [1.]$$

kde A_B je absorbancia zásobného roztoku DPPH radikálu a A_A je absorbancia jednotlivých koncentrácií kvercetínu.

Na zistenie potenciálnych bioprotektívnych vlastností skúmaných látok sa využíva DNA *topology assay* [15]. Túto metódu je možné využiť na zistenie chelatačných, DNA protektívnych účinkov kvercetínu (resp. jeho komplexov s Al), ktorý potenciálne viaže Fe^{2+} . Test je založený na elektroforetickej detekcii zmien v mobilite plazmidu, spôsobenej zmenou jeho topológie. (Obr.1). Reakčnú zmes zloženú z pDNA (zásobná koncentrácia 1 mg/ml), fosfátového tlmivého roztoku (0,1 M pH 7,4) a $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 mM zásobný roztok), sme 20 minút inkubovali pri 37°C. Následne sme pomocou elektroforetickej analýzy na 1,5% agarózovom géli v 0,5x TBE (60 V, 60 min) analyzovali zmeny v pohyblivosti pDNA spôsobenej zmenami jej topológie.



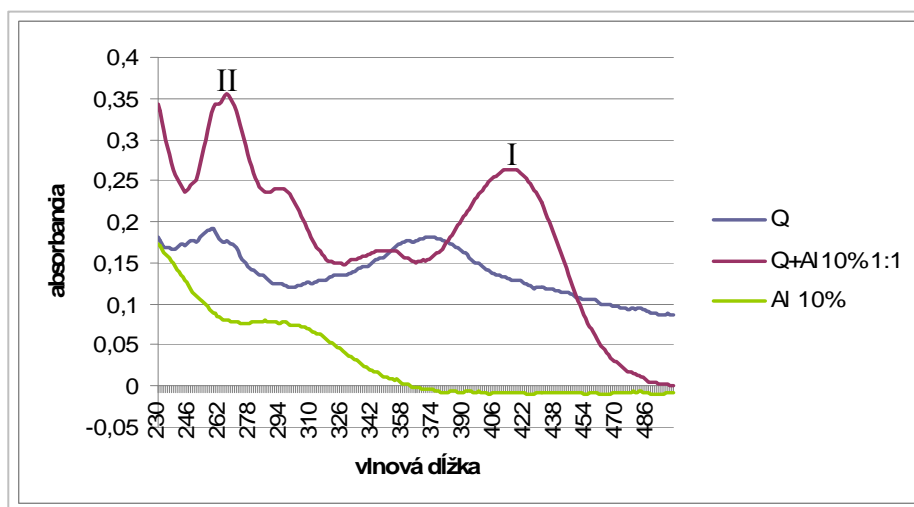
Obr. 1 a) Topoizomerické formy pDNA a ich pohyb v pri elektroforetickej analýze – po pridaní Fe^{2+} do reakčnej zmesi dochádza k tvorbe Fe^{3+} a voľných kyslíkových radikálov, ktoré môžu spôsobovať poškodenie pDNA v podobe jednoreťazcových a dvojnereťazcových zlomov. Nepoškodená superšpiralizovaná pDNA sa v agarózovom géli pohybuje najrýchlejšie, zatiaľ čo pDNA s jednoreťazcovými zlomami tvorí cirkulárnu formu a pohybuje sa najpomalšie (upravené podľa Čipák et al., 2000) [15]; **b)** chelatačná schopnosť kvercetínu v závislosti od jeho znižujúcej sa koncentrácie 1: kontrola – pBR; 2: pBR+ Fe^{2+} ; 3: pBR+kvercetín (KV) (10 mM); 4: pBR+KV(1mM); 5: pBR+KV(0,001mM); 6: pBR+ Fe^{2+} +KV(10mM); 7: pBR+ Fe^{2+} +KV(1mM); 8: pBR+ Fe^{2+} +KV (0,1mM); 9: pBR+ Fe^{2+} +KV (0,01mM); 10: pBR+ Fe^{2+} +KV(0,001mM) (Chodáková a kol., ŠVK 2012) [16]

Výsledky a diskusia

V experimentoch sme sa zamerali na sledovanie účinkov kvercetínu a jeho komplexu s hliníkom. Flavonoidy, ktoré ako pigmenty sfarbiajú listy, stonky a okvetné lístky, silne absorbujú ultrafialové (UV) žiarenie. Pri flavonoidoch pozorujeme dve absorpčné maximá – v rozmedzí 240-285 (maximum II) nm a 300-400 nm (maximum I). Zmenené absorpčné maximá môžu byť zodpovedné za zmenené vlastnosti látky [10].

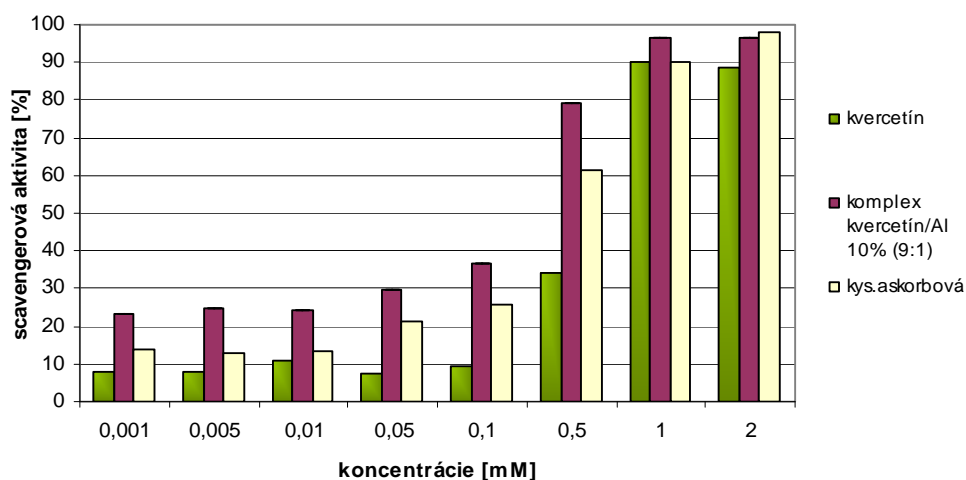
Pomocou spektroskopie sme pozorovali zmenené absorpčné maximum komplexu kvercetínu (maximum II) a posun absorpčného maxima I v porovnaní so samotným

kvercetínom (Obr. 2). Tvorba komplexu sa dala sledovať aj na základe farebnej zmeny roztoku.



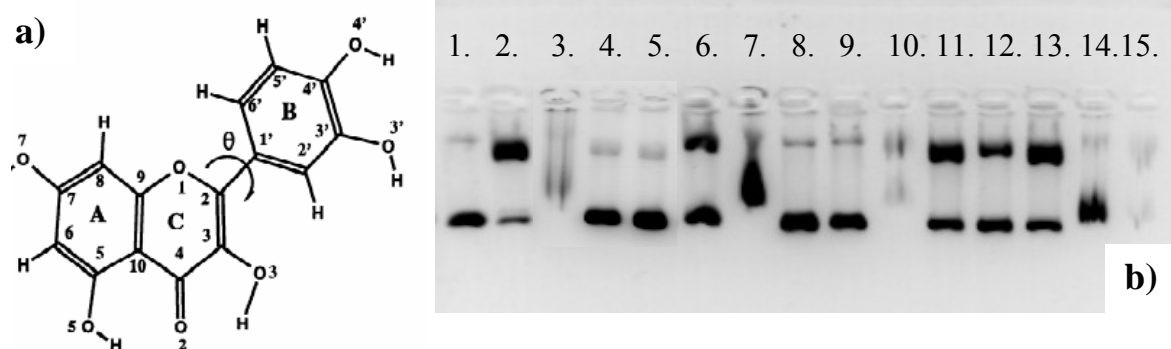
Obr. 2 Absorpčné spektrá kvercetínu (Q), komplexu kvercetínu (50 µM) s 10% w/v roztokom $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ v pomere 1:1 (Q+Al 10% 1:1) a 10% roztoku $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (Al 10%)

Pomocou DPPH testu sme potvrdili, že komplex kvercetínu s hliníkom má v porovnaní so samotným kvercetínom vyššiu vychytávaciu – *scavengerovú* – aktivitu v rozmedzí koncentrácií 0,001-0,5 mM (Obr. 3). Kvercetín je schopný odovzdať svoje protóny vodíka a redukuje tak DPPH radikál na DPPH-H, čo sa prejavilo aj zmenou absorbancie jednotlivých vzoriek. Naše výsledky sú konzistentné so zisteniami autorov de Souza a de Giovanni (2004), ktorí pomocou DPPH charakterizovali antioxidačný potenciál rôznych flavonoidov [17].



Obr. 3 Scavengerová aktivita komplexu kvercetínu s hliníkom v porovnaní s kvercetínom a kys. askorbovou

Kvercetín má tri potenciálne chelatačné miesta – 3-hydroxychromón, 5-hydroxychromón a 3'4'-dihydroxylové skupiny (Obr.4a) [18]. Pri zisťovaní DNA protektívnych vlastností sme pozorovali potenciálne maximálne obsadenie kvercetínu pomocou hliníka za vytvorenia komplexov (Obr.4b). Takéto komplexy už neboli ďalej schopné pôsobiť DNA protektívne a vychytávať ióny železa, ktoré poškodzujú pDNA – dráha 11 a 12. V dráhe 3 pozorujeme poštičenie pDNA v dôsledku jej poškodenia vysokou koncentráciou hliníka. Nižšie koncentrácie nespôsobovali poškodenie pDNA (dráhy 4 a 5), z dôvodu vytvárania komplexov s kvercetínom.



Obr. 4 a) Štruktúra kvercetínu [19] **b)** výsledok elektroforetickej analýzy – komplexu kvercetínu. 1. NK - pDNA; 2. Fe²⁺; 3. Al 10%; 4. Al 1%; 5. Al 0,5%; 6. Fe²⁺+0,05mM kvercetín; 7. komplex 10%+0,05mM; 8. komplex 1%+0,05mM; 9. komplex 0,5%+0,05mM. 10. Fe²⁺+komplex 10%+0,05mM; 11. Fe²⁺+komplex 1%+0,05mM; 12. Fe²⁺+komplex 0,5%+0,05mM; 13. Fe²⁺+0,001mM kvercetín; 14. komplex 10%+0,001mM; 15. Fe²⁺+komplex 10%+0,001mM

Záver

V našich experimentoch sa nám podarilo preukázať, že komplexy kvercetínu a hliníka majú zmenené vlastnosti *in vitro*. Pri tvorbe komplexov dochádza k zmene absorbného spektra kvercetínu. Tieto zmeny môžu byť ďalej zodpovedné za zvýšené antioxidačné vlastnosti, čo sa nám podarilo potvrdiť pomocou metódy DPPH *assay*. Komplexy však nemajú v DNA *topology* teste DNA protektívny účinok ako je to v prípade samotného kvercetínu.

PodĎakovanie

Táto práca bola finančne podporená grantmi APVV-0040-10, VEGA 1/0025/11 a SK-BG-0006-10, BGSK/206.

Zoznam použitej literatúry

[1] Ross J. A., Kasum C. M. (2002) *Annu. Rev. Nutr.* 22, p. 19

- [2] Fernández S. P., Wasowski C., Loscalzo, L. M., et al. (2006) *Eur. J. Pharmacol.* 539, p. 168
- [3] Lehane A. M., Saliba K. J. (2008). *BMC Res. Notes.* 1(26), doi: 10.1186/1756-0500-1-26
- [4] Forni C., Braglia R., Lentini A., et al. (2009) *Amino Acids.* 36, p. 731
- [5] Amaral S., Mira L., Nogueira J. M. F., et al. (2009) *Bioorg. Med. Chem.* 17, p. 1876
- [6] Taira J., Nanbu H., Ueda K. (2009) *Food Chem.* 115, p. 1221
- [7] Wang J., Du X.-X., Jiang H., et al. (2009) *Biochem. Pharmacol.* 78, p. 178
- [8] Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. (1996) *Free Radic. Biol. Med.* 20, p.933
- [9] Vilaca R., Mendes V., Mendes M. V., et al. (2012) *PLOS.* 7(9), p. 45494
- [10] Malešev D., Kuntić V. (2007) *J. Serb. Chem. Soc.* 72(10), p. 921
- [11] Kostyuk V. A., Potapovich A. I., Vladykovskaya E. N. (2001) *Arch. Biochem. Biophys.* 385, p. 129
- [12] Deng Z., Coudray C, Gouzoux L. et al. (2001) *J. Inorg. Biochem.* 83, p. 41
- [13] Wang S. X., Zhang F. J., Feng Q. P. (1992) *J. Inorg. Biochem.* 46, p. 251
- [14] Locatelli M., Gindro R., Travaglia F., et al. (2009) *Food Chem.* 114 (3), p. 889
- [15] Čipák Ľ., Miadoková E., Dingová H., et al. (2001) *Toxicology in vitro.* 15, p. 677
- [16] Chodáková L., Ševčovičová A., Gálová E. (2012) *Študentská Vedecká Konferencia PriF UK 2012. Zborník recenzovaných príspevkov, Bratislava, SR, s. 89*
- [17] de Souza R. F., de Giovanni W. F. (2004) *Redox Rep.* 9(2), p. 97
- [18] Cornard J. P., Merlin J. C. (2002) *J. Inorg. Biochem.* 92(1), p. 19

Prenatálny vplyv kyseliny valproovej na expresiu génov, kódujúcich GAD 65 a GAD 67 v prefrontálnom kortexe mozgu potkana

Martin Chudík, Peter Štefánik

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika, chudik.martin@gmail.com

Abstrakt

Valproic acid (VPA) can modulate alterations in GABAergic system by affecting the metabolic pathway of γ -aminobutyric acid (GABA) and acts like an epigenetic factor. An intraperitoneal application of VPA to pregnant rats between the 12. – 13. day of the embryonic development represents the animal model of autism, which helps us to reveal modifications in the brain of autistic individuals. In our research, we aimed to the relation between the prenatal exposition to VPA and the expression of genes, encoding the enzymes GAD 65 and GAD 67, expressing in the prefrontal cortex of rats. We have quantified the gene expression by the reverse transcription of mRNA and the following amplification of cDNA by PCR method and compared the levels of mRNA GAD 65 and GAD 67 in newborn control (K) and by valproic acid influenced (VPA) rats and in adult K and VPA rats. We have found out significantly raised levels of mRNA GAD 67 only in adult VPA rats in comparison to adult K rats. Another factors haven't proved any significant differences in the gene expression of GAD 65 and GAD 67 in newborn rats, too.

KLúčové slová: *valproic acid; GABAergic system; GAD 65; GAD 67; epigenetic regulation*

Úvod a formulácia cieľa

Kyselina γ -aminomaslová (GABA) je dominantným inhibičným neurotransmitterom v centrálnej nervovej sústave cicavcov [1]. GABAergický systém pozostávajúci z inhibičných GABAergických interneurónov, enzýmov glutamát dekarboxyláz GAD 65 a GAD 67, ktoré konvertujú GABA z glutamátu, GABA transportérov (GAT), GABA receptorov a samotného neurotransmitera, je esenciálny pre správnu kortikálnu funkciu a podieľa sa na vytváraní inhibično – excitačnej rovnováhy v mozgu [2].

Dysfunkcia GABAergického systému participuje na etiológii niektorých neurologických porúch, medzi ktoré patrí autizmus [3], schizofrénia [4] či epilepsia [5]. Početné výskumy dokázali, že alterácie v GABAergickom systéme môžu byť modulované farmakologicky. Jedným z takýchto liečiv je aj kyselina valproová (VPA), ktorá zasahuje do metabolickej dráhy GABA [6] a pôsobí ako epigenetický faktor. Efektívne inhibuje aktivitu histón deacetyláz a aktivuje DNA demetylázy, čím pozitívne ovplyvňuje transkripciu určitých génov. Toto konštatovanie potvrdzuje aj pokus, pri ktorom po administrácii VPA myšiam, ktorým bola indukovaná hypermetylácia promótorov v génoch, kódujúcich GAD 67 a reelin, bola pozorovaná ich zvýšená expresia v neokortexe [7].

Animálny model autizmu pomáha odhaliť možné zmeny v mozgu na úrovni molekúl, buniek, synapsí, neuronálnych okruhov a správania. Je vytváraný jednorázovou dávkou VPA, ktorá je aplikovaná intraperitoneálne gravidným potkanom na 12. – 13. deň embryonálneho vývinu, kedy dochádza k uzatváraniu neuronálnej trubice [8].

V našej práci sme skúmali vzťah medzi prenatálnou expozíciou kyseliny valproovej a expresiou génov, kódujúcich enzýmy GAD 65 a GAD 67, exprimujúce sa v inhibičných GABAergických interneurónoch v prefrontálnom kortexe potkanov. Chceli sme tiež overiť, či zmeny v génovej expresii spomenutých molekúl, vyvolané prenatálnym vystavením VPA, korešpondujú s predpokladaným mechanizmom účinku VPA ako epigenetického faktora.

Materiál a metódy

Pri našom pokuse sme pracovali s potkanmi kmeňa Wistar. Rodičovskú generáciu tvorilo 9 samíc a 5 samcov. Zvieratá pochádzali z chovnej stanice Dobrá Voda, Ústavu experimentálnej farmakológie a toxikológie SAV v Bratislave. Vo zverinci boli zabezpečené podmienky – 12L:12D, so začiatkom svetelnej fázy o 6:00 hod., priemerná teplota $21 \pm 2^\circ\text{C}$ a relatívna vlhkosť $55 \pm 5\%$. Vodu a potravu mali zvieratá k dispozícii *ad libitum*.

Po povinnej 7 dňovej karanténe boli samice na základe frekvencie motorickej aktivity rozdelené do dvoch, z hľadiska excitability vyrovnaných, skupín – kontrolnej (K: n = 5) a tzv. valproovej (VPA: n = 4) a pripustené v pomere 2 – 3 samice : 1 samec. VPA samiciam (n = 4) sme na 12,5. deň gravidity intraperitoneálne aplikovali valproát sodný (Sigma, USA) rozpustený vo fyziologickom roztoku (pH = 7,3; c = 250 mg/ml; dávka: 600 mg/kg živej hmotnosti) [9, 10, 11]. Kontrolným samiciam (n = 5) sme na rovnaký deň gravidity jednorázovo intraperitoneálne aplikovali fyziologický roztok (pH = 7,3; v objeme 2ml/kg živej hmotnosti).

Po pôrode sme všetkým samiciam ponechali po 8 mláďat (4 samce : 4 samice). Zvyšné mláďatá (K: n=8; VPA: n=7) sme hneď po narodení použili na odber biologických vzoriek. Mláďatá sme ponechali pod matkou až do odstavu (21. deň). Po odstave boli zvieratá chované v oddelených klietkach, označené podľa príslušnosti k vrhu, osobitne samce a osobitne samice.

Potomstvo K a VPA samíc tvorilo 65 dospelých jedincov. Potomstvo K samíc (n = 38, 19 samcov a 19 samíc) a potomstvo VPA samíc (n = 27, 16 samcov a 11 samíc). Potomstvo K a VPA samíc sme usmrtili dekapitáciou po anestéze v CO₂ v rovnaký deň (jedince boli vo vekovom rozmedzí 79 – 83 dní postnatálneho vývinu). Odobrali sme im vzorky mozgového

tkaniva, konkrétne prefrontálny kortex (PFC) a zamrazili ich pomocou tekutého dusíka. Vzorky sme uskladnili pri teplote $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do ďalších analýz.

Expresiu génov, kódujúcich molekuly GAD 65 a GAD 67 v prefrontálnom kortexe, sme kvantifikovali reverznou transkripciou mRNA a následnou amplifikáciou cDNA PCR metódou. Pomocou TRI REAGENT-u (Molecular Research Center, Inc., USA) sme zo vzoriek PFC vyizolovali totálnu RNA, ktorú sme za použitia enzýmu reverznej transkriptázy (Maxima Reverse Transcriptase, Fermentas, USA), Oligo(dT) primera a inhibítora RNáz (RiboLock RNase Inhibitor, Fermentas, USA) v pevnom termobloku (AccuBlock, Digital Dry Bath, Labnet International Inc., USA) prepísali do cDNA. Následne sme cDNA amplifikovali pomocou PCR metódy za použitia DNA polymerázy (DreamTaq DNA Polymerase, Fermentas, USA) a špecifických primerov, ktorých sekvencie sú uvedené v **Tab. 1** [12]. Počet cyklov v jednotlivých PCR reakciách bol stanovený na základe kalibrácie špecifických reakcií, za účelom ukončenia každej reakcie v log fáze, s tým, že každá reakcia je zakončená finálnou polymerizáciou po dobu 5 min. Elektroforézou sme oddelili fragmenty cDNA v agarózovom géli a signály jednotlivých vzoriek sme vizualizovali fotografickým zariadením (DNR MiniBIS Pro, DNR Bio-Imaging Systems, Israel) pod UV svetlom pomocou počítačového programu Gel Capture (DNR Bio-Imaging Systems, Israel). V programe Gel Quant (DNR Bio-Imaging Systems, Israel) sme vyhodnotili silu jednotlivých signálov. Hodnoty sú určené optickou denzitou a veľkosťou plochy týchto signálov. Výsledné hodnoty sme normalizovali voči housekeeperu β -aktínu. Následne sme získané výsledky štatisticky spracovali nepárovým t-testom (juvenilné jedince) a dvojcestnou analýzou variance (ANOVA) (dospelé jedince) v programe SigmaPlot v. 11.0 (Systat Software Inc., USA).

Tab. 1 Sekvencie primerov

názov primera	sekvencia primera	veľkosť primera
β -actin sense	5-TGT GAT GGT GGG AAT GGG TCA G-3	515 bp
β -actin antisense	5-TTGATGTCA CGC ACGATT TCC-3	
GAD 65 sense	5-GCT CTA CGG AGA CTC TGA GAA G-3	318 bp
GAD 65 antisense	5-CGG TTG GTC TGA CAA TTC CC-3	
GAD 67 sense	5-TGT GGC GTA GCC CAT GGA TG-3	330 bp
GAD 67 antisense	5-ACT GGT GTG GGT GGT GGA AG-3	

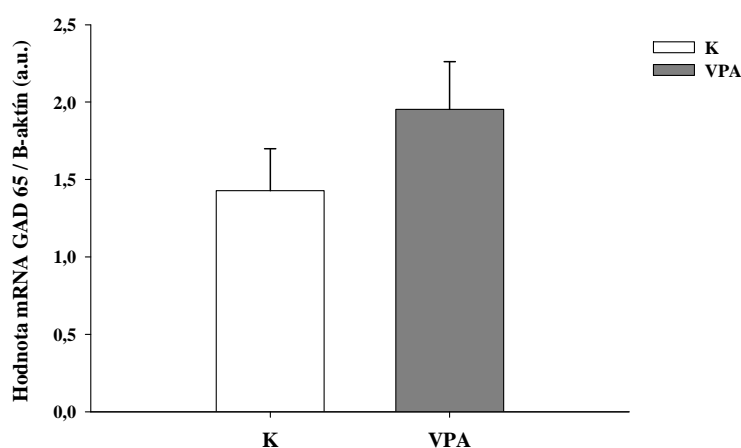
Výsledky a diskusia

Hodnoty mRNA GAD 65 u K a VPA skupiny dospelých jedincov sa signifikantne nelíšili ($F_{1,43} = 1,340$; $p = 0,253$) (**Obr. 1**). Podobne, ani faktor pohlavia ($F_{1,43} = 0,0222$;

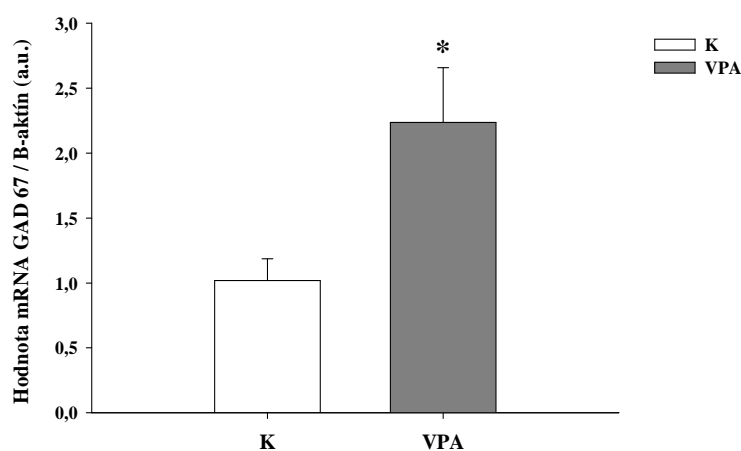
$p = 0,882$) a interakcia skupiny a pohlavia ($F_{1,43} = 0,965$; $p = 0,331$) nepreukázali signifikantné rozdiely v génovej expresii mRNA GAD 65.

Dospelé VPA jedince vykazovali signifikantné, približne dvojnásobne zvýšené hladiny mRNA GAD 67 v porovnaní s K skupinou ($F_{1,47} = 6,104$; $p = 0,017$) (**Obr. 2**). Faktor pohlavia nepreukázal signifikantné rozdiely v génovej expresii ($F_{1,47} = 0,353$; $p = 0,555$) a interakcia skupiny a pohlavia bola tiež bez signifikantných zmien ($F_{1,47} = 2,367$; $p = 0,131$).

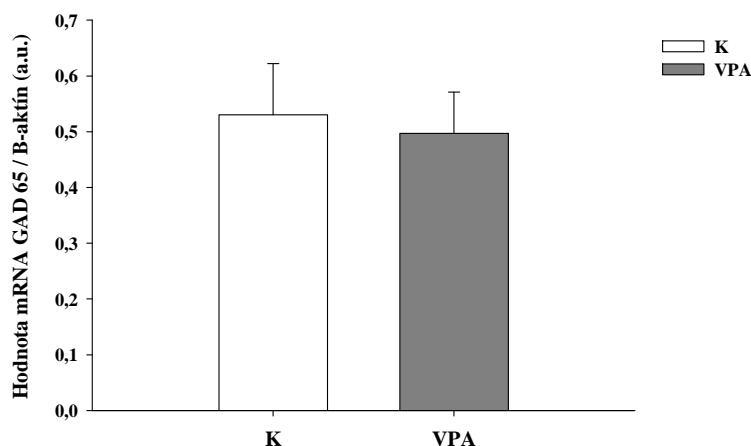
U juvenilných VPA potkanov nebola zistená signifikantná zmena v hladinách mRNA GAD 65 v porovnaní s K skupinou ($t = 0,279$; $df = 13$; $p = 0,785$) (**Obr. 3**), ani v génovej expresii mRNA GAD 67 ($U = 15$; $p = 0,152$) (**Obr. 4**).



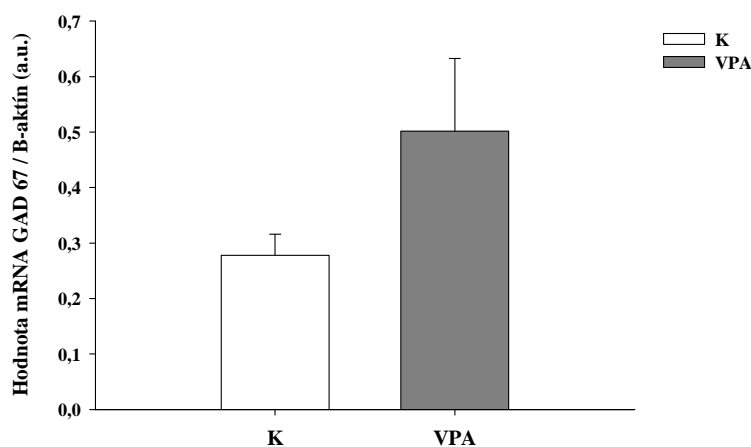
Obr. 1 Porovnanie hladín mRNA GAD 65 v prefrontálnom kortexe (PFC) kontrolných (K: $n = 22$) a kyselinou valproovou (VPA: $n = 25$) ovplyvnených potkanov usmrtených v dospelosti. Hodnoty sú udávané ako priemer \pm SEM.



Obr. 2 Porovnanie hladín mRNA GAD 67 v prefrontálnom kortexe (PFC) kontrolných (K: $n = 25$) a kyselinou valproovou (VPA: $n = 26$) ovplyvnených potkanov usmrtených v dospelosti. Hodnoty sú udávané ako priemer \pm SEM (* $p < 0,05$).



Obr. 3 Porovnanie hladín mRNA GAD 65 v prefrontálnom kortexe (PFC) kontrolných (K: n = 8) a kyselinou valproovou (VPA: n = 7) ovplyvnených potkanov usmrtených hneď po narodení. Hodnoty sú udávané ako priemer \pm SEM.



Obr. 4 Porovnanie hladín mRNA GAD 67 v prefrontálnom kortexe (PFC) kontrolných (K: n = 8) a kyselinou valproovou (VPA: n = 7) ovplyvnených potkanov usmrtených hneď po narodení. Hodnoty sú udávané ako priemer \pm SEM.

Záver

U juvenilných ani u dospelých potkanov neboli zistené signifikantné rozdiely v hladinách mRNA GAD 65.

Vyhodnotenie porovnania expresie génu, kódujúceho GAD 67 u dospelých K a VPA potkanov a u juvenilných K a VPA potkanov preukázalo signifikantne zvýšené hladiny mRNA GAD 67 len u dospelých VPA potkanov, pričom faktor pohlavia, ani interakcia skupiny a pohlavia nevykazovali signifikantné zmeny v génovej expresii tohto génu. Pri porovnaní K a VPA skupiny juvenilných jedincov neboli zistené signifikantné rozdiely

v hladinách mRNA GAD 67. Keďže VPA pôsobí ako priamy epigenetický faktor len niekoľko hodín po podaní [13], môžeme uvažovať o existencii neznámeho faktora, ktorý bol aktivovaný prenatálnou expozíciou VPA a kumuláciou jeho zmenenej aktivity v neskoršom postnatálnom období jedinca je určitým spôsobom regulovaná génová expresia GAD 67 na úrovni transkripcie. Je potrebné pokračovať v podobných štúdiách, kde by sme mali k dispozícii väčší súbor K a VPA juvenilných potkanov, ktoré by nám mohli poskytnúť relevantnejšie výsledky.

PodĎakovanie

Práca bola podporená grantom VEGA 1/0365/10 a APVV – 0214 – 07.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Roberts E., Frankel S. (1950) *J. Biol. Chem.* 187, p. 55
- [2] Druga R. (2009) *Folia Biol.* 55, p. 201
- [3] Oblak A. L., Gibbs T. T., Blatt G. J. (2011) *Brain Res.* 1380, p. 218
- [4] Damgaard T. Plath N., Neill J. C., et al. (2011) *Psychopharmacology* 214, p. 403
- [5] Treiman D. M. (2001) *Epilepsia* 42, p. 8
- [6] Monti B., Polazzi E., Contestabile A. (2009) *Curr Mol Pharmacol* 2, p. 95
- [7] Dong E., Guidott A., Grayson D. R., et al. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, p. 4676
- [8] Rodier P. M., Ingram J. L., Tisdale B., et al. (1996) *J. Comp. Neurol.* 370, p. 247
- [9] Ingram J. L., Peckham S. M., Tisdale B., et al. (2000) *Neurotoxicol. Teratol.* 22, p. 319
- [10] Schneider T., Przewlocki R. (2005) *Neuropsychopharmacol.* 30, p. 80
- [11] Schneider T., Ziolkowska B., Gieryk A. (2007) *Psychopharmacology* 193, p. 547
- [12] Souza M. F., Toniazio V. M., Frazzon A. (2009) *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42, p. 1068
- [13] Murray E. K., Hien A., de Vries G. J. (2009) *Endocrinology* 150, p. 4241

Ekológia *Borrelia burgdorferi* sensu lato a *Anaplasma phagocytophilum* v modelovom urbánnom ohnisku

Michal Chvostáč ¹, Markéta Derdáková ²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra zoológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; michal.chvostac@gmail.com

²Slovenská akadémia vied, Ústav zoológie, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovenská republika

Abstrakt

Ticks are important vectors of pathogens which are the causative agents of serious diseases. In Slovakia, *Ixodes ricinus* is epidemiologically most important vector. It transmits spirochetes from the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex and *Anaplasma phagocytophilum*. In our research we studied the ecology of these pathogens in a habitat with low abundance of rodents, which are important hosts of immature stages of ticks. We have examined 513 ticks that were collected during 2011 and 2012. 4.5 % and 7.2 % of ticks were infected with *A. phagocytophilum* in 2011 and 2012, respectively. The prevalence of *B. burgdorferi* s. l. it was 7,1 % and 5,9 % during two consecutive years. We have confirmed that the population of roe deer, that is incompetent reservoir for *B. burgdorferi* s.l, host a large number of ticks and has a dilution effect on *Borrelia* prevalence in ticks in our habitat. On the other side, roe deer is an important reservoir for *A. phagocytophilum* which prevalence was higher as compared to the general prevalence in Europe.

Kľúčové slová: *Borrelia burgdorferi*; *Anaplasma phagocytophilum*; *Ixodes ricinus*; *Capreolus capreolus*

Úvod a formulácia cieľa

Kliešť *Ixodes ricinus* Linné, 1785 je častým ektoparazitom stavovcov v našich zemepisných šírkach a patrí u nás medzi najvýznamnejších prenášačov patogénnych organizmov. Častý výskyt tohto kliešťa v mestách zvyšuje jeho medicínsky význam. Larválne a nymfálne štádiá najčastejšie parazitujú na drobných cicavcoch a vtákoch, dospelce najmä na vysokej zveri a mäsožravcoch.

Patogény prenášané kliešťami predstavujú významné infekčné agens, ktoré môžu ohrozovať zvieratá, ale aj človeka. Patria medzi ne aj spirochéty z komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato, ktoré vyvolávajú lymskú boreliózu. Do tohto komplexu patrí 19 genospecies, z toho na našom území sa vyskytuje 8 [1]. Prevalencia v kliešťoch v Európe je priemerne okolo 20% , ale pohybuje sa od 1,5 % do 49,1 % [2]. Jednotlivé genospecies sa líšia ekológiou a klinickými príznakmi, ktoré spôsobujú. Na území strednej Európy sa vyskytujú: *B.burgdorferi* sensu stricto [3], *B. garinii* [4], *B. afzelii* [5], *B. valaisiana* [6], *B. lusitaniae* [7], *B. spielmanii* [8], *B. bissetti* [9], *B. bavariensis* [10]. Cieľom našej práce bolo objasniť ekologické vzťahy medzi boréliami a ich rezervoárovými hosťiteľmi a vysvetliť tieto

vzťahy na lokalite s obmedzeným výskytom hlodavcov, ktoré patria medzi významných rezervoárov tejto baktérie.

Ďalším dôležitým kliešťami prenášaným patogénom je *Anaplasma phagocytophilum*. Táto baktéria vyvoláva granulocytárnu anaplazmózu ľudí a hospodárskych zvierat. Medzi najdôležitejšie rezervoáre tejto baktérie patria prežúvavce [11]. Jedným z rezervoárových hostiteľov *A. phagocytophilum* je srnec lesný (*Capreolus capreolus*) Linné, 1785 [12], ktorého prítomnosť na lokalite sme potvrdili vlastným pozorovaním. Naším cieľom bolo zistiť úlohu tohto rezervoára na vybranej lokalite a zistiť ako ovplyvňuje prevalenciu *A. phagocytophilum* v kliešťoch.

V rokoch 2010 - 2012 sme sledovali dynamiku kliešťov a prítomnosť vyššie spomenutých patogénov. Na základe molekulovej typizácie druhov patogénov a známych špecifických vzťahoch medzi patogénmi a rezervoárovými hostiteľmi sme ich výskyt dali do súvisu so zastúpením hostiteľov na sledovanej lokalite.

Materiál a metódy

Skúmané územie je súčasťou kopca Sitina s celkovou rozlohou približne 0,75 km² a patrí k areálu SAV.

Zber kliešťov sme realizovali metódou vlajkovania v 100 m transektoch, kliešte sme odoberali z deky každých 10 metrov a ukladali do 1,5 ml mikroskúmavky, naplnenej 70 % etanolom. Zbery sme vykonávali raz mesačne od apríla roku 2011 do októbra roku 2012. Tieto sme následne určili do druhov a rozdelili podľa pohlavia a vývinového štádia. Na prítomnosť patogénov boli ďalej analyzované iba kliešte *I. ricinus*.

Na izoláciu DNA z kliešťov sme použili metódu amoniakovej extrakcie. Kliešte sme následne mechanicky homogenizovali pomocou pipetových špičiek. Mikroskúmavky sme uzavreli a inkubovali 30 minút pri teplote 100 °C v termostate. Potom sme mikroskúmavky otvorili a inkubovali ďalších 15-20 minút, kým sa neodparila polovica objemu. DNA bola skladovaná pri teplote 4 °C.

Prítomnosť patogénov bola zisťovaná pomocou PCR metód. Pre *B. burgdorferi* s. l. to bola klasická PCR s následnou vizualizáciou na agarózovom géli po vykonaní elektroforézy. Použili sme kit HotStartTaqPlus DNA Polymerase (Quiagen), ktorým sme amplifikovali 5S-23S rRNA intergénový medzerník použitím primerov IGSa a IGSb podľa Derdákovej et al. (2003) [13]. Elektroforéza prebiehala v 1,5 % agarózovom géli. Vzorky sme po prebehnutí elektroforézy vizualizovali UV transiluminátorom (Vilber Lourmant)

Pozitívne vzorky sme kvôli rozlíšeniu jednotlivých genospecies podrobili RFLP analýze.

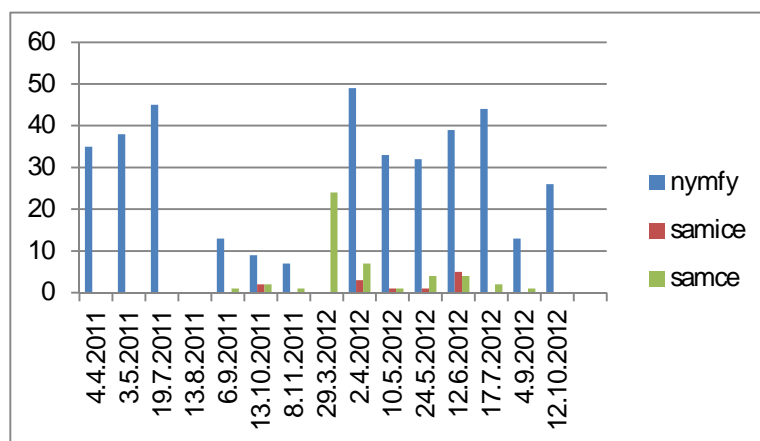
Na detekciu *A. phagocytophilum* bola využitá metóda real-time PCR. Použili sme kit Bioron SuperHot Master Mix (Ludwigshafen, Nemecko). Amplifikovaná bola časť msp2 génu, kódujúceho povrchový membránový proteín, použitím ApMSp2r a ApMSpf primerov a Taq man próby podľa Courtney et al. 2004 [14].

Na skúmanom území sme zisťovali aj výskyt niektorých hostiteľov kliešťa *I. ricinus*. Konkrétne to boli drobné cicavce a srnec lesný (*Capreolus capreolus*). Prítomnosť drobných cicavcov bola zisťovaná pomocou odchyty do živolovných pascí. Pasce boli rozmiestnené v línii s 5 metrovými rozstupmi. Na jeden odchyt sme použili 50 pascí a dokopy spravili 10 odchyto. Ako návnadu sme používali ovsené vločky, slnečnicu a čerstvú mrkvu.

Prítomnosť srnca sme zisťovali vizuálne. Lokalitu sme navštívili 3 krát, ale prítomnosť srnca lesného sme pozorovali aj počas zberu kliešťov na tejto lokalite.

Výsledky a diskusia

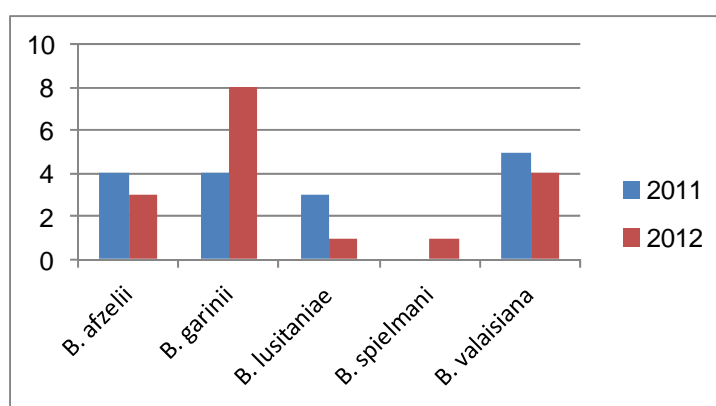
Metódou vylajkovania sme na skúmanej lokalite nazbierali v období rokov 2011 a 2012 spolu 651 kliešťov. Presné počty samíc, samcov a nýmfov počas jednotlivých mesiacov sú uvedené v grafe č. 1. Na prítomnosť patogénov bolo vyšetrených 513 kliešťov: 224 za rok 2011 a 289 za rok 2012.



Obr. 1: Počty navlajkovaných kliešťov v jednotlivých mesiacoch

Zistená prevalencia *B. burgdorferi* s. l. bola 7,1 % v roku 2011 a 5,9 % v roku 2012. Toto číslo je v porovnaní s inými prácami pomerne nízke. Derdáková et al. (2003) [13] zistila prítomnosť borélií v 20,5 % skúmaných kliešťov, Hanincová et al. (2003) [7] potvrdila borélie

v 33 % skúmaných kliešťov. Výskum prevalencie borélií v Európe [15] ukázal prítomnosť tohto patogénu u 10,8 % ným a 17,4 % dospelcov. Nízka prevalencia borélií na nami skúmanej lokalite pravdepodobne súvisí s prítomnosťou srnca lesného a neprítomnosťou hlodavcov. Juvenilné štádiá nemajú možnosť cicat' na hlodavcoch a pravdepodobne v zvýšenej miere cicajú na srncoch, ktoré boli na pomerne malom území pozorované v počte 10 jedincov. Komplement v krvi tohto živočícha v prírode zabíja borélie [16]. Keďže prítomnosť hlodavcov na skúmanej lokalite je veľmi nízka, prípadne nulová, zvyšuje sa počet kliešťov cicajúcich na srnách a na vtákoch. Naše hypotézy potvrdzuje aj zastúpenie jednotlivých genospecies borélií (Obr. 2) a ich asociácia k jednotlivým hosťiteľom.



Obr. 2 Počty jednotlivých genospecies borélií

Prítomnosť *A. phagocytophilum* sme potvrdili u 4,5 % kliešťov v roku 2011 a u 7,2 % kliešťov v roku 2012, čo je vyššie ako priemerná prevalencia *A. phagocytophilum* v Európe. Keďže hlodavce na tejto lokalite zohrávajú kvôli ich nízkej početnosti nevýznamnú úlohu v cykle patogénov, je pravdepodobné že ich úlohu tu prevzali srny, ktoré prekrmujú značné množstvo kliešťov a predstavujú najvýznamnejšieho rezervoára pre *A. phagocytophilum*. Zistenú hodnotu prevalencie patogénov je možno sčasti pripisovať vtákom, čo súvisí so zisteným výskytom *B. garinii* a *B. valaisiana*, avšak ich úlohe v cykle anaplaziem je nízka [17, 18].

Záver

Na základe zistenia zastúpenia patogénov so špecifickou asociáciou k hosťiteľom sme potvrdili druhovú skladbu živočíchov, ktoré sú dominantnými hosťiteľmi kliešťov v sledovanom habitate. Pozorovali sme dilučný efekt u borélií v dôsledku prekrmovania všetkých štádií kliešťov na lokálnej populácii srnca lesného, ktorý je nekompetentným

rezervoárovým hostiteľom pre tento patogén a dokázali sme jeho významnú úlohu ako rezervoára pre *A. phagocytophilum*.

PodĎakovanie

Táto štúdia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Vývoj diagnostických postupov pre detekciu patogénov prenášaných kliešťami a postupov na prípravu vakcín proti kliešťom, (kód ITMS: 26240220044), spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Margos G., Vollmer S. A., Ogden N. H., et al. (2011) *Infect. Genet. Evol.* 11 (7), p. 1545
- [2] Rauter C., Hartung T. (2005) *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (11), p. 7203
- [3] Baranton G., Postic D., Saint Girons I., et al. (1992) *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, p. 378
- [4] Canica M. M., Nato F., Du Merle L., et al. (1993) *Scand J Infect. Dis.* 25, p. 441
- [5] Le Fleche A., Postic D., Girardet K., et al. (1997) *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, p. 921
- [6] Wang Q., Van Dam A. P., Dankert J. (1999) *J. Clin. Microbiol.* 37, p. 3025
- [7] Hanicová K., Taragelová V., Koci J., et al. (2003) *Appl. Environ. Microbiol.* 69, p. 2825
- [8] Richter D., Schlee D. B., Matuschka F. R. (2003) *Emerg. Infect. Dis.* 9, p. 697
- [9] Hulínská D., Votýpka J., Kríz B., et al. (2007) *Folia Microbiol.* 52, p. 315
- [10] Margos G., Vollmer S. A., Cornet M., et al. (2009) *Appl. Environ. Microbiol.* 75(16), p. 5410
- [11] Stuen S. (2007) *Vet. Res. Commun.* 31 (1), p. 79
- [12] Liz J. S., Sumner J. W., Pfister K., et al. (2002) *J. Clin. Microbiol.* 40, p. 892
- [13] Derdáková M., Beati L., Peřko B., et al. (2003) *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (1), p. 509
- [14] Courtney J. W., Kostelnik L. M., Zeidner N. S., et al. (2004) *J. Clin. Microbiol.* 42 (7), p. 3164
- [15] Hubálek Z., Halouzka J. (1998) *Parasitol. Res* 84, p. 167
- [16] Kurtenbach K., De Michelis S., Etti S., et al. (2002) *Trends. Microbiol.* 10 (2), p. 74
- [17] Hildebrandt A., Franke J., Meier F., et al. (2010) *Ticks. Tick. Borne. Dis.* 1, p. 105
- [18] Skotarczak B., Rymaszewska A., Wodecka B., et al. (2006) *Ann. Agric. Environ. Med.* 13, p. 21

Molekulové mechanizmy neuroendokrinnnej regulácie správania a vývinu hmyzu

Daniel Čižmár, Ladislav Roller, Dušan Žitňan

Slovenská akadémia vied, Ústav zoológie, Odd. molekulárnej fyziológie, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovenská republika; daniel.cizmar@savba.sk

Abstrakt

In this work we used *in situ* hybridization and immunohistochemistry to analyze expression patterns of two neuropeptides in *Bombyx mori*, calcitonin-diuretic hormone (CT-DH) and CCH2. These neuropeptides are produced by neurons expressing receptors for ecdysis triggering hormones (ETHR) which suggests their role at ecdysis. Interestingly, we found significant sex-specific differences in expression of CT-DH during metamorphosis; males develop a large cluster of neurons in the terminal abdominal ganglion (TAG), while these neurons completely disappear in females. We showed that this neuronal cluster innervates the male accessory glands. We also identified similar neurons producing a neuropeptide CCH2 in the TAG, but they did not show intersexual differences. For functional studies of these neuronal networks we characterized promoters for both neuropeptides using recombinant baculoviruses. Our data indicate that identified neuronal clusters expressing CT-DH and CCH2 are activated during adult eclosion to play an important role in insect reproduction.

Kľúčové slová: CT-DH, CCH2, *Bombyx mori*, akcesorické žľazy, centrálny nervový systém

Úvod a formulácia cieľa

Kmeň článkonožcov (*Arthropoda*) pokrýva asi 80% všetkej diverzity živočíchov na Zemi, pričom jednoznačne najúspešnejšou terestrickou skupinou článkonožcov je hmyz. Za svoju úspešnosť vďaka hlavne efektívnej vývinovej a rozmnožovacej stratégii a evolučne plastickej segmentovanej stavbe tela. Keďže chitínový exoskelet, limituje ďalšiu rast, musí sa kutikula medzi jednotlivými štádiami pravidelne vymieňať. Tento zložitý fyziologicko-behaviorálny proces sa nazýva ekdýzia.

Cyklus zvliekania pozostáva z niekoľkých krokov. Po predchádzajúcom zvliekaní nasleduje fáza kŕmenia a rastu. Zahájenie prípravnej fázy zvliekania je indukované zvýšenou hladinou ekdysteroidov, ktorá reguluje expresiu génov potrebných pre reguláciu ekdýzie, a ďalší vývin jedinca (syntéza novej kutikuly). Samotné zvliekanie je podmienené poklesom hladiny ekdysteroidov a sekréciou peptidových hormónov kontrolujúcich ekdyziálnu sekvenciu. Post-ekdyziálne procesy zahŕňajú expanziu, sklerotizáciu a melanizáciu novej kutikuly [1].

Jedným z dôležitých procesov, ktorý je indukovaný vylúčením ekdysteroidov do hemolymfy, je expresia génu kódujúceho preekdýziotropný a ekdýziotropný hormón (PETH, ETH) v endokrinných Inka bunkách [2]. Ekdysteroidy zároveň vyvolávajú expresiu ETH receptorov v CNS a spôsobujú senzitivitu nervového systému na tieto hormóny. Receptory

pre ETH boli prvýkrát identifikované u *D. melanogaster*, pričom boli popísané dva subtypy ETHR-A a ETHR-B, vznikajúce alternatívnym zostrihom ETHR génu [3]. Pomocou *in situ* hybridizácie bolo zistené, že ETHR-A a ETHR-B sú produkované v odlišných skupinách neurónov. Zatiaľ čo väčšina ETHR-A neurónov produkuje neuropeptidy regulujúce jednotlivé fázy ekdyzie [4], produkty ETHR-B neurónov neboli doteraz identifikované. Keďže sa tieto subtypy odlišujú aj v afinite k ligandu, pričom ETHR-B uprednostňuje PETH pred ETH, je pravdepodobné, že každý receptor sa podieľa na aktivácii odlišnej fázy ekdyziálneho správania [3].

V našej práci sa venujeme identifikácii expresie neuropeptidov calcitonín-diuretický hormón (CT-DH) a CCH2. Okrem iného sú tieto neuropeptidy exprimované v mediálnych proktodeálnych neurónoch terminálneho ganglia, ktoré produkujú aj ETHR-B receptor. Uvedené neuróny sa inervujú zadné črevo lariev a po metamorfóze inervujú akcesorické žľazy samcov.

Akcesorické žľazy sú prídavné pohlavné orgány, produkujúce seminálne tekutiny zodpovedné za maturáciu a výživu spermií a modulujúce fyziológiu a správanie samíc [5]. Za ovplyvnenie správania samíc sú zodpovedné peptidy sekretované v akcesorických žľazách, napr. feromónostatický peptid u *H. zea* inhibuje po spárení produkciu feromónov [6], sex peptid u *D. melanogaster* zvyšuje po spárení u samice príjem potravy [7]. Pre pochopenie neurohumorálnej regulácie akcesorických žliaz sme sa rozhodli jednak charakterizovať expresiu CCH2 a CT-DH naprieč jednotlivými vývinovými štádiami, a zároveň identifikovať promótor pre tieto gény prostredníctvom bakulovírusov. Identifikácia promótorov by nám v budúcnosti umožňovala ektopicky exprimovať ETH receptory v týchto bunkách, a tým prispieť k poznaniu ich funkcie.

Materiál a metódy

Na hodnotenie časových a priestorových zmien expresie vybraných peptidov sme použili kombináciu metód *in situ* hybridizácie a imunohistochemického farbenia. Na *in situ* hybridizáciu boli nervové pásy z jedincov oboch pohlaví a jednotlivých štádií boli izolované vo fyziologickom roztoku a následne fixované v 4% paraformaldehyde v PBS. Príslušný transkript sa detegoval digoxigenín-značenými próbami odvodenými z čítacieho rámca génov CCH2 a CT-DH.

Akcesorické žľazy boli izolované z dospelých samcov, a po fixácii farbené primárnymi polyklonálnymi protilátkami proti CT-DH (králičia, 1:1000) a MIP (myšacia, 1:1000). Primárne protilátky boli detegované fluorescenčne značenými sekundárnymi protilátkami

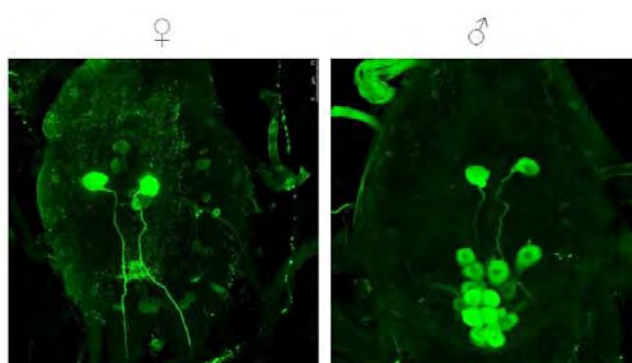
(oslie antisérum proti králičím/myšacím protilátkam, 1:1000). Obdobne boli farbené aj akcesorické žľazy dospelých samcov a nervové pásy po *in situ* hybridizácii.

Na identifikáciu promótoru génu CT-DH bol použitý komerčný Bac-to-Bac[®] expresný systém (Invitrogen). Promótorovú oblasť sme identifikovali *in silico* a promótorový fragment veľkosti 900 bp sme amplifikovali z genómovej DNA pomocou PCR. Sekvencia fragmentov bola overená sekvenovaním a následne boli klonované cez *Bam*HI a *Nco*I reštrikčné miesta do vektora pFastBac[™] vo fúzii s GFP. Rekombinantný vektor bol transformovaný do *E. coli* buniek MAX Efficiency[®] DH10Bac[™]. Tieto bunky nesú bakulovírusovú DNA a *helper* plazmid kódujúci transpozázu, ktorá zabezpečí transpozíciu nášho konštruktu do bakulovírusovej DNA. Rekombinantný bakmid bol overený PCR reakciami podľa návodu výrobcu (Invitrogen). Hmyzie bunky Sf9 boli transfekované rekombinantným bakmidom podľa návodu výrobcu, a na dosiahnutie dostatočného titra boli infekcie pravidelne opakované na čerstvých Sf9 bunkách. Po niekoľkých infekciách boli larvy IV. až V. instaru *B. mori* napichané 15 μ l média s rekombinantným vírusom. Po dostatočnom rozšírení infekcie boli larvy vypitvané a sledované pod fluorescenčnou lupou.

Obdobný postup bol použitý aj pri identifikácii CCH2 promótoru. Keďže sa štart kodón v tomto prípade nachádzal až v 2. exóne, bol promótorový fragment (zahŕňajúci aj počiatok transkripcie a 5' UTR) amplifikovaný ako 2 fragmenty, ktoré boli následne spojené pomocou PCR reakcie. Takto sme získali promótorový fragment CCH2 o veľkosti 1400 bp.

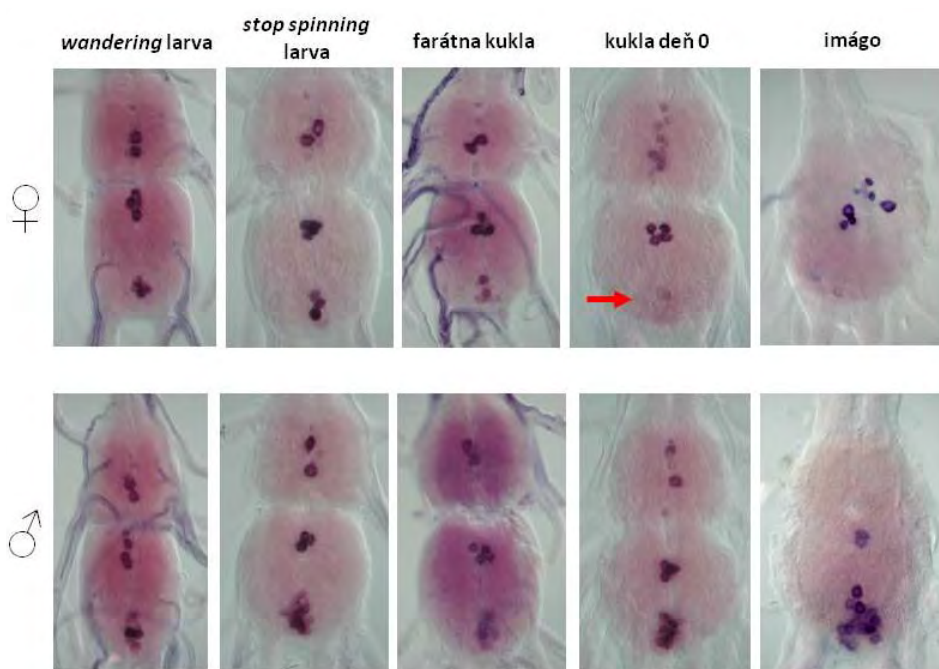
Výsledky a diskusia

Imunohistochemickým farbením pomocou CT-DH protilátok sme odhalili pohlavné rozdiely v expresii CT-DH v TAG u imág. Mediálny proktodeálny zhluk neurónov pozorovaný v terminálnom gangliu samcov sa u samíc nevyskytoval (Obr. 1).



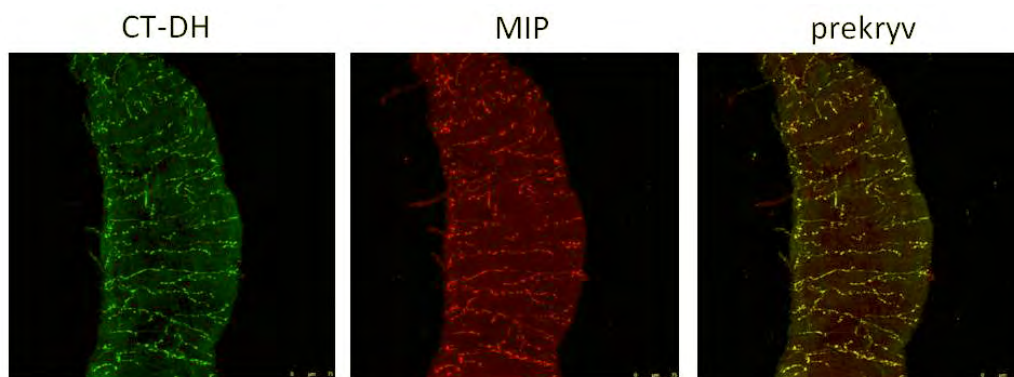
Obr. 1 Porovnanie expresie CT-DH v terminálnom abdominálnom gangliu (TAG) dospelých samíc a samcov – imunohistochemické farbenie protilátkami proti CT-DH

Farbenia u lariev však takéto zmeny nedokumentovali. Preto sme sa rozhodli použiť sériu farbení u viacerých, na seba nadväzujúcich štádií za účelom zdokumentovania zmien expresie počas ontogenézy (Obr. 2). Pozorovali sme, že po kuklovej ekdýzii začína u samíc postupné utlmenie expresie CT-DH v terminálnom zhluku. U samcov naopak dochádza ku zmnoženiu buniek exprimujúcich CT-DH. Či sa jedná len o jednoduchú zmenu expresie, alebo tieto bunky u samíc počas metamorfózy odumierajú (podstupujú apoptózu), bude treba v budúcnosti dokázať ďalšími experimentmi.



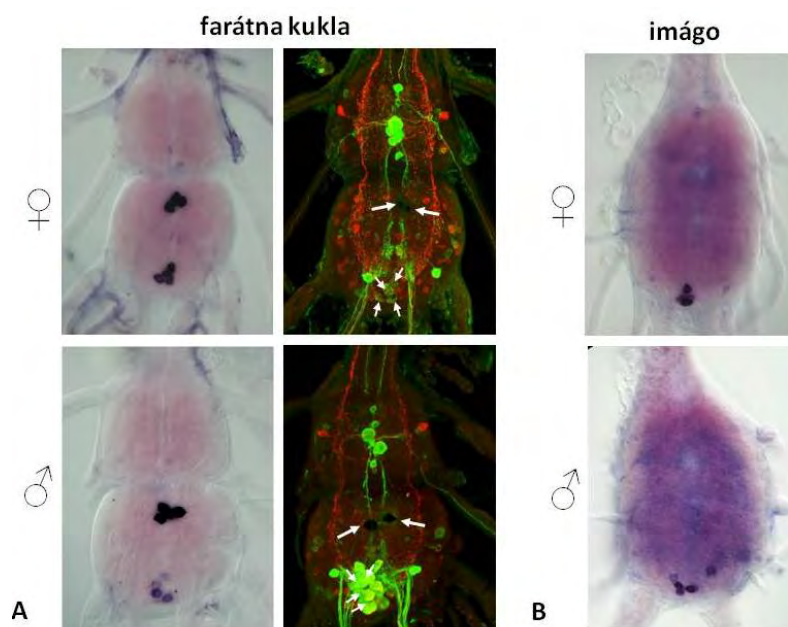
Obr. 2 Zmena expresie CT-DH v TAG v sekvencii niektorých štádií – Prítomnosť CT-DH transkriptu je detegovaná pomocou *in situ* hybridizácie. Červená šípka označuje slabnuci signál v terminálnom zhluku neurónov u samíc

Keďže uvedená skupina neurónov, typická pre samcov, vysiela axóny do terminálneho nervu, ďalšou úlohou bolo zistiť, či sú samčie pohlavné orgány inervované týmito neurónmi. Imunohistochemické farbenia pomocou CT-DH a MIP protilátok dokázali, že akcesorické žľazy samcov sú inervované neurónmi produkujúcimi MIP a CT-DH (Obr. 3) Gény pre obidva neuropeptidy sú exprimované v zhluku neurónov v TAG.



Obr. 3 Inervácia akcesorických žliaz samcov – Imunohistochemické farbenie ukazuje, že akcesorické žlazy sú inervované neurónmi produkujúcimi neuropeptidy CT-DH a MIP

Ďalší peptid, ktorý sa exprimuje v uvedenej oblasti terminálneho ganglia, je CCH2. Jedná sa o nový peptid s bližšie neznámou funkciou. Využitím techniky *in situ* hybridizácie sme detegovali produkciu cDNA pre CCH2 v subpopulácii buniek TAG. Medzipohlavné rozdiely sme v prípade CCH2 nedokázali (Obr. 4A). Kombináciou s imunohistochemickým farbením sme však dokázali kolokalizáciu s CCH2, MIP a CT-DH u farátnej kukly (Obr. 4B). Bunky produkujúce CCH2 sú teda subpopuláciou CT-DH a MIP neurónov. Podobný experiment je však treba zopakovať na dospelých samiciach, nakoľko poznáme osud CT-DH neurónov u tohto štádia.



Obr. 4 Expresia CCH2 v terminálnom gangliu – (A) Detekcia transkriptu pomocou *in situ* hybridizácie a imunohistochemické farbenie s protilátkami proti CT-DH (zelená) a MIP (červená). Biele šípky označujú bunky s kolokalizáciou CCH2 s CT-DH a MIP. (B) *In situ* hybridizácia CCH2 u imág

Záver

Uvedené výsledky odhalili intersexuálne rozdiely v expresii neuropeptidu CT-DH a jeho zmeny počas ontogenézy. Naznačili tiež možnú úlohu tohto peptidu v regulácii prídavných pohlavných žliaz samcov. Podarilo sa nám taktiež popísať expresiu CCH2 a jeho kolokalizáciu s ďalšími neuropeptidmi.

Pod'akovanie

Práca bola podporená grantmi NIH USA GM67310, APVV 0827-11 a VEGA 2/0132/09.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Žitňan D., Adams M. E. (2012) Neuroendocrine regulation of ecdysis. *Insect Endocrinology*, Elsevier, London, p. 253
- [2] Žitňan D., Ross L. S., Žitňanová I., et al. (1999) *Neuron*. 23, p. 523
- [3] Park Y., Kim Y.-J., Dupriez V., et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, p. 17710
- [4] Kim Y.-J., Žitňan D., Cho K.-H., et al. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103(38), p. 14211
- [5] Happ G. M. (1984) Structure and development of male accessory glands in insects. *Insect Ultrastructure*. Plenum Press, USA, p. 365
- [6] Kingan T. G., Bodnar W. M., Raina A. K., et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92(11), p. 5082
- [7] Carvalho G. B., Kapahi P., Anderson D.J., et al. (2006) *Curr. Biol.* 16, p. 692

Druhová identifikácia akvatických izolátov *Enterobacter cloacae* molekulárno-biologickými metódami a stanovenie ich citlivosti na vybrané antimikrobiálne látky

Zsófia Csáky¹, Alena Donauerová¹, Barbora Gaálová², Dana Micháľková-Papajová¹,
Milan Seman²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava 4, Slovensko; misscsaky@gmail.com

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava 4, Slovensko

Abstrakt

Speleological research in Slovakia focuses mainly on obtaining information about morphology and genesis of caves, karst phenomena and the state and functionality of the cave ecosystem. Extensive surveys are being carried out mainly in the Slovak Karst caves. Microorganisms, especially bacteria are an essential component of the cave biota. The aim of presented work was to study the properties of the genus *Enterobacter* aquatic isolates originating from karst waters of the Milada, Gombasecká and Domica caves. All of the 13 isolates tested have been identified as *Enterobacter cloacae*, which is clinically the most significant species of the genus *Enterobacter*. The isolates were genetically very variable. All of them were resistant to ampicillin and sensitive to cefepime, 11 isolates were resistant to amoxicillin, 9 to cefazolin, 5 to ceftazidime and 1 to cefamandole, aztreonam and ofloxacin. There is no doubt about how vulnerable karst formations are, therefore strict safeguards must be taken in order to maintain the cave environment and internal natural communities.

Kľúčové slová: *E. cloacae*; krasové vody; druhová identifikácia; citlivosť na antibiotiká

Úvod a formulácia cieľa

Mikroorganizmy v jaskyniach kolonizujú rôzne habitaty, vyskytujú sa na skalách a stenách jaskýň, vo vode, pôde, vo vzduchu, v sedimentoch a na rôznych sintrových útvaroch. Dôkazom existencie týchto baktérií je ich aktivita, celý rad chemických procesov, ktoré súvisia s metabolizmom a ktoré sa prejavujú napr. tvorbou typických makroskopických štruktúr, často rôzne sfarbených, rozpúšťaním a vyzrážaním minerálov, biokoróziou jaskynnej výzdoby.

Doteraz najvýznamnejšie výskumy v oblasti jaskynnej mikrobiológie na Slovensku prebiehali v jaskyniach Slovenského krasu [1, 2]. Povrchová a podzemná voda významne ovplyvňuje nielen jaskyne Slovenského krasu, ale aj celé územie tohto regiónu. Predstavuje významnú strategickú surovinu pre zásobovanie obyvateľstva pitnou vodou. Potreba výskumu krasových vôd je preto veľmi veľká [3].

Enterobaktery sú fakultatívne anaeróbne Gram-negatívne tyčinkovité baktérie. Môžu byť súčasťou prirodzenej mikroflóry živočíchov a človeka, ale vyskytujú sa aj v prostredí – v pôde, vo vode a na rôznych druhoch rastlín [4]. Ich prítomnosť bola zistená aj vo vodách

jaskýň Slovenského krasu, čo naznačuje možnosť fekálneho znečistenia tohto prostredia [5]. Zástupcovia rodu *Enterobacter* môžu vyvolávať oportúnne infekcie najmä u dlhodobo hospitalizovaných a imunokompromitovaných pacientov. Spôsobujú napr. gastrointestinálne a urinárne infekcie, septikémie, endokarditídy, septické artritídy, osteomyelitídy, infekcie chirurgických rán. Najčastejšie je z klinického materiálu izolovaný druh *Enterobacter cloacae*. Klinicky významnou vlastnosťou týchto baktérií je schopnosť produkcie rôznych typov beta-laktamáz, vďaka ktorým sa stávajú rezistentnými proti rôznym beta-laktámovým antibiotikám (penicilíny, cefalosporíny, monobaktámy, karbapenémy) [6].

Cieľom prezentovanej práce bola druhová identifikácia akvatických izolátov rodu *Enterobacter* pochádzajúcich z vôd jaskýň Slovenského krasu, stanovenie ich príbuznosti a citlivosti na vybrané klinicky používané antimikrobiálne liečivá.

Materiál a metódy

Testovaný súbor tvorilo 13 akvatických izolátov, ktoré boli izolované z jaskynných vôd Slovenského krasu (jaskyňa Milada, Gombasecká jaskyňa, jaskyňa Domic) v období rokov 2007-2008. Študované kmene izoloval doc. Seman so súhlasom Správy slovenských jaskýň v rámci riešenia projektu Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky VEGA 1/4043/07 "Hydrogeochemia a mikrobiológia vôd jaskynných systémov".

Ako kontrola bol použitý štandardný kmeň *Enterobacter cloacae* CCM 1903 (Česká zbierka mikroorganizmov, Brno, Česká republika).

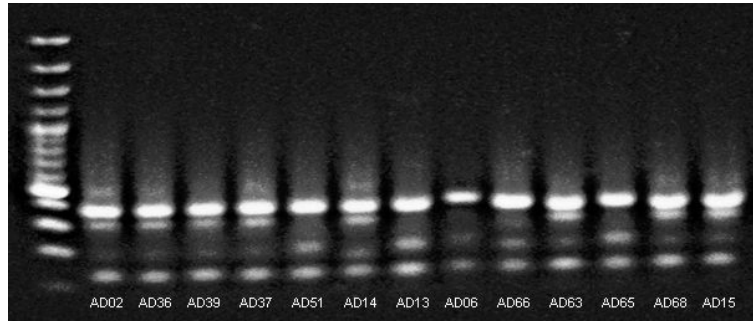
Testované izoláty boli identifikované použitím biochemickej diagnostickej súpravy ENTEROtest24 (Erba-Lachema, Česká republika). Pre potvrdenie druhovej identifikácie boli použité molekulárno-biologické metódy tDNA PCR [7] a restričná analýza génu kódujúceho 16S rRNA [8]. Pre epidemiologickú typizáciu testovaných izolátov bola použitá metóda ERIC PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR) [9].

Citlivosť testovaných akvatických izolátov na vybrané antiinfekčné liečivá (ampicilín, amoxicilín, cefazolín, cefamandol, ceftazidím, cefepím, aztreonam, ofloxacín) bola stanovená štandardnou diskovou difúznou metódou podľa CLSI [10]. Pre identifikáciu producentov ESBL bola použitá štandardná metóda kombinovaných diskov [10] a dvojité diskové difúzne testy [11].

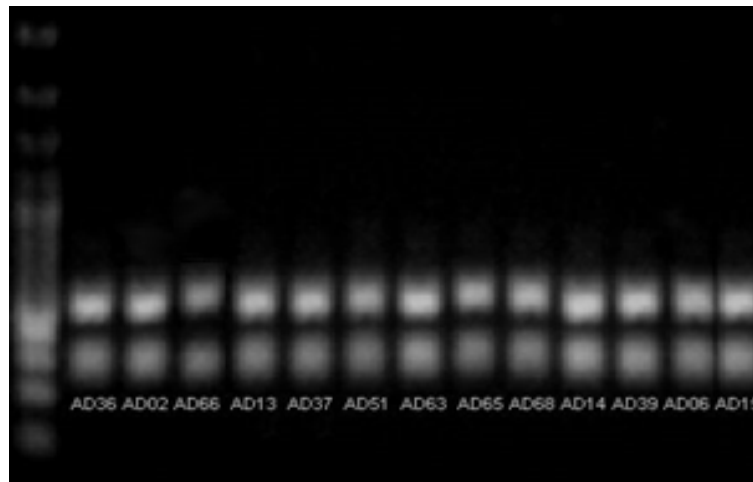
Výsledky a diskusia

Pomocou biochemickej diagnostickej súpravy ENTEROtest24 (Erba-Lachema, Česká republika) boli všetky testované akvatické izoláty identifikované ako *Enterobacter cloacae*.

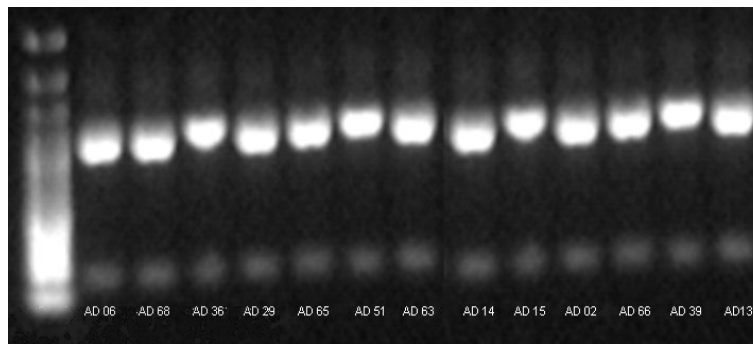
Druhovú identifikáciu bola potvrdená metódou tDNA PCR (**Obr. 1**) [7] aj restričnou analýzou časti génu kódujúceho 16S rRNA použitím enzýmov *DdeI* (**Obr. 2**) a *BstBI* (**Obr. 3**) [8].



Obr. 1 Výsledky druhovej identifikácie testovaných akvatických izolátov *Enterobacter cloacae* metódou tDNA PCR [7]



Obr. 2 Výsledky druhovej identifikácie testovaných akvatických izolátov *Enterobacter cloacae* restričnou analýzou časti génu kódujúceho 16S rRNA použitím enzýmu *DdeI* [8]



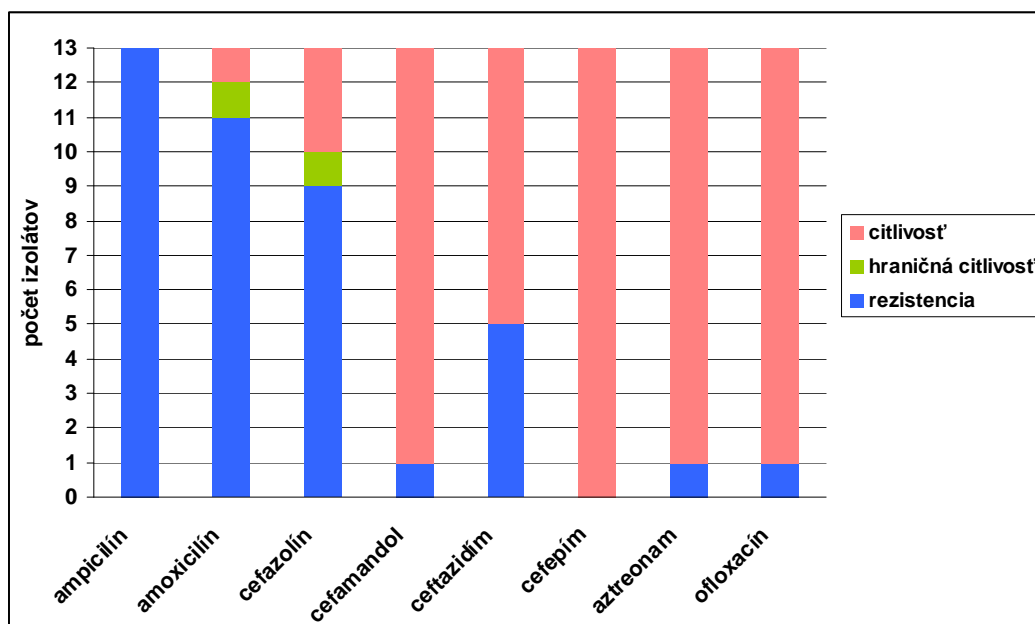
Obr. 3 Výsledky druhovej identifikácie testovaných akvatických izolátov *Enterobacter cloacae* restričnou analýzou časti génu kódujúceho 16S rRNA použitím enzýmu *BstBI* [8]

V testovanom súbore 13 akvatických izolátov bolo metódou ERIC PCR [9] zistených 11 rôznych profilov (označené ERIC1 až ERIC11), pričom len profil ERIC1 sa vyskytoval súčasne u viacerých izolátov (AD02, AD14, AD15) (**Tab. 1**). Štandardný kmeň *Enterobacter cloacae* CCM 1903 vykazoval profil ERIC2. Výsledky epidemiologickej typizácie dokazujú vysokú genetickú variabilitu testovaných izolátov *Enterobacter cloacae*.

Tab. 1 Výsledky epidemiologickej typizácie testovaných akvatických izolátov *Enterobacter cloacae* metódou ERIC PCR [9]

Profil ERIC PCR	Akvatický izolát <i>Enterobacter cloacae</i>
ERIC1	AD02, AD14, AD15
ERIC2	AD66
ERIC3	AD39
ERIC4	AD13
ERIC5	AD65
ERIC6	AD51
ERIC7	AD68
ERIC8	AD63
ERIC9	AD36
ERIC10	AD06
ERIC11	AD37

Citlivosť testovaných akvatických izolátov *Enterobacter cloacae* na liečivá ampicilín, amoxicilín, cefazolín, cefamandol, ceftazidím, cefepím, aztreonam a ofloxacín bola stanovená štandardnou diskovou difúznou metódou podľa CLSI [10]. Všetky izoláty boli rezistentné proti ampicilínu. V testovanom súbore 13 akvatických izolátov *Enterobacter cloacae* bolo proti amoxicilínu rezistentných 11 izolátov, proti cefazolínu 9 izolátov a proti ceftazidímu 5 izolátov. Proti cefamandolu, aztreonamu a ofloxacínu bol rezistentný vždy len jeden izolát. Všetky testované izoláty boli citlivé na cefalosporín 4. generácie cefepím (**Obr. 4**).



Ob. 4 Výsledky stanovenia citlivosti testovaných akvatických izolátov *Enterobacter cloacae* na antiinfekčné liečivá štandardnou diskovou difúznou metódou podľa CLSI [10]

Rezistencia proti penicilínom, cefalosporínom a monobaktámom je u zástupcov čeľade *Enterobacteriaceae*, vrátane *Enterobacter* spp. najčastejšie spôsobená produkciou rôznych typov beta-laktamáz. Pre identifikáciu producentov ESBL boli použité 2 metódy: štandardná metóda kombinovaných diskov [10] a dvojité diskový difúzny test [11]. Pomocou použitých metód nebola produkcia ESBL dokázaná u žiadneho z 13 testovaných akvatických izolátov *Enterobacter cloacae*.

Záver

Výskyt *Enterobacter cloacae* rezistentných proti antiinfekčným liečivám v jaskynnom prostredí naznačuje možnosť znečistenia jaskynných vôd antropogénnou činnosťou (napr. poľnohospodárstvo) v okolí jaskyne a následnou kontamináciou podzemnej vody v dôsledku privalových zrážok. Zachovanie jaskynného prostredia v pôvodnom stave so všetkými jeho prírodnými zložkami je veľmi dôležité. Preto cieľom ochrany jaskýň musí byť minimalizácia negatívnych dopadov činnosti človeka a iných vonkajších vplyvov na prírodné prostredie v jaskyniach.

Pod'akovanie

Projekt bol realizovaný s finančnou podporou grantu VEGA č. 1/0320/09 a VEGA č. 1/0899/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Seman M., Gaálová B. (2009) Aragonit 14, p. 42
- [2] Seman M., Gaálová B. (2009) Aragonit 14, p. 173
- [3] Kilík J. (2010) Aragonit 15, p. 11
- [4] Hart C. A. (2006) Princ. Pract. Clin. Bacteriol. 2, p. 377
- [5] Haviarová D. (2007) Podzemná voda 2, p. 153
- [6] eMedicine [Citované: 1. marec 2013] <<http://www.emedicine.com/med/topic678.htm>>
- [7] Clementino M. M., Filippis I., Nascimento C. R., et al. (2001) J. Clin. Microbiol. 39, p. 3865
- [8] Lu J. J., Perng C. L., Lee S. Y., et al. (2000) J. Clin. Microbiol. 38, p. 2076
- [9] Lee S. H., Kim J. Y., Shin S. H., et al. (2003) J. Clin. Microbiol. 41, p. 2477
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2007) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Approved Standard M2-A9, PA, USA
- [11] Jarlier V., Nicolas M., Fournier G., et al. (1988) Rev. Infect. Dis. 10, p. 867

Vplyv delécie génu *PDR16* na susceptibilitu patogénnych kvasiniek *Candida glabrata* a akumuláciu xenobiotík

Hana Čuláková¹, Július Šubík², Yvetta Gbelská¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie, Mlynská dolina B2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, culakova.hana@gmail.com

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, Mlynská dolina B1, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;

Abstrakt

Candida glabrata is the second most prevalent human yeast pathogen. It is relatively resistant toazole antimycotics used for treating *Candida* infections. This study was aimed at the elucidation of the role of the *CgPDR16* gene in the control of drug resistance in *C. glabrata*. Using mutant strain deleted in *CgPDR16* we observed that despite the enhanced susceptibility to metabolic inhibitors its cells displayed an unaltered sensitivity to several oxidants inducing oxidative stress. Deletion of the *CgPDR16* gene did not affect even the chemosensitizing activity of oxidant CTBT. Compared with the wild type strain, deenergized mutant cells were found to accumulate more rhodamine 6G. The results indicate that *CgPdr16p* plays a role in drug resistance by altering drug accumulation probably due to changes in the lipid composition and properties of *C. glabrata* membranes.

KLúčové slová: *Candida glabrata*; oxidanty; CTBT; scitlivenie; rhodamin 6G; akumulácia.

Úvod a formulácia cieľa

Počas niekoľkých posledných dekád sa dramaticky zmenil pohľad na kvasinku *Candida glabrata*. Nepatogénny saprofyt, ktorý je súčasťou prirodzenej mikroflóry zdravých jedincov, sa stal hneď po *Candida albicans* druhou najčastejšou príčinou kvasinkových infekcií [1, 2]. V prípade infekcií vyvolaných kvasinkou *C. glabrata* býva často dôvodom problematickej liečby jej vysoká vrodená odolnosť voči niektorým antifungálnym liečivám, hlavne azolovým antimykotikám [3], ktoré sú liekom prvej voľby práve pri kandidózach [2].

Citlivosť kvasiniek na antifungálne látky je pod kontrolou siete génov PDR (pleiotropic drug resistance) [4 - 8]. Do siete PDR patria gény kódujúce transkripcné regulátory, membránové transportné proteíny [9, 10] a tiež gény, ktorých produkty sa podieľajú na metabolizme rozličných lipidov, ktoré môžu ovplyvňovať zloženie a vlastnosti bunkových membrán [10, 11, 12]. Do poslednej spomínanej skupiny génov PDR patrí aj gén *PDR16*, ktorého produkt patrí do skupiny proteínov zúčastňujúcich sa intracelulárneho transportu fosfatidylinozitolu [10, 13]. Doterajšie výsledky naznačujú jeho účasť v rezistencii kvasiniek *C. glabrata* voči azolovým antimykotikám, nakoľko delécia génu *CgPDR16* sa prejavila zvýšením citlivosti buniek *C. glabrata* na flukonazol [14].

Cieľom tohto príspevku bolo porovnať citlivosť štandardného kmeňa *C. glabrata* a delečného mutanta v géne *CgPDR16* na rôzne metabolické inhibítory a oxidanty a zistiť, či sa citlivosť mutanta odlišuje pri použití kombinácie týchto dvoch skupín xenobiotík. Náplňou ďalších experimentov bolo tiež objasniť, či zmenená citlivosť delečného mutanta na metabolické inhibítory môže byť spôsobená ich zvýšenou akumuláciou v bunkách kvasiniek.

Materiál a metódy

Použité mikroorganizmy

V práci sa použili nasledovné kmene kvasinky *C. glabrata* [14].

Kmeňe so štandardným fenotypom (wt): BG14 (*Cgura3::Tn903Neo^r*); BG14 + pCgACU-5 (transformant s prázdnyim vektorom pCgACU-5 [*CgARS*, *CgCEN*, *CgURA3*, *Amp^r*]).

Delečné mutanty v géne *CgPDR16* (*pdrl6Δ*): *Cgpdrl6Δ* (*Cgpdrl6::Tn903Neo^r*); *Cgpdrl6Δ-U* (derivovaný *ura⁻* mutant); *Cgpdrl6Δ-U* + pCgACU-5 (transformant s prázdnyim vektorom pCgACU-5)

Analýza susceptibility kvasiniek na xenobiotiká diskovou difúznou metódou

Kultúra kvasiniek bola predkultivovaná 16 hodín v komplexnom glukózovom médiu (YPD), resp. 20 hodín v minimálnom glukózovom médiu (YNB) pri teplote 37°C a nariedená na koncentráciu 1.10^7 b/ml. Pomocou vatového tampónu sa nariedená kultúra naniesla na povrch pevného média YPD, resp. YNB. Po vsiaknutí suspenzie boli poukladané papierové disky s priemerom 6 mm, na ktoré sa nanieslo príslušné množstvo xenobiotika. Zóny inhibície rastu okolo disku boli odmerané po 48 hodinách kultivácie pri teplote 37 °C.

Analýza susceptibility kvasiniek na xenobiotiká kvapkovými testami

Kultúra kvasiniek bola predkultivovaná 16 hodín v komplexnom glukózovom médiu (YPD) pri teplote 37°C a nariedená na sériu koncentrácií 1.10^7 1.10^6 1.10^5 1.10^4 b/ml. Na pôdy s obsahom cykloheximidu (0, 1, 2, 4, 6, 8 µg/ml) bolo vykvapkaných 5 µl z jednotlivých suspenzií. Kultúry boli kultivované 48 hodín pri teplote 37 °C. Minimálna inhibičná koncentrácia bola vyhodnotená ako koncentrácia cykloheximidu, pri ktorej bol inhibovaný rast buniek v dvoch najvyšších riedeniach.

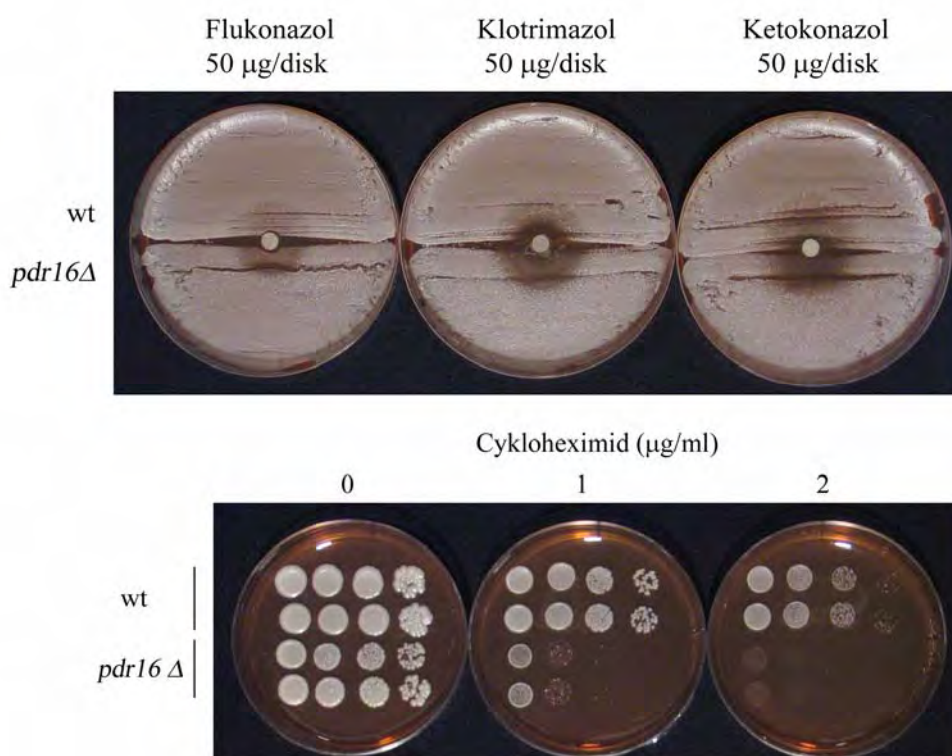
Analýza akumulácie xenobiotík v bunkách kvasiniek

Na porovnanie akumulácie xenobiotík u štandardného kmeňa a delečného mutanta bola použitá fluorescenčná sonda rhodamin 6G. Bunky *C. glabrata* boli predkultivované do exponenciálnej fázy, premyté v 50 mM roztoku HEPES (pH 7.0) a nariedené na koncentráciu 1.10^8 b/ml. Bunky boli ďalej inkubované v prítomnosti 5 mM 2-deoxyglukózy a 10 µM

rhodaminu 6G pri teplote 30 °C. V pravidelných časových intervaloch (po 2,5; 5; 10; 15; 20 minútach) bolo odoberaných 500 µl suspenzie a bunky boli sedimentované 2 minúty pri 9000 g a 2 °C. Následne bol obohratý supernatant, v ktorom sa spektrofluorometricky stanovil úbytok fluorescence v porovnaní s maximálnou hodnotou fluorescence 10 µM rhodaminu 6G. Fluorescencia próby bola meraná v čiernych platničkách pomocou spektrofluorometra TECAN pri nastavení vlnových dĺžok 529 nm (excitácia) a 553 nm (emisía) [13]. Hodnoty fluorescence jednotlivých vzoriek boli vyhodnotené graficky.

Výsledky a diskusia

Pri testovaní susceptability kvasiniek na vybrané metabolické inhibítory (azolové antimykotiká, cykloheximid) delečný mutant v gène *CgPDR16* vykazoval vyššiu citlivosť ako štandardný kmeň (Obr. 1).



Obr. 1 Delécia génu *CgPDR16* vedie k zvýšenej citlivosti kvasiniek k metabolickým inhibítorom

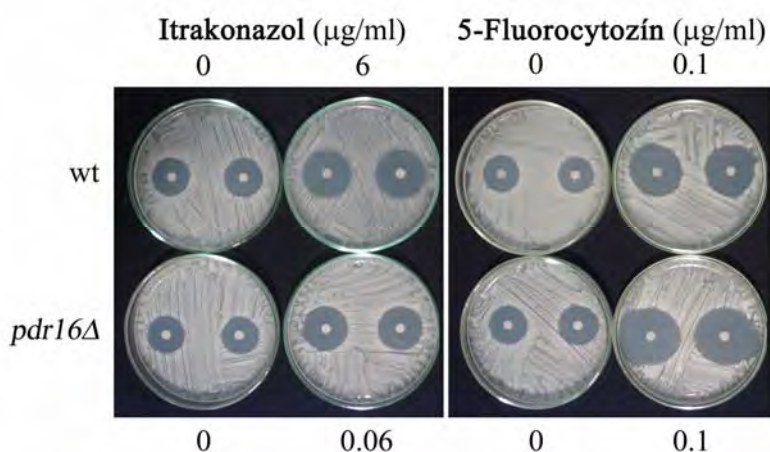
V prípade použitia oxidantov, ktoré v bunkách kvasiniek vyvolávajú tvorbu superoxidu a oxidačný stres (CTBT, paraquat, menadion) [15, 16], bola citlivosť delečného mutantu rovnaká ako u štandardného kmeňa (Tab. 1). Tieto výsledky ukazujú, že delécia génu

CgPDR16 pravdepodobne nemá vplyv na citlivosť kvasiniek *C. glabrata* na oxidačný stres.

Tab. 1 Delécia génu *CgPDR16* nezmení citlivosť kvasiniek na oxidanty

Kmeň	Priemer zóny inhibície (mm)		
	CTBT 48,4 µmol/disk	Paraquat 2,5 µmol/disk	Menadion 1,5 µmol/disk
BG14+ pCgACU-5 (wt)	18	13	14
Cgpdr16Δ-U + pCgACU-5 (<i>pdr16Δ</i>)	18	13	14

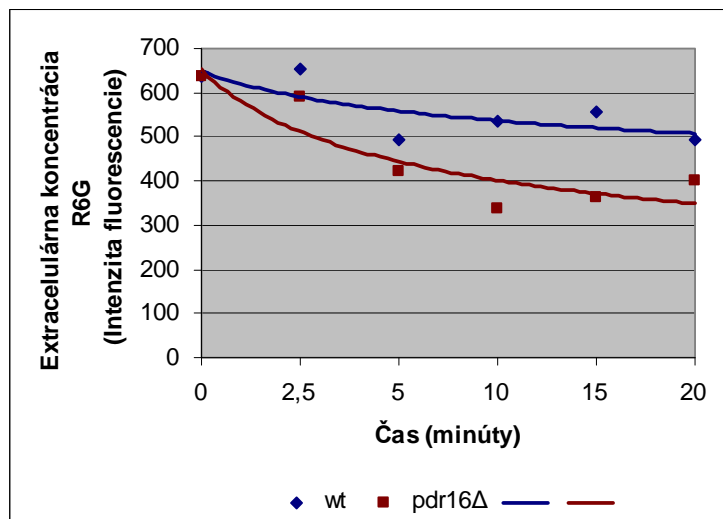
Pri koaplikácii metabolických inhibítorov (itakonazol, 5-fluorocytosín) súčasne s oxidantami (5 µg CTBT per disk) bol zaznamenaný scitlivovací efekt CTBT tak u štandardného kmeňa, ako aj u delečného mutanta v géne *CgPDR16*. Z výsledkov vyplýva, že delécia génu *CgPDR16* neovplyvňuje scitlivujúci účinok CTBT. Účinok CTBT pri koaplikácii so spomínanými metabolickými inhibítormi je znázornený na Obr. 2.



Obr. 2 Delécia génu *CgPDR16* nezabráni chemocitlivujúcemu účinku CTBT pri jeho koaplikácii s itakonazolom alebo 5-fluorocytosínom.

Pri sledovaní akumulácie rhodaminu 6G u štandardného kmeňa a delečného mutanta bola zaznamenaná jeho zvýšená akumulácia u delečného mutanta v géne *CgPDR16*. Ako znázorňuje Obr. 3, úbytok fluorescencie supernatantu je vyšší u delečného mutanta, čiže mutant akumuluje väčšie množstvo rhodaminu 6G ako štandardný kmeň. Zvýšená akumulácia u delečného mutanta by mohla naznačovať zmenu zloženia a permeability membrán kvasiniek po delécii génu *CgPDR16*. Zvýšená citlivosť na niektoré inhibítory metabolizmu a zvýšená akumulácia rhodaminu 6G v bunkách delečného mutanta boli zaznamenané aj u delečného mutanta v géne *ScPDR16* u príbuznej kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* [13]. Uvedené

poznatky naznačujú účasť génového produktu Pdr16p na zložení a vlastnostiach bunkových membrán kvasiniek, pretože práve zmenené vlastnosti membrán v dôsledku absencie Pdr16p môžu byť zodpovedné za zvýšenú citlivosť kvasiniek na antifungálne látky.



Obr. 3 Delécia génu *CgPDR16* zvyšuje akumuláciu rhodaminu 6G v bunkách kvasiniek.

Záver

Pri zmene citlivosti na metabolické inhibítory vyvolanej deléciou génu *CgPDR16* sa citlivosť kvasiniek na oxidanty nezmenila.

Delécia génu *CgPDR16* nezabránila chemoscitlivujúcemu účinku CTBT.

Za zvýšenú citlivosť delečného mutanta kvasiniek na metabolické inhibítory je pravdepodobne zodpovedná ich zvýšená akumulácia v bunkách mutanta spôsobená zmenou lipidového zloženia a vlastností bunkových membrán.

Pod'akovanie

Práca vznikla za podpory grantov APVV-0282-10, VEGA 1/0867/12 a Grantu UK 31/2012.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Pfaller M. A., Diekema D. J. (2007) Clin. Microbiol. Rev. 20(1), p. 133
- [2] Jandric Z., Schüller C. (2011) Future Microbiol. 6(12), p. 1475
- [3] Tscherner M., Schwarzmüller T., Kuchler K. (2011) Pharmaceuticals 4(1), p. 169
- [4] Balzi E., Goffeau A. (1995) J. Bioenerg. Biomembr. 27(1), p. 71

- [5] Roepe P. D., Wei L. Y., Hoffman M. M., et al. (1996) *J. Bioenerg. Biomembr.* 28(6), p. 541
- [6] Jungwirth H., Kuchler K. (2006) *FEBS Lett.* 580(4), p. 1131
- [7] Sá-Correia I., Santos S., Teixeira M., et al. (2009) *Trends Microbiol.* 17(1), p. 22
- [8] Cabrito T. R., Teixeira M. C., Singh A., et al. (2011) *Biochem. J.* 440(2), p. 195
- [9] Wolfger H., Mamnun Y. M., Kuchler K. (2001) *Res. Microbiol.* 152(3-4), p. 375
- [10] Griac P. (2007) *Biochim. Biophys. Acta* 1771(6), p. 737
- [11] Le Crom S., Devaux F., Marc P., et al. (2002) *Mol. Cell. Biol.* 22(8), p. 2642
- [12] Shahi P., Moye-Rowley W. S. (2009) *Biochim. Biophys. Acta* 1794(5), p. 852
- [13] van den Hazel H. B., Pichler H., do Valle Matta M. A., et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274(4), p. 1934
- [14] Kaur R., Castaño I., Cormack B. P. (2004) *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(5), p. 1600
- [15] Baťová M., Klobučníková V., Oblasová Z., et al. (2010) *BMC Genomics.* 11, p. 153
- [16] Wallace M. A., Bailey S., Fukuto J. M., et al. (2005) *Chem. Res. Toxicol.* 18(8), p. 1279.

Vplyv monoklonovej protilátky IVA-50 (anti-CD9) na väzbu spermíí na zonu pellucidu oocytov hovädzieho dobytká

Petra Cupperová, Jana Antalíková, Michal Simon, Ľubica Horovská

Slovenská akadémia vied, Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Imunogenetika, Moyzesova 61, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovenská republika; petra.cupperova@savba.sk

Abstrakt

CD9 molecule is a member of tetraspanin family. Its role in fertilization process is known, although detailed function of CD9 molecule in this process is not fully understood. The presence of CD9 has been described on the reproductive organs and gametes of human and some animal species. In our research we focused on expression of CD9 on bovine oocytes with zona pellucida and also on the influence of monoclonal antibody IVA-50 (anti-CD9) on sperms-oocyte binding. We have detected CD9 molecule on plasma membrane and for the first time on zona pellucida of maturated and non-maturated bovine oocytes. Inhibitory effect on sperm binding to the zona pellucida of the oocyte was also detected in comparison with isotype control.

Kľúčové slová: CD9; oocyt; väzba spermie na oocyt.

Úvod a formulácia cieľa

Oplodnenie je zložitý proces, ktorý pozostáva z mnohých komplexných bunkových a biochemických procesov, do ktorých je zapojených množstvo molekúl. Vyvrcholením je fúzia spermie a vajíčka a následne vytvorenie embrya [1]. Interakcia medzi gamétami a splynutie ich plazmatických membrán sú procesy, ktoré zahŕňajú účasť viacerých proteínov nachádzajúcich sa na povrchu vajíčka a spermie [2]. Medzi proteíny podieľajúce sa na procese oplodnenia patria aj niektoré CD molekuly, exprimované na tkanivách a bunkách samčieho a samičieho reprodukčného traktu. Medzi kandidátov zaraďujeme aj CD molekuly, ktoré patria do „rodiny“ tetraspanínov, integrínov a proteínov regulujúcich komplement [3].

CD9 molekula je 24-27kDa integrálny membránový glykoproteín a je členom superrodiny tetraspanínov. Bola detegovaná na plazmatickej membráne oocytov u myší [4,5,6] prasiat [7] a hovädzieho dobytká [8], na blastocystách u myší [5,9] a na endometriu epiteliálnych buniek myších [10], ľudských [11], bovinných [12] a ošípaných [13]. Na spermíách bola CD9 doposiaľ detegovaná u myší [14] a u ošípaných na spermíách nachádzajúcich sa v reprodukčnom trakte [13].

CD9 molekula sa zúčastňuje mnohých bunkových procesov, ale jej funkcia nie je ešte úplne objasnená. Z doterajších výsledkov vyplýva, že je multifunkčným proteínom, ktorý ovplyvňuje adhéziu buniek, proliferáciu a migráciu v imunitnom systéme [15]. Predošlé štúdie ukázali, že CD9 má kľúčovú úlohu v procese oplodnenia a to vo fúzii spermie a vajíčka alebo vo väzbe a fúzii spermie a vajíčka. [4,5,6]. Výsledky experimentov, v ktorých boli

oocyty opracované anti-CD9 protilátkou, ukazujú inhibíciu väzby a fúzie gamét u myši [16, 17, 18, 19]. Znížená väzba a fúzia bola dokázaná aj u ošípaných [7] a hovädzieho dobytká [8].

Cieľom tejto práce bolo určiť expresiu CD9 na intaktných bovinných oocytoch a otestovať vplyv protilátky pri väzbe spermíí na oocyty so zonou pellucidou, teda v experimentálnom systéme lepšie imitujúcom „*in vivo*“ podmienky fertilizácie.

Materiál a metódy

Monoklonovú protilátku (mAb) IVA-50 sme pripravili na Ústave biochémie a genetiky živočíchov SAV v Ivanke pri Dunaji štandardnou hybridómovou technikou [20].

Izolácia, selekcia a dozrievanie bovinných oocytov in vitro

Vaječníky odobraté od kráv porazených na bitúnku sme preniesli v termoske s fyziologickým roztokom - FR (0,9% NaCl (Sigma, SR)) pri teplote 30°C, pred spracovaním premyli 1-krát v 70% etanole (Slavus, SR) a 2-krát v teplom FR. Následne sme aspiráciou pomocou ihly (18G) a striekačky získavali oocyty s kumulárnymi bunkami z folikulov v priemere 2-8mm, preniesli do Petriho misiek a vyhľadávali pod svetelným mikroskopom Olympus SD30 (Olympus, Nemecko). Vhodné oocyty sme pomocou mikrokapiláry preniesli do maturačného média (médium TCM 199 + Earle's + GlutaMAX™ (Life Technologies, SR) s prídavkami 10% FCS, 0,05mg/ml gentamycínu (Biotech, SR), 0,025mol.l⁻¹ pyruvátu sodného (Sigma, SR), 5UI/ml HCG a 5UI/ml PMSG (Pluset (MiniTübe, SR)), ekvilibrovaného 2h pred použitím pri 39°C a vlhkej atmosfére s 5% obsahom CO₂ (CO₂ Inkubátor Binder 150, Nemecko). *In vitro* dozrievanie (do metafázy II) prebiehalo v 500µl kvapkách maturačného média v päť-jamkových doštičkách počas 24h pri teplote 39°C vo vlhkej atmosfére s 5% obsahom CO₂, 50 oocytov v kvapke. Pred ďalším spracovaním sme z oocytov odstránili kumulárne bunky vortexovaním 5min v médiu HEPES-TALP (destilovaná voda + 0,1138mol.l⁻¹ NaCl + 3,155.10⁻³mol.l⁻¹ KCl + 2,003.10⁻³mol.l⁻¹ NaHCO₃ + 2,667.10⁻³mol.l⁻¹ NaH₂PO₄ + 2,369.10⁻⁵mol.l⁻¹ Na laktát (60% sirup) + 0,01mol.l⁻¹ HEPES + 2,291.10⁻³mol.l⁻¹ CaCl₂.2H₂O + 5,002.10⁻⁵mol.l⁻¹ MgCl₂.6H₂O, s prídavkami 3mg.ml⁻¹ BSA, 8µl.ml⁻¹ 25mM pyruvátu sodného (Sigma, SR), 0,05mg/ml gentamycínu). Obsah skúmavky sme preniesli na Petriho misku a vyhľadávali očistené oocyty, ktoré sme ďalej spracovávali.

Nematurované oocyty sme zbavili kumulárných buniek vortexovaním v 500µl Hyaluronidáze TYPE IV-S from bovine testes (Sigma, SR) s koncentráciou 333µg.ml⁻¹. Následne sme očistené oocyty premyli 3-krát preložením z kvapky do kvapky HEPES-TALP.

Oocyty po odstránení kumulárných buniek sme preložili do 100-250µl kvapky

pronázy (35U (Roche, Nemecko)). Pre odstránenie zony pellucidy (ZP) sme oocyty pomaly nasávali a vypúšťali z pipety jednu minútu, počas druhej minúty sme ich vybrali pomocou mikrokapiláry do kvapky HEPES-TALP a 2-krát premyli preložením z kvapky do kvapky.

Nepriamy imunofluorescenčný test

Nematurované/maturované oocyty so ZP/bez ZP sme preniesli do 500µl kvapiek média s mAb IVA-50 (vlastná produkcia). Výsledné množstvo imunoglobulínu bolo 10µg na kvapku. V kontrolných skupinách sme protilátku nahradili imunoglobulínom IgG2a (EXBIO, ČR) v rovnakom množstve (izotypová kontrola). Všetky skupiny sme inkubovali pri teplote 39°C vo vlhkej atmosfére s 5% obsahom CO₂. Po inkubácii sme oocyty 3-krát premyli preložením z kvapky do kvapky HEPES-TALP, fixovali v 100µl kvapke 3,8% paraformaldehydu (MGP, SR) 15min, premyli ako v predošlom, preložili do 100µl kvapky SwAM/FITC (Sevac, ČR) (prasací imunoglobulín proti myšiemu imunoglobulínu konjugovaný s fluoresceín izotiokyanátom v riedení 1:40) a inkubovali 30min pri izbovej teplote v tme. Následne sme oocyty opäť 3-krát premyli a preložili na podložné sklíčku. Oocyty sme ohrančili kruhom z vazelíny, zakvapli prípravkom Vectashield-DAPI (Baria, ČR) a prikryli krycím sklíčkom. Reakcie sme vyhodnocovali pod epifluorescenčným mikroskopom LeicaDM5500 B s digitálnou kamerou Leica DFC340 FX pri 400 násobnom zväčšení s využitím Leica Advanced Fluorescence software (Leica Mikro, SR).

„Binding assay“ schopnosť spermii viazať sa na zonu pellucidu pri in vitro oplodnení

Spermie sme premyli v SP-TL médiu (MiniTübe, SR) temperovanom 2h pri 37°C pri 120xg 6min pri laboratórnej teplote 2-krát. Supernatant sme odsali a sediment sme rozsuspendovali v SP-TL médiu tak, aby sme po pridaní spermii do oplodňovacej kvapky dosiahli koncentráciu spermii 0,5.10⁶ na jednu oplodňovaciu kvapku (na 25 oocytov). Následne sme spermie stočili pri 245 x g 5min pri laboratórnej teplote, rozsuspendovali v príslušnom množstve IVF-TL (MiniTübe, SR) a pridávali k oocytom po 25µl na kvapku.

Maturované oocyty očistené od kumulárnych buniek sme rozdelili na skupiny. Prvú a druhú skupinu sme inkubovali 45min v kvapke maturačného média s 10µg a 5µg mAb IVA-50 a tretiu skupinu v kvapke maturačného média s 10µg izotypovej kontroly pri 39°C a vlhkej atmosfére s 5% obsahom CO₂. Oocyty sme potom premyli 2-krát preložením z kvapky do kvapky HEPES-TALP a 1-krát v kvapke IVF-TL a preložili do oplodňovacej kvapky s PHE (mix zložiek D-penicilamínu, hypotaurínu a epinefrínu (Sigma, SR)) a pridali príslušné množstvo spermii.

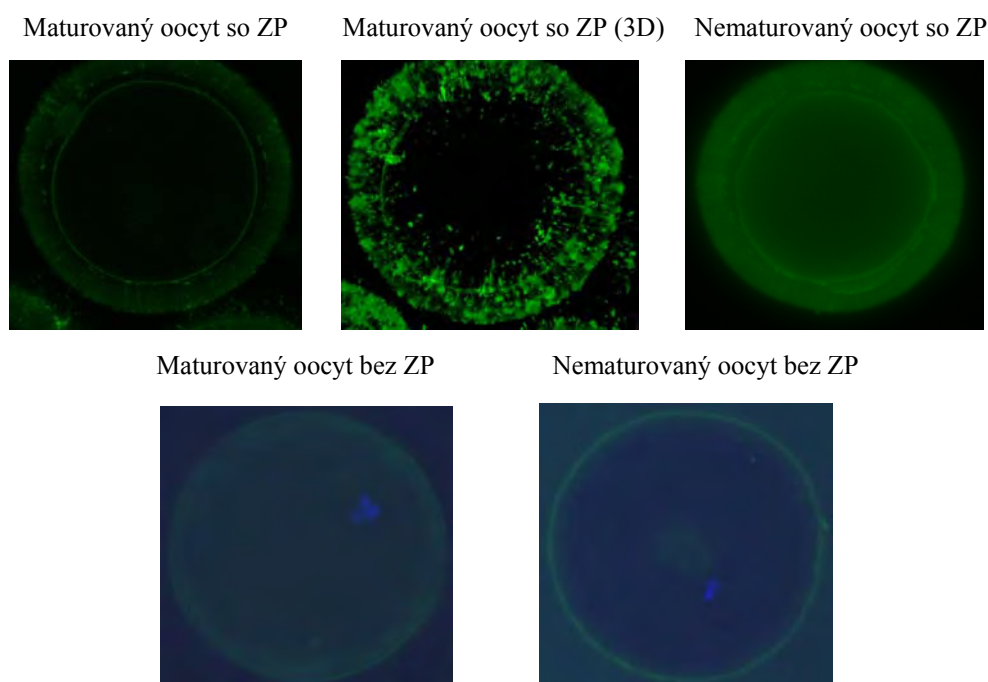
Gaméty sme inkubovali pri 39°C a vlhkej atmosfére s 5% obsahom CO₂, 15min.

Oocyty sme vybrali do kvapky HEPES-TALP, odstránili slabo naviazané spermie 3-krát preložením oocytov z kvapky do kvapky HEPES-TALP a fixovali v 100 μ l kvapke 3,8% paraformaldehydu 7-15min. Oocyty sme znova premyli 3-krát preložením z kvapky do kvapky HEPES-TALP a preložili na podložné sklíčko, spracovali a vyhodnotili rovnako ako v imunofluorescenčnom teste.

Experimentálne údaje sme vyhodnotili Mann-Whitney Rank Sum Testom s využitím programu Sigma Plot 10.0.

Výsledky a diskusia

IVA-50 v nepriamom imunofluorescenčnom teste výrazne reagovala s bovinými oocyty. Intenzívnu reakciu sme zaznamenali pri všetkých oocytoch na celej plazmatickej membráne rovnomerne a pri oocytoch so zonou pellucidou aj na nej (Obr. 1). Nepozorovali sme výrazné rozdiely medzi maturovanými a nematurovanými oocyty.



Obr. 1 Reakcia mAb IVA-50 na ooleme a ZP boviných oocytov v nepriamom imunofluorescenčnom teste

Expresia CD9 molekuly u hovädzieho dobytku bola doposiaľ popísaná len na plazmatickej membráne maturovaných oocytov bez ZP [8], my sme však po prvýkrát detegovali expresiu CD9 nielen na ooleme, ale aj na ZP maturovaných aj nematurovaných oocytov.

Funkciu boviného antigénu CD9 v procese oplodnenia sme analyzovali na intaktných oocytoch s využitím tzv. „binding assay“, pričom sme oocyty preinkubovali mAb IVA-50 a

po 15 min spoločnej inkubácii gamét sme hodnotili množstvo spermií naviazaných na zonu pellucidu.

Po opracovaní oocytov mAb IVA-50 sme zaznamenali štatisticky významné zníženie počtu spermií naviazaných na ZP oproti izotypovej kontrole. Priemerný počet naviazaných spermií na oocyt bol oproti kontrole 2- až 4-krát vyšší. Pri opracovaní oocytov sme pozorovali aj vplyv množstva protilátky (Obr. 2). Pri vyššej koncentrácii protilátky sa znížil počet naviazaných spermií.



Obr. 2 Priemerný počet naviazaných spermií na oocyt po opracovaní oocytov.

1. Ovplynené oocyty s mAb IVA-50(5µg) + neovplyvnené spermie
 2. Ovplynené oocyty s mAb IVA-50(10µg) + neovplyvnené spermie
 3. Kontrolná skupina - Ovplynené oocyty s izotypovou kontrolou (10µg) + neovplyvnené spermie
- *** - $P = \sim 0,001$ a $n = 30$

Tab. 1 Priemerný počet naviazaných spermií na oocyt

SKUPINA	PRIEMERNÝ POČET NAVIAZANÝCH SPERMIÍ	SMERODAJNÁ ODCHYLKA
Ovplynené oocyty s mAb IVA-50 (5µg)	10,08	5,27
Ovplynené oocyty s mAb IVA-50(10µg)	5,06	3,47
Ovplynené oocyty s izotypovou kontrolou (10µg)	22,19	8,51

Naše experimenty potvrdili inhibíciu väzby spermií už na úrovni ZP. V doteraz publikovaných prácach bola znížená väzba spermií popísaná na úrovni oolemy u myší [16, 17, 18, 19], u prasiat [7] a hovädzieho dobytká [8]. Pri imunofluorescenčnej detekcii CD9 sme použili intaktné oocyty, fixované až po opracovaní primárnou protilátkou, je teda zrejmé, že ZP nepredstavuje žiadnu bariéru pre prestup protilátky k plazmatickej membráne oocytu. V ďalších experimentoch sa preto pokúsime overiť vplyv mAb IVA-50 nielen na väzbu spermií na ZP, ale aj na fúziu gamét v systéme ešte bližšom k podmienkam „in vivo“ oplodnenia, a to pridaním IVA-50 priamo do oplodňovacej kvapky.

Záver

Molekula CD9 je exprimovaná na plazmatickej membráne aj na zone pellucide maturovaných a nematurovaných bovinných oocytov. Predbežné experimenty s protilátkou IVA-50 ukázali významný vplyv na väzbu spermií na ZP oocyty po opracovaní intaktných oocytov.

Pod'akovanie

Realizácia projektu bola finančne podporená grantmi VEGA 2/0006/12 a APVV-0137-10. Za technickú spoluprácu ďakujeme Zuzane Nádaždyovej.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Ellerman D. A., Ha C., Primakoff P., et al. (2003) *Mol. Biol. Cell.* 14, p. 5098
- [2] Rubinstein E., Ziyat A., Wolf J. P., et al. (2006) *Semin. Cell Dev. Biol.* 17, p. 254
- [3] Fábryová K., Simon M. (2009) *Gen. Physiol. Biophys.* 28, p. 1
- [4] Kaji K., Oda S., Shikano T., et al. (2000) *Nat. Genet.* 24, p. 279
- [5] Le Naour F., Rubinstein E., Jasmin C., et al. (2000) *Science.* 287, p. 319
- [6] Miyado K., Yamada G., Yamada S., et al. (2000) *Science.* 287, p. 321
- [7] Li Y.H., Hou Y., Ma W., et al. (2004) *Reproduction.* 127, p. 151
- [8] Zhou G. B., Liu G. S., Meng Q. G., et al. (2009) *J. Reprod. Dev.* 55(3), p. 305
- [9] Liu W. M., Cao Y. J., Yang Y. J., et al. (2006) *J. Mol. Endocrinol.* 36, p. 121
- [10] Weimin L., Yujing C., Jing L., et al. (2007) *Fertil. Steril.* 87, p. 664
- [11] Park K. R., Inoue T., Ueda M., et al. (2000) *Mol. Hum. Reprod.* 6, p. 252
- [12] Xaing W., MacLaren L. A. (2002) *Biol. Reprod.* 66, p. 1790
- [13] Kaewmala K., Uddin M. J., Cinar M. U., et al. (2011) *Animal Reprod. Sci.* 125, p. 170
- [14] Ito C., Yamatoya K., Yoshida K., et al. (2010) *Cell. Tissue. Res.* 340, p.583
- [15] Boucheix C., Benoit P., Frachet P., et al. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, p. 117
- [16] Chen M. S., Tung K. S. K., Coonrod S. A., et al. (1999) *PNAS.* 96, p. 11830
- [17] Takhashi Y., Bigler D., Ito Y., White J. M. (2001) *Molecular Biology of Cell.* 12, p. 809
- [18] Wong G. E., Zhu X., Prater C. E., et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, p. 24937
- [19] Zhu X., Evans J. P. (2002) *Biol. Reprod.* 66(4), p. 1193
- [20] Kováčiková P., Simon M., Dušinský R., et al. (2001) *Czech. J. Anim. Sci.* 46, p. 333

Effect of activated fibroblasts on proliferation and phenotype of B leukemic cell lines

Kristína Doležalová¹, Jozef Bízík², Katarína Együdová²

¹*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Microbiology and Virology, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovak Republic; mercurytina@gmail.com*

²*Slovak Academy of Sciences, Cancer Research Institute, Laboratory of Molecular Oncology, Vlárská 7, 833 91 Bratislava 37, Slovak Republic*

Abstract

Cancer and inflammation are interconnected. In the present paper we aimed our efforts at the explanation of these interactions by using an experimental model of human fibroblasts activation, also called nemosis. This process leads to proinflammatory activation accompanied by upregulation of cyclooxygenase-2 (COX-2), production of cytokinins and prostaglandins. By cocultivation of leukemic cells with two types of dermal fibroblasts - MUF and CRL, MUF expressing COX-2 and CRL not expressing COX-2, we have studied the effect of inflammation on proliferation and B phenotype NALM 16 and NALM 6 leukemic cell lines. We have observed growth inhibition of leukemic cells following cocultivation with MUF fibroblasts, as well as changes in the detected phenotypic signs following cocultivations especially with MUF fibroblasts. This fact suggests that inflammation regulates proliferative properties and the phenotype of leukemic cells. The results obtained show the importance of the inflammatory status of the human body in the process of modulation and treatment of cancer diseases.

Keywords: *leukemic B lymphocytes; inflammation; growth characteristics; FACS; Cox-2*

Introduction

Interactive signaling between cancer cells and stroma plays an important role in determining tumor development [1]. It is now becoming clear that the tumour microenvironment, which is largely orchestrated by inflammatory cells, is an indispensable participant in the neoplastic process, fostering proliferation, survival and migration [2]. In the study we have observed the interaction between the microenvironment (stroma) in which the induced inflammatory process occurs and subsequently we have monitored its effect on B lymphocytes. During the analysis, leukemic NALM 16 and NALM 6 cell lines of leukemic patients were tested. Simultaneously, we have analyzed the growth characteristics of the leukemic cells and phenotypic changes observed by FACS. From the results obtained, we expect to clarify the causative relationship and interaction between the progression of B-cell leukemia and inflammatory processes.

Materials and methods

Cell lines and cultivation

NALM 16 – acute lymphoblastic leukemia, provided by Dr. Babúšiková from CRI SAS

NALM 6 – acute lymphoblastic leukemia, also provided by Dr. Babúšiková from CRI SAS

MUF 7/1 – human dermal fibroblasts from neonatal foreskin, provided by Dr. Piršel

CRL 2088 – the line was established from skin taken from normal foreskin obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA).

Cell lines were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, 50 IU/ml streptomycin and 50 µg/ml penicillin (all from Life Technologies, Gibco, Carlsbad, CA) and incubated in a temperature box at 37° C in 5 % CO₂ atmosphere.

Antibodies

CD 138 PE - Miltenyi Biotec GmbH, Germany, CD 20-Vio Blue/R - Miltenyi Biotec, CD38-FITC (IM0775U, Beckman Coulter, Maimi, FL), CD 184-APC – Biolegend, UK

Fibroblast formation

Homotypic cell–cell interactions, resulting in formation of multicellular clusters. Clusters were formed in Ubottom 96-well plates treated with 0,8 % LE agarose, which formed a thin nonadherent film. To separate fibroblasts from the culture dish trypsin EDTA was used. The single cell culture was prepared in RPMI 1640 medium. Fibroblasts were seeding into the wells (250-µl) and started to form spheroids. Dishes were cultivated in a temperature box at 37° C in 5 % CO₂ atmosphere. Compact spheroids reached their final form by 24 h.

Subsequently, leukemic NALM 16 and NALM 6 cell lines were used for co-cultivation experiments. 96-well plates treated with agarose were used for cultivation. Cells at a concentration of 100 cells per well were dropped into each well. Leukemia cells were incubated with 10⁴ fibroblasts, which formed compact spheroids MUF 7/1 and CRL for 168 hours. After cocultivation the spheroids were separated from leukemic cells using gravitational differential sedimentation, and analysed by FACS.

Analysis of growth characteristics

Fibroblasts MUF 7/1 and CRL were seeded into 96 well plates, and after 24 h when fibroblasts started forming spheroids, leukemic cells were added. Spheroids and leukemic cells were cocultivated for 72 h in a temperature box at 37° C. After incubation, leukemic cells were counted in a Bürker chamber to determine the impact of cocultivation on the amount of leukemic cells. Results were processed into graphs comparing the dependence of co-cultivation time in hours and the amount of leukemic cells in the well (250 µl).

Flow cytometry

Leukemic cell lines were standardly co-cultivated with spheroids. Co-cultivated samples were washed with PBS, stored on ice, incubated with the following antibodies: anti-CD38-FITC, CD-138-PE, CD184-APC, CD20-Violet1, and analysed by FACS using a Canto II flow cytometer. The type 1.2.1 Cyflogic program was used for evaluation.

Results and discussion

In our experiments we have tried to demonstrate how sterile inflammation affects the properties of leukemic cells by using co-cultured methods with fibroblasts. By plotting the growth characteristics, we investigated the effect of cocultivation on the proliferative ability of leukemic cells. Tested were two leukemic lines, NALM 16 (pro- B leukemia) and NALM 6 (pre-B leukemia) co-cultivated with MUF and CRL fibroblasts. We found that cocultivation with Muf fibroblasts significantly inhibited the growth of leukemic cells in the Nalm 16 cell line compared to unaffected control. Co-cultivation with CRL fibroblasts demonstrated low inhibition of leukemia cells growth compared to unaffected control (Fig.1).

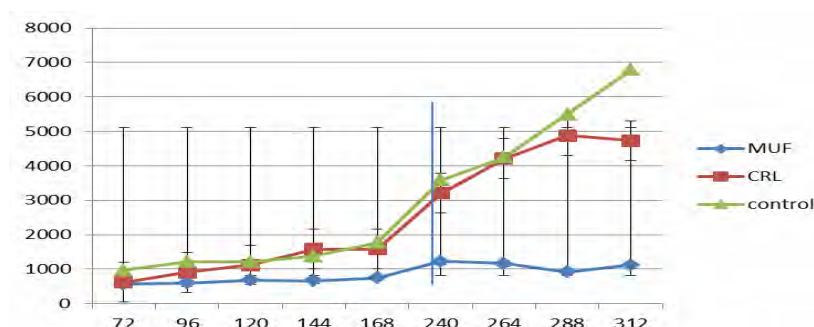


Fig. 1 Growth characteristics of NALM 16 leukemic cell line. The X axis represents the duration in hours of cocultivation of leukemic cells with Muf, CRL fibroblasts and unaffected control of leukemic cells. The Y axis represents the amount of leukemic cells per well (250 µl)

The NALM 6 cell line exhibited low inhibition of leukemic cells growth in both cases of co-cultivation with MUF and CRL fibroblasts compared to control (Fig. 2).

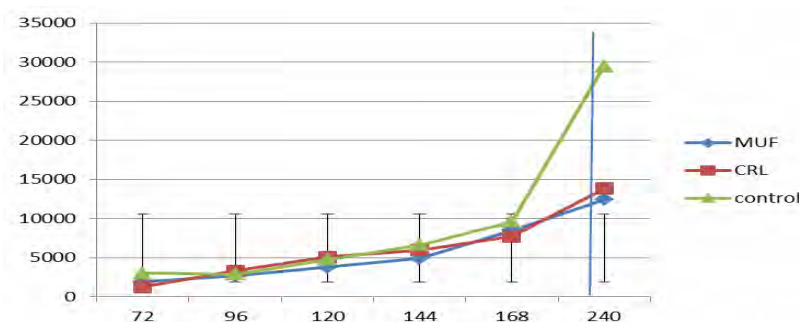


Fig. 2 Growth characteristic of NALM 6 leukemic cell line. The X axis represents the duration in hours of cocultivation of leukemic cells with Muf, CRL fibroblasts and unaffected control of leukemic cells. The Y axis represents the amount of leukemic cells per well (250 μ l)

These results suggest that fibroblasts, especially Muf fibroblasts expressing COX-2, (CRL not expressing COX-2) might influence the growth of leukemic cells and especially in the developmentally older NALM 16 cell line.

Furthermore, we observed changes in selected CD markers on the surface of leukemic cells before and after co-cultivation by FACS analysis.

Tested were NALM 16 and NALM 6 leukemic cell lines. We have monitored the presence of CD 38, CD138, CD 184 and CD 20 markers.

Tab. 1 FACS analysis of CD markers before and after cocultivation with fibroblasts compared to unaffected control of cell lines

marker	NALM 16			NALM 6		
	control	muf	crl	control	muf	crl
CD38	713	356 ↓	569 ↓	2961	2541 ↓	2749 ↓
CD138	5521	2383 ↓	5559 ↑	1305	802 ↓	816 ↓
CD184	7565	2167 ↓	2183 ↓	65309	35521 ↓	25754 ↓
CD20	451	146 ↓	241 ↓	104	102 ↓	98 ↓

The control sample of unaffected NALM 16 line showed the presence of all selected markers. After co-cultivation of NALM 16 with MUF fibroblasts the presence of all monitored markers was reduced – CD 38 by 50.07%, CD 138 by 56.84%, CD 184 by 71.35% and CD 20 was by 67.83% compared to the control. After co-cultivation of NALM 16 with CRL fibroblasts the presence of the following markers was reduced: CD 38 by 20.2%, CD 184 by 71.14%, CD 20 by 46.56% and CD 138 was increased by 6.9% compared to the control.

The NALM 6 leukemic cell line strongly expressed all markers except for the CD 20 marker. After co-cultivation with MUF fibroblasts the following markers were reduced: CD 38 by 14.18%, CD 138 by 38.54%, CD 184 by 45.61%, CD 20 by 1.98% compared to the control. Co-cultivation with CRL fibroblasts also reduced the presence of all markers: CD 38 by 7.16%, CD138 by 37.47%, CD 184 by 60.57%, CD20 by 5.77% compared to the control.

CD38 expression is tightly regulated during B cell ontogenesis and is present at high

levels in bone marrow (BM) precursors; it is downregulated in resting normal B cells and is then reexpressed in terminally differentiated plasma cells. This see saw behavior suggests that CD38, though not a lineage marker, is expressed at certain points during B cell development, when cell-to-cell interactions are crucial [3, 4]. Ligation of CD38 with agonistic antibodies induces diverse effects in hematopoietic cells that range from growth stimulation to induction and prevention from apoptosis, induction of cytokines, activation of kinases, and phosphorylation of certain proteins [5]. We observed a significant reduction in the expression of CD 38 characters, especially after cocultivation with MUF fibroblasts, this could indicate that COX-2 expressed by Muf fibroblasts during inflammation is involved in regulation of the expression of CD 38, suggesting that the inflammatory process has the potential to engage in regulation of B cell differentiation.

The CD 138 marker is involved in B cell differentiation and is able to bind the fibroblast growth factor. In B-lymphoid cells, TGF-beta alters CD138 glycosylation but not the number of CD138 molecules at the cell surface, whereas IL6 reduces CD 138 expression in a time-dependent and reversible manner [6]. Muf fibroblasts produce cyclooxygenase 2 which is regulated by IL 6. It can be responsible for the reduction of the CD 138 marker on the surface of leukemic cells.

CD 184 - CXCR-4 is an alpha-chemokine receptor specific for stromal-derived-factor-1 (SDF-1 also called CXCL12). Of all the chemokines, stromal-derived factor-1 (SDF-1), an alpha-chemokine that binds to G-protein-coupled CXCR4, plays an important and unique role in the regulation of stem/progenitor cell trafficking. First, SDF-1 regulates the trafficking of CXCR4+ haemato/lymphopoietic cells, their homing/retention in major haemato/lymphopoietic organs and accumulation of CXCR4+ immune cells in tissues affected by inflammation [7]. Binding of SDF-1 induces CXCR4 phosphorylation by Ser/Thr kinases, leading to CXCR4 internalization via clathrin-coated pits [8]. Significant decrease in expression of CD184 marker after cocultivation with MUF and CRL fibroblasts might be caused by internalization of CD 184 which binds to factor SDF-1, expressed in both types of fibroblasts, but we do not exclude the influence of the inflammatory process.

CD 20 is expressed in all stages of B cell development except the first and last; it is present from late pro-B cells through memory cells, but not on either early pro-B cells or plasma blasts and plasma cells [9]. This indicates the reason why its presence was reduced in NALM 16 and absent in the developmentally younger NALM 6 line.

Conclusion

In this study we found that the inflammatory process affects the proliferative and phenotypic characteristics of B lymphocytes, which are interconnected. Inflammatory conditions affect not only the process of differentiation of B cells but also the presence of many important markers on the surface of leukemic cells that are involved in many important pathways, such as apoptosis, induction of many cytokines and kinases. Chemotherapy is often accompanied by inflammatory processes. Therefore we would like to highlight the importance of maintaining non-inflammatory environment in the treatment of cancer.

Acknowledgment

I would like to thank my supervisor, RNDr. Jozef Bízík, DrSc and RNDr. Katarína Együdová, PhD for the opportunity to perform this thesis at Cancer Research Institute SAS and for their valuable guidance.

References

- [1] Kankuri E., Babusikova O., Hlubinova K., et al. (2008) *Int. J. Cancer.* 122, p. 1243
- [2] Coussens L., Werb Z. (2002) *Nature.* 420(6917), p. 860
- [3] Funaro A., Malavasi F. (1999) *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 13, p. 54
- [4] Malavasi F, Funaro A, Roggero S, et al. (1994) *Immunol. Today.* 15, p. 95
- [5] Mehta K, Shahid U, Malavasi F. (1996) *FASEB J.* 10(12), p. 1408
- [6] Cope with cytokines [Cited: 5. march 2013] <<http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=CD138>>
- [7] Kucia M, Jankowski K, Reza R, et al. (2004) *J. Mol. Histol.* 35(3), p. 233
- [8] MBLI [Cited: 4. march 2013] < <http://www.mblintl.com/product/d123-4> >
- [9] Kaušitz J., Altaner Č., et al. (2003) *Onkológia. Veda, Bratislava,* p. 77

Zmena hydrologických parametrov pôdy pod vplyvom rastu biologickej pôdnej krusty

Zuzana Drongová, Ľubomír Kováčik

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra botaniky, Révová 39, 811 02 Bratislava, Slovensko; zuetko@gmail.com

Abstrakt

The biological soil crusts (BSC) represent major part of vegetation cover on disturbed sites or areas where the growth of vascular plants is limited. BSC bind soil particles together by sheaths and filaments and help protect soil from erosion. On the other hand the high rates of mucilage produced by cyanobacteria in BSC can cause increase rates of soil water repellency. In this study we quantified an influence of artificial soil crust formed from cyanobacteria *Nostoc* sp. on soil hydraulic properties in initial growth states. We found out that sorptivity and unsaturated hydraulic conductivity decrease with crust growth instead of water drop penetration time which increase with crust growth. The water repellency cessation time increased with an increase of water drop penetration time.

Kľúčové slová: *Biologická pôdna krusta; cyanobaktéria; piesočnatá pôda; vodoodpudivosť.*

Úvod a formulácia cieľa

Piesočnatá pôda podlieha vysokému riziku vzniku erózie v prírodnom prostredí. Práve v oblastiach s výskytom piesočnatej pôdy hrajú biologické pôdne krusty (BSC) kľúčovú úlohu, pretože stabilizujú pôdny povrch, zadržávajú vlahu a významne podporujú sukcesiu rastlín [1, 2]. Naším cieľom bolo kvantifikovať vplyv cyanobakteriálnych pôdnych krúst v rôznych štádiách nárastu na hydrofyzikálne charakteristiky piesočnatej pôdy - stálosť vodoodpudivosti, sorptivitu pre vodoodpudivý stav krusty, sorptivitu vody pre takmer zmáčavý stav krusty, hydraulickú vodivosť a čas zániku vodoodpudivosti. O vplyve biologických pôdnych krúst na vodoodpudivosť pôdy vieme zatiaľ len málo, no špecifické štúdie, ako táto, sú nenahraditeľné pre kompletne vysvetlenie kľúčových hydrologických charakteristík vo vodoodpudivovej pôde.

Materiál a metódy

Petriho misky s rozmermi 4 × 1 cm sme naplnili zhomogenizovanou, sterilizovanou piesočnatou pôdou so známymi vlastnosťami a pridali 4 ml cyanobakteriálneho inokula (*Nostoc* sp. + médium Z podľa Zehndera [3]). Misky boli inkubované pri teplote 25 °C a ožiarení 3600 lx po dobu 0 až 36 dní. Pre udržanie kontinuálneho rastu cyanobaktérie sme do misiek pridávali kultivačné médium Z. Na konci každého rastového štádia krusty (4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 a 36 dní) sme po 15-hodinovom sušení pri teplote 50 °C (simulácia tri dni

trvajúceho horúceho a suchého obdobia) určovali stálosť vodoodpudivosti WDPT testom (angl. water drop penetration time) [4] z času vniku troch kvapiek vody do študovaného materiálu, hydraulickú vodivosť a sorptivitu piesočnatej pôdy pokrytej cyanobakteriálnou krustou. Obsah pôdnej vody θ_g sme v každej vzorke určovali gravimetrickou metódou po sušení pri teplote 105 °C. Obsah organického uhlíka C_{org} (%) sme stanovili zo straty hmotnosti žiňaním pri teplote 550 °C. Závislosť kumulatívnej infiltrácie od času sme merali pri vlhkostnom potenciáli $h_0 = -2$ cm s použitím miniatúrneho podtlakového infiltrometra. Kumulatívnu infiltráciu vody I , číselne rovnú objemu vody infiltrujúcej cez jednotkovú plochu pôdy za jednotku času, sme počítali pomocou Philipovej infiltračnej rovnice [5]:

$$I = C_1 t^{1/2} + C_2 t + C_3 t^{3/2} + C_4 t^2 + \dots + C_m t^{m/2} + \dots \quad [I.]$$

kde $C_1, C_2, C_3, C_4, \dots$ a C_m sú koeficienty a t je čas.

Sorptivitu $S(h_0)$ a nenasýtenú hydraulickú vodivosť $k(h_0)$ pri aplikovanom tlaku $h_0 \leq 0$ možno určiť z jej prvých dvoch členov [6]:

$$S(h_0) = C_1(h_0)/A_1 \quad [II.]$$

$$k(h_0) = C_2(h_0)/A_2 \quad [III.]$$

kde A_1 a A_2 sú konštanty.

Sorptivitu vody S_{wh} pre vodoodpudivý stav cyanobakteriálnej krusty sme stanovili zo sklonu závislosti $I = f(\text{SQRT } t)$ pre krátky čas infiltrácie a sorptivitu vody S_{ww} pre skoro zmáčavý stav cyanobakteriálnej krusty sme stanovovali zo sklonu závislosti $I = f(\text{SQRT } t)$ pre dlhší čas infiltrácie. Čas zániku vodoodpudivosti WRCT (z angl. water repellency cessation time) sme určovali z priesečníka týchto dvoch priamok [7].

Výsledky a diskusia

Výskyt vodoodpudivosti sa viaže najmä na ľahké piesočnaté pôdy s trávňatým porastom, ale je zaznamenaný aj pri hlinitej pôde, ťažkej ílovitej pôde, u rašeliny alebo pri pôdach tvorených zo sopečného popola [8]. Ak sa prekročí schopnosť pôdy rýchlo prijať vodu zo zrážok, vzniká povrchový (Hortonovský) odtok, ktorý prispieva k vzniku erózie pôdy a vedie k rýchlym stratám vody a živín dostupných pre rastliny. Pri vodoodpudivej pôde často

dochádza aj k tvorbe preferovaných ciest prúdenia [9] (miesta bez alebo s nízkou vodoodpudivosťou), ktoré môžu spôsobovať rýchlejší presun kontaminantov, vyplavovanie živín, alebo pesticídov používaných v rastlinnej výrobe.

Cyanobaktéria *Nostoc* sp. patrí k pomerne častým komponentom biologickej pôdnej krusty, schopným v relatívne krátkom čase vytvárať dostatočne veľké množstvo biomasy schopnej ovplyvňovať hydraulické vlastnosti pôdy. Svojím rastom postupne upcháva pôdne póry a slizové obaly okolo buniek tmelia povrch pôdy (obr. 1), čím zabraňujú rýchlemu vnikaniu vody do pôdy a prispievajú k tvorbe povrchového odtoku. *Nostoc* sp. je schopný prežiť aj veľmi dlhé a suché obdobia v aktívnom stave a takmer okamžite po navlhčení slizové obaly zväčšujú svoj objem. Pukliny v suchej kruste sa sceľujú (obr. 1), opätovne prekrývajú miesta s obnaženou pôdou, bránia rýchlemu vtekaniu vody do pôdy cez predtým rozpukané miesta v kruste, čím zvyšujú tvorbu povrchového odtoku. Táto situácia môže v prírodnom prostredí viesť k vzniku vodnej erózie pri silných privalových dažďoch aj po dlhšom období sucha.



Obr. 1 Charakter sledovanej krusty – (a) skoré štádium rastu krusty – upchávanie pôdnych pórov a stmefovanie povrchových častíc pôdy (b) neskoré štádium rastu krusty – pukliny odhaľujúce obnaženú pôdu na mesiac suchej kruste (c) neskoré štádium rastu krusty – napučanie slizových obalov a scelenie povrchu rozpukanej krusty 5 minút po navlhčení mesiac suchej krusty

Laboratórnymi meraniami sme zistili, že veľkosť vplyvu cyanobakteriálnych krúst na hydrofyzikálne parametre piesočnatej pôdy závisel od dĺžky rastu krusty. Nárast krúst, reprezentovaný nárastom obsahu organického uhlíka v pôde z 0,20 % po 0,31 %, mal za následok zvýšenie hodnoty WDPT z 1 s na 21,8 s. S nárastom obsahu organického uhlíka sa znížila hodnota sorptivity vody pre hydrofóbny stav krusty S_{wh} 15-násobne oproti hodnote nameranej na čistej piesočnatej pôde, sorptivita vody pre takmer zmáčavý stav krusty S_{ww} klesla 19-násobne oproti hodnote nameranej na piesočnatej pôde. Hodnota nenasýtenej hydraulickej vodivosti k (–2 cm) počas rastu krusty klesla až 57-násobne oproti hodnotám nameraným na čistej piesočnatej pôde. Čas zániku vodoodpudivosti WRCT za z hodnoty

nameranej na piesočnatej pôde zvýšil takmer na 62-násobok. Hodnota WRCT priamo úmerne rástla s hodnotou WDPT. Cyanobakteriálne krusty mali výraznejší vplyv na pôdnu hydrauliku v porovnaní s riasovými krustami [7]. Riasové krusty sú náchylnejšie na vysychanie, pretože nie sú chránené mohutným slizovým obalom, aký produkuje *Nostoc* sp. Cyanobakteriálne bunky obalené slizom tmelili a upchávali pôdne póry dôkladnejšie než riasy, čo sa prejavilo výraznejším posunom v hydraulickom správaní u skúmaných cyanobakteriálnych krúst.

Záver

Rast cyanobakteriálnej krusty vo všetkých Petriho miskách spôsobil postupné upchávanie pôdnych pórov, čo sa prejavilo ako pokles sorptivity pre vodoodpudivý stav krusty S_{wh} , sorptivity vody pre takmer zmáčavý stav krusty S_{ww} , ako aj zníženie hydraulickej vodivosti k oproti hodnotám nameraným na čistej piesočnatej pôde. Rast cyanobakteriálnej krusty, reprezentovaný zvýšením obsahu C_{org} spôsobil zvýšenie času vniku kvapky vody do pôdy WDPT a zvýšenie času zániku vodoodpudivosti WRCT.

PodĎakovanie

Naše podĎakovanie patrí RNDr. F. Šporkovi, CSc. (ÚZ SAV) za technickú výpomoc. Výskum bol finančne podporený projektom VEGA 2/0073/11.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Belnap J., Lange O. L. (2003) Biological soil crusts: structure, function, and management. Ecological studies. Springer-Verlag, Berlin, p. 3
- [2] Brotherson, J.D., Rushforth, S.R. (1983) Great Basin Nat., 43, p. 75
- [3] Staub R. (1961) Schweiz. Hydrol. 23, p. 82
- [4] Ritsema C. J., Dekker L. W. (2003) Soil water repellency. Occurrence, consequences, and amelioration. Elsevier, Amsterdam, p. 352
- [5] Philip J. R. (1957) Soil Sci. 83, p. 345
- [6] Zhang R. (1997) Soil Sci. Soc. Am. J. 61, p. 1024
- [7] Lichner L., Hallett, P.D, Drongová, Z. et al. (2012) Catena, doi: 10.1016/j.catena.2012.02.016
- [8] Dekker, L.W., Oostindie, K. a Ritsema, C.J. (2005) Aust. J. Soil Res., 43, p. 405
- [9] Kung K-J. S. (1990) Geoderma 46, p. 60

Vplyv mutácie *pgs1* na zloženie bunkovej steny kvasiniek *Kluyveromyces lactis*

Eva Drozdíková, Annamária Bardelčíková, Zuzana Kubicová, Margita Obernauerová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie
a virológie, Mlynská dolina B2-1, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
drozdikova@fns.uniba.sk

Abstrakt

Anionic phospholipids absence (cardiolipin and phosphatidylglycerol) significantly disrupts of mitochondrial biogenesis, affects the cell wall structure and plays an important role in processes such as aging or apoptosis. The absence of anionic phospholipids caused by *PGS1* deletion is lethal for the yeast *Kluyveromyces lactis*, the lethality is suppressed by the *atp2.1* mutation. Our results indicate that the lacking of anionic phospholipids in *K.lactis* mutant strains induces a changes in their cell wall composition.

Kľúčové slová: anionické fosfolipidy; *Kluyveromyces lactis*; bunková stena

Úvod a formulácia cieľa

Kardiolipín je lokalizovaný v kvasinkách vo vnútornej membráne mitochondrií. Zohráva významnú úlohu v ich biogenéze, je potrebný pre správnu funkciu enzýmov dýchacieho reťazca a oxidačnej fosforylácie [1]. Jeho neprítomnosť ovplyvňuje aj významné procesy ako je biogenéza bunkovej steny, odpoveď buniek na stresové podmienky prostredia, starnutie a apoptóza [2]. Prerušenie génu *PGS1*, kódujúceho fosfatidylglycerolfosfát syntázu, vedie k súčasnej strate fosfatidylglycerolu (PG) aj CL [3], čo u kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* znamená ich konverziu z *petite*-pozitívneho druhu na *petite*-negatívny-neschopného tolerovať stratu mtDNA [4]. Mutácia *pgs1* je u *petite*-negatívneho druhu kvasiniek *Kluyveromyces lactis* letálna [5]. Prežívanie tohto druhu kvasiniek bez prítomnosti anionických fosfolipidov zabezpečuje supresorová mutácia *atp2.1* [6, 7].

Bunková stena kvasiniek je esenciálna štruktúra, ktorá determinuje tvar bunky a zabezpečuje bunkovú integritu počas rastu a morfogénzy. Obsahuje približne rovnaké množstvo manoproteínov a glukánu. Treťou zložkou bunkovej steny, ktorá predstavuje približne 1% je chitín. Chitín je vo zvýšenom množstve prítomný len v zárodočných jazvách, avšak v prípade oslabenia bunkovej steny sa jeho množstvo zvyšuje [8].

Neprítomnosť PG a CL u kvasiniek *S. cerevisiae* sa prejavuje zvýšenou citlivosťou k inhibítorm syntézy bunkovej steny ako sú kofeín, kaspofungín a hygromycín. Zvýšená citlivosť buniek je spôsobená znížením množstva 1,3-glukánu v ich bunkovej stene, resp. v N-glykozylačnom defekte glukánovej vrstvy [9, 10, 11]. U kvasiniek *Candida glabrata* boli

naopak mutantné kmene voči takýmto látkam (kalkofluórová biela a Kongo červen) rezistentné [12].

Zmena štruktúry bunkovej steny môže vplývať aj na citlivosť buniek voči antifungálnym látkam, ktorých primárnym miestom účinku je plazmatická membrána. Polyény sa všeobecne viažu prednostne na ergosterol plazmatickej membrány kvasiniek a vytvárajú v nej póry. V dôsledku ich pôsobenia dochádza k narušeniu integrity membrány, k úniku iónov a následnej smrti bunky [13]. Kvasinky *S. cerevisiae* s poruchou v syntéze CL boli v porovnaní so štandardným kmeňom menej citlivé k polyénovému antibiotiku amfotericínu B, v prípade kardiolipínového mutantu kvasiniek *Candida glabrata* nedošlo k výraznej zmene citlivosti voči amfotericínu B, resp. nystatínu [12]. Zmena v zložení bunkovej steny tak nepriamo môže mať za následok zmenu citlivosti voči antifungálnym látkam [14].

Cieľom našej práce bolo analyzovať citlivosť kvasiniek *Kluyveromyces lactis* deficitných v syntéze anionických fosfolipidov voči vybraným inhibítorm syntézy bunkovej steny a inhibítorm syntézy ergosterolu. Ďalším cieľom práce bolo pokúsiť sa pomocou fluorescenčnej mikroskopie vizualizovať možnú zmenu v štruktúre/hrúbke ich bunkovej steny.

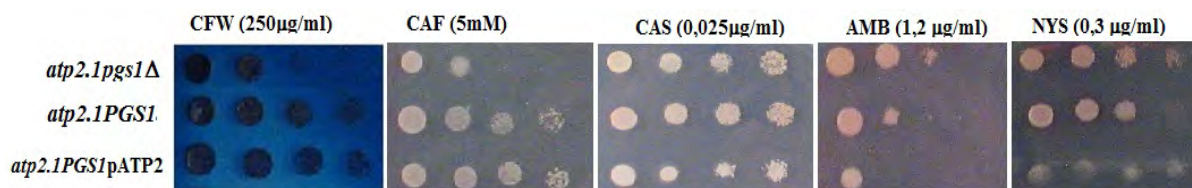
Materiál a metódy

Použité kmene: kmeň *Kluyveromyces lactis* CW75/1D/63 (*atp2.1pgs1Δ*), kmeň *Kluyveromyces lactis* CW75/1D (*atp2.1PGS1*), kmeň *Kluyveromyces lactis* CW75/1D/pRS306K-*klATP2* (*atp2.1PGS1pATP2*)

Použité metódy: Stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) látok ovplyvňujúcich biosyntézu bunkovej steny (kofeín, kalkofluorová biela, a kaspofungín) a látok interferujúcich s metabolizmom sterolov (polyény- amfotericín B a nystatín) u analyzovaných kmeňov. Farbenie bunkovej steny pomocou fluorescenčnej farbičky kalkofluorová biela a jej následná fluorescenčná analýza [15].

Výsledky a diskusia

Fenotypová analýza kmeňa kvasiniek *K. lactis* s deléciou v géne *PGS1* bola vykonaná za účelom pozorovania vplyvu neprítomnosti anionických fosfolipidov (PG a CL) na citlivosť buniek voči látkam interferujúcim s biosyntézou bunkovej steny a s biosyntézou ergosterolu. Prípadné zmeny v citlivosti testovaného kmeňa by mohli naznačovať zmenu v zastúpení jednotlivých komponentov bunkovej steny.



Obr. 1 Kvapkový test na stanovenie MIC pre vybrané inhibítory syntézy bunkovej steny a syntézy ergosterolu. CFW- calcofluor white, CAF- kofeín, CAS- kaspofungín, AMB- amfotericín B, NYS- nystatín.

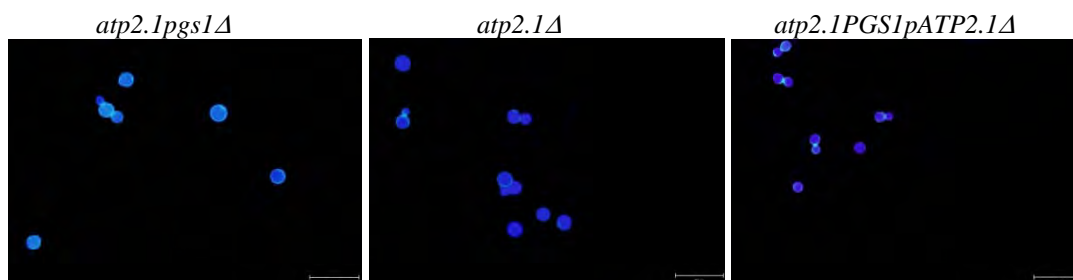
Hodnoty MIC (minimálne inhibičné koncentrácie) boli stanovené prostredníctvom kvapkového testu (Obr. 1) a pre jednotlivé kmene sú uvedené aj v Tab.1. V teste boli použité látky interferujúce s biosyntézou bunkovej steny - kalkofluorová biela (inhibítor chitín syntázy), kofeín (inhibítor cAMP-fosfodiesterázy), kaspofungín (inhibítor biosyntézy β -1,3-glukánu) a antifungálne látky – amfotericín B a nystatín, ktoré zásahom do syntézy ergosterolu narušujú integritu plazmatickej membrány.

Tab. 1 Minimálne inhibičné koncentrácie (MIC) testovaných kmeňov voči vybraným antifungálnym látkam

	CFW [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	CAF [mM]	CAS [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	AMB [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	NYS [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]
<i>atp2.1pgs1Δ</i>	250	5	0,05	1,25	0,3
<i>atp2.1PGS1</i>	500	7,5	0,05	0,75	0,25
<i>atp2.1PGS1pATP2</i>	>500	10	0,05	0,5	<0,25

- znížená citlivosť - zvýšená citlivosť

Delečný mutant (*atp2.1pgs1Δ*) vykazoval zvýšenú citlivosť voči kalkofluórovej bielej a kofeínu, čo indikuje zmenu v podiele glukánu a chitínu v bunkovej stene mutantného kmeňa. Pri kaspofungíne, rozdiely v citlivosti medzi kmeňmi neboli zaznamenané ani pri vyšších koncentráciách testovanej látky, čo môže byť dané prirodzenou vlastnosťou tohto kmeňa. Rezistencia mutanta s deléciou v géne *PGS1* voči polyénom v porovnaní s kmeňmi so štandardnou alelou génu *PGS1* opäť naznačuje možnú modifikáciu v zložení bunkovej steny. Túto, zatiaľ ešte presne chemicky neidentifikovanú zmenu v zložení bunkovej steny delečného mutanta potvrdzuje aj fluorescenčné farbenie (Obr. 2).



Obr. 2 Fluorescenčná analýza bunkovej steny *K. lactis* za použitia kalkofluórovej bielej.
Mierka 20 μm

Výrazná intenzita fluorescence bunkovej steny delečného mutanta *pgs1* farbeného kalkofluórovou bielou indikuje možnú zmenu podielu chitínu v bunkovej stene kmeňa, ktorému chýbajú anionické fosfolipidy.

Záver

Zo získaných výsledkov vyplýva, že vplyvom absencie anionických fosfolipidov u kvasiniek *K. lactis* dochádza k zmene zloženia bunkovej steny. Tento záver podporuje zistená znížená citlivosť mutanta s deléciou v géne *PGSI* k inhibítorom syntézy bunkovej steny a jej špecifické fluorescenčné farbenie. Za nepriamy dôkaz modifikácie jej zloženia môže slúžiť aj detekovaná rezistencia na testované polyénové antibiotiká. Cieľom ďalšej práce bude biochemická analýza komponentov bunkovej steny kmeňa kvasiniek *K. lactis* s poruchou v syntéze anionických fosfolipidov

Pod'akovanie

Tento príspevok vznikol za podpory projektu VEGA 2/0058/11 a realizácie projektu (ITMS 26240120027) podporeného OPVaV financovaného EFRR.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Mileykovskaya E., Dowhan W. (2009) *Biochim Biophys Acta* 1788(10), p. 2084
- [2] Joshi A. S., Zhou J., Gohil V. M., et al. (2009) *Biochim Biophys Acta* 1793, p. 212
- [3] Chang S. C., Heacock P. N., Clancey C. J., et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, p. 9829
- [4] Ďžugasová V., Obernauerová M., Horváthová K., et al. (1998) *Curr. Genet.* 34(4), p. 297
- [5] Tyčiaková S., Obernauerová M., Dokušová L., et al. (2004) *FEMS Yeast Res.* 5(1), p. 19

- [6] Polakovičová V. (2008) Štúdium vplyvu dvojitej mutácie *atp2.1/pgs1* na fyziologické vlastnosti kvasiniek *Kluyveromyces lactis* (Rigorózna práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, p. 110
- [7] Patrásová M., Kost'anová-Poliaková D., Šimocková M., et al. (2010) *FEMS Yeast Res.* 10(6), p. 727
- [8] Klis F. M., Mol P., Hellingwerf K., et al. (2002) *FEMS Microbiol. Rev.* 26, p. 239
- [9] Zhong Q., Li G., Gvozdenovic-Jeremic J., et al. (2007) *J. Biol. Chem.* 282 (22), p. 15946
- [10] Šarinová M., Tichá E., Obernauerová M., et al. (2007) *Folia Microbiol* 52(3), p. 223
- [11] Lussier M., White A. M., Sheraton J., et al. (1997) *Genetics* 147, p. 435
- [12] Baťová M., Borecká-Melkusová S., Šimocková M., et al. (2008) *Curr. Genet.* 53, p. 313
- [13] Baginski M., Sternal K., Czub J., et al. (2005) *Chem Rec.* 6(6), p. 320
- [14] Hapala I., Klobučníková K., Mazáňová K., et al. (2005) *Biochem Soc Trans.* 33, p. 1206
- [15] Mitochondrial staining protocols I. [Citované: 6. marec 2013]
<<http://ebookbrowse.com/61-mitochondrial-staining-protocol-i-ros-accumulation-ufirm-t-doc-d189441022>>

Vplyv mikrovlnného a ionizačného žiarenia na tvorbu DNA opravných fokusov v lymfocytoch z pupočníkovej krvi

Matúš Durdík; Eva Marková; Igor Belyaev

Slovenská akadémia vied, Ústav experimentálnej onkológie, Vlárská 7, 833 91 Bratislava, Slovenská republika; matusdurdik17@gmail.com

Abstrakt

Different types of radiation are affecting us nowadays. Electromagnetic radiation which is produced mainly by mobile phones, Wi-fi and base stations is affecting us practically all of the time. Long term effects of this type of radiation are not fully examined. It is very important to know effects of radiation that influence us so much like electromagnetic radiation. DNA double strand breaks (DSBs) are the most deleterious types of DNA damage. Several proteins involved in DNA repair and DNA damage signaling have been shown to produce discrete foci in response to ionizing radiation. These foci are believed to co-localize to DSB and referred to as ionizing radiation-induced foci or DNA repair foci. Ionizing radiation is known to induce formation of radiation induced foci which are very hard to analyze exactly. That's why the second aim of this work was to compare two automatized systems for analysis of DNA repair foci, METAFER and ImageStream.

KLúčové slová: elektomagnetické žiarenie; ionizačné žiarenie; DNA opravné fokusy

Úvod a formulácia cieľa

Na zabránenie nebezpečných následkov poškodenia DNA bunky aktivujú odpoveď na poškodenie DNA, ktorá zahŕňa detekciu DNA poškodenia, aktiváciu DNA opravnej mašinerie a dočasné prerušenie bunkového cyklu, ktoré je potrebné pre správnu opravu poškodenia. Viaceré proteíny zahrnuté v DNA oprave a signalizácii DNA poškodenia produkujú malé opravné fokusy ako odpoveď na ionizačné žiarenie. Je dokázané, že tieto fokusy kolokalizujú s DSB a označujú sa ako ionizačným žiarením indukované fokusy alebo DNA opravné fokusy[1]. Ionizačným žiarením indukované fokusy (IRIF) môžu byť mikroskopicky vizualizované ako malé bodky okolo DSB. Kľúčovým procesom vo formovaní IRIF je rýchla fosforylácia histónu H2AX (γ H2AX, keď je fosforylovaný), ktorá zabezpečuje formáciu chromatinového lešenia na dvojmegabázovom úseku DNA obsahujúcom DSB a funguje pomocou náboru ostatných proteínov zahrnutých v oprave[2]. IRIF sú dynamické štruktúry, zahŕňajúce tisíce kópií proteínov zahrnutých v rôznych aspektoch DSB opravy a signalizácii. Tieto proteíny zahŕňajú fosforylovaný ATM, 53BP1, MDC1, RAD51, MRN komplex (MRE11, RAD50, NBS1), RNF8/KIAA0646, RNF168, BRCA1-A complex a MERIT40/NBA1[3].

V dnešnej dobe je väčšina ľudí v rozvinutých krajinách chronicky vystavená mikrovlnnému žiareniu z rôznych zdrojov ako napr. mobilné telefóny, bázové stanice, Wi-fi

žiariče. Tieto žiarenia sú charakteristické nízkymi intenzitami, komplexitou signálov a dlhým trvaním ožiarenia, ktoré by sa dalo nazvať celoživotným. Toto žiarenie varíruje v mnohých parametroch ako sila žiarenia, vlnová dĺžka, polarizácia, vzdialenosť od zdroja, modulácia, statické magnetické a elektromagnetické polia v mieste ožiarenia. Aj preto je veľmi ťažké porovnávať výsledky dosiahnuté pri rôznych štúdiách zaoberajúcich sa biologickými vplyvmi mikrovlnného žiarenia[4]. Existujú štúdie, ktoré tvrdia, že mikrovlnné žiarenie nemá škodlivý vplyv na bunky[5], ale na druhej strane existuje veľa štúdií, ktoré tvrdia, že vplyv tohto žiarenia môže byť pre bunky škodlivý[6].

Cieľom našej práce bolo teda skúmať vplyv mikrovlnného žiarenia z mobilných telefónov na tvorbu a opravu DNA opravných fokusov. Ďalším cieľom bolo porovnať senzitivitu dvoch systémov na kvantifikáciu DNA opravných fokusov po ožiarení ionizačným žiarením a určiť, ktorý je citlivejší a tým pádom na túto analýzu vhodnejší.

Materiál a metódy

Lymfocyty z pupočníkovej krvi pochádzali z registra placentárnych krvotvorných buniek Eurocord. Bunky sme rozmrazili preniesli do 100%RPMI média(Gibco) a scentrifugovali 6min pri 1000ot./min. Následne sme bunky preniesli do kompletného 89%RPMI média(10% FBS, 1%Penicilin-Streptomycin), spočítali počet mŕtvych buniek pomocou farbenia Trypan-modrou. Bunky sme ešte nechali 2 hodiny kultivovať v inkubátore pri 37°C a 5%hladine CO₂ aby sme odstránili monocyty, ktoré sa prichytia na dno kultivačnej fľašky. Po kultivácii sme bunky ešte scentrifugovali 15min pri 800ot./min. aby sme sa zbavili mŕtvych buniek a preniesli do čerstvého 89%RPMI média.

Na ožarovanie elektromagnetickým žiarením sme používali špeciálne upravený mobilný telefón od firmy Sony Ericsson, ktorý bol napojený na zdroj energie a priamo z antény sa elektromagnetické žiarenie prenášalo koaxiálnym káblom do komory v inkubátore v ktorej boli uložené bunky. Ožarovanie prebiehalo v rôznych časových intervaloch od 1h po 4h. Ako kontrola slúžili bunky, ktoré boli po dobu ožarovania v tom istom inkubátore, ale v inej komore, ktorá nebola napojená na mobilný telefón.

Po ožarovaní sme bunky scentrifugovali 15min pri 800ot./min. Supernatant sme odsali a pelet rozsuspendovali v PBS. Bunky sme následne pomocou Cytospin centrifúgy(800ot./min, 5min.) preniesli na sklíčka potiahnute polyzínom(Thermoscientific) a fixovali v 3% Paraformaldehyde po dobu 15 minút a uložili do PBS.

Posledným krokom prípravy preparátov bolo značenie histónu γ H2AX a proteínu 53BP1 špecifickými protilátkami. Značenie prebiehalo ako v predchádzajúcich štúdiách Markovej a kol. Cieľové proteíny sme značili inými protilátkami ako v predchádzajúcich štúdiách primárnymi protilátkami proti histónu γ H2AX(Novus) a proteínu 53BP1(Novus), ku ktorým sme použili sekundárne protilátky Alexa fluor 488 a 555(Invitrogen/Life technologies). Sklíčka boli analyzované na automatizovanom mikroskopickom systéme Metafer(Metasystems).

Ožiarenie ionizačným žiarením prebiehalo na Onkologickom ústave sv.Alžbety, Heydukova 10, 812 50 Bratislava. Vzorky boli na ľade počas prepravy, aj počas ožarovania. Zdrojom γ lúčov pochádza z prístroja THERATRON[®] and Elite 100 (MDS Nordion, Canada).

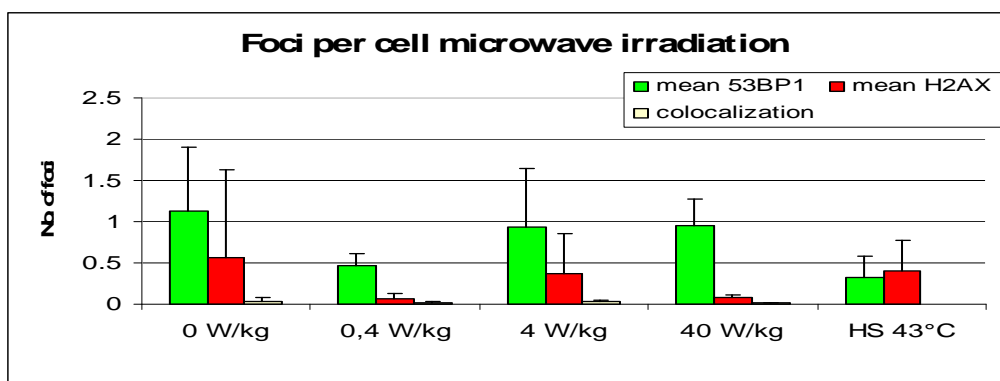
Po návrate na ústav experimentálnej onkológie sa jednotlivé vzorky dali na 30minút do inkubátora na 37°C, aby mohla začať DNA oprava a tvorenie DNA opravných fokusov. Následne prebieha fixácia, ktorá sa líši v závislosti na spôsobe analýzy výsledkov. V prípade analýzy na systéme Metafer prebiehala fixácia tak, ako bolo popísané vyššie pri pokusoch s mobilným telefónom. V prípade analýzy na systéme ImageStream, čo je vlastne spojenie prietokovej cytometrie a mikroskopu, sme fixáciu aj značenie protilátkami robili v skúmavke. Po 30 minútach v inkubátore sme bunky scentifugovali v chladenej centrifúge pri 4°C(15min/800ot.), supernatant sme odsali, pelet rozsuspendovali v PBS a opäť scentifugovali(15min/800ot./4°C.). Následne sme bunky fixovali v 4% paraformaldehyde v PBS, scentifugovali (10min./800ot./4°C), odsali supernatant a pelet rozsuspendovali v 70% ľadovom etanole a uložili do chladničky.

Na druhý deň ráno sme vykonávali značenie protilátkami, na rehydratáciu a prípravu buniek na značenie sme používali TST buffer(PBS obsahujúce, 2%albumínu z bovínneho séra a 0,1% Triton X-100). Primárne protilátky sme používajú rovnaké ako v prípade značenia na sklíčkach, ale inkubovali sme 2 hodiny. Sekundárne protilátky sme používali odlišné a to, FIT-C(Beckmann-Coulter) a Alexa fluor 647(Invitrogen/Life technologies). Na záver sa bunky po premytí PBS a scentifugovaní(10min./800ot./4°C) a opatrnom odsatí supernatantu rozsuspendovali v PBS a DNA sa farbila roztokom DAPI. Takto pripravené vzorky sa analyzovali na systéme ImageStream.

Výsledky a diskusia

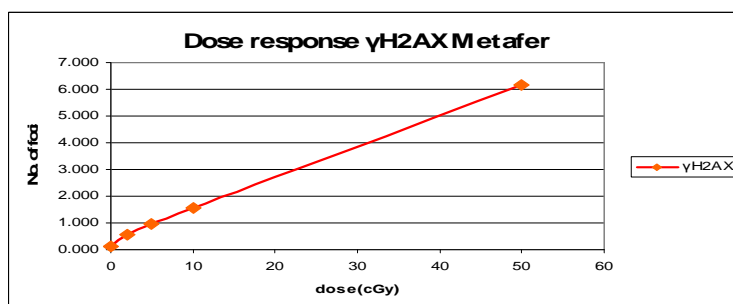
Vykonal sme 6 pokusov, pri ktorých sme ožarovali lymfocyty pupečníkovej krvi mikrovlnným žiarením s rôznymi intenzitami. Čas ožiarenia varíroval od 1h po 4h. Najvyššiu

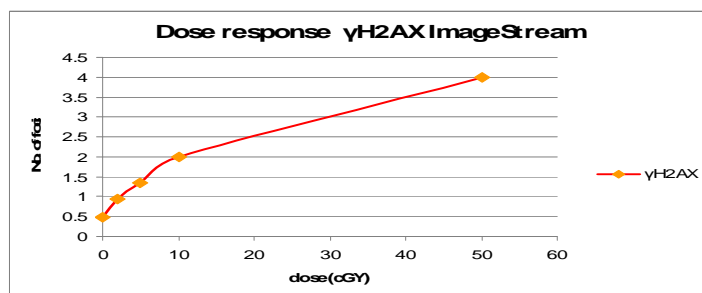
hladinu oboch typov fokusov sme pozorovali pri kontrole, čo je v korelácii s predchádzajúcou štúdiou [7]. Hoci sme u ožiarených vzoriek pozorovali nižšiu hladinu DNA opravných fokusov, najmä u γ H2AX fokusov pri intenzitách 0,4 a 40 W/kg, tento rozdiel sa po štatistickej analýze neukázal ako štatisticky významný. Pozorovali sme aj pokles hladiny 53BP1 fokusov, ktorý ale nebol taký výrazný ako pri γ H2AX fokusoch. Ďalej sme pozorovali vplyv teplotného šoku (43°C po dobu 2 hodín na tvorbu DNA opravných fokusov). Bunky po 2 hodinách teplotného šoku mali výrazne nižší počet 53BP1 fokusov a oproti kontrole aj nižší počet γ H2AX fokusov. Teplotný šok rovnako spôsoboval u buniek apoptózu, čo mierne zvýšilo počet γ H2AX fokusov vzhľadom na prítomnosť veľkého počtu buniek v určitom začiatkovom štádiu apoptózy, kedy je veľmi zvýšená prítomnosť histónu γ H2AX a pri automatickej analýze to zvyšuje počet fokusov (Obr.1)



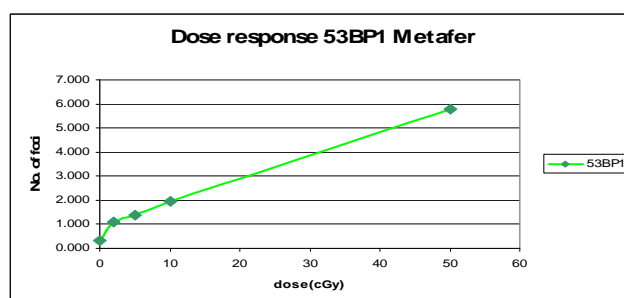
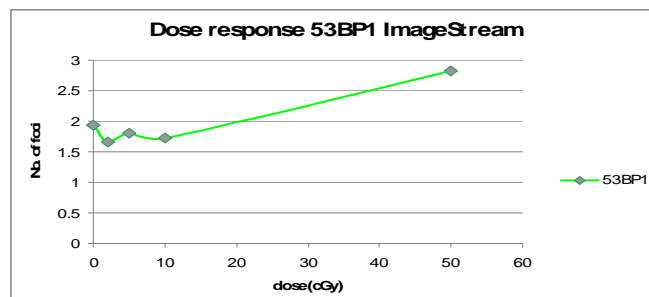
Obr.1 Graf zobrazujúci počet DNA opravných fokusov po ožiarení mikrovlnným žiarením pri rôznych intenzitách, kontrolu a teplotný šok (inkubácia 2 hodiny pri 43°C, čo zabráni tvorbe DNA opravných fokusov)

Druhým cieľom našej práce bolo porovnať senzitivitu dvoch rôznych systémov pri analýze radiačne indukovaných fokusov po ovplyvnení lymfocytov malými aj vyššími dávkami ionizačného žiarenia. Cieľom bolo získať lineárnu krivku dávkovej závislosti, ktorá je očakávaná pri lineárnom zvyšovaní dávky ožiarenia. Výsledky sme hodnotili zo 4 pokusov.



Obr.2 Dávková závislosť počtu γ H2AX fokusov vyhodnotená systémom Metafer**Obr.3** Dávková závislosť počtu γ H2AX fokusov vyhodnotená systémom ImageStream

Pri analýze počtu γ H2AX fokusov sme získali podobné výsledky u oboch systémov, s tým rozdielom, že Metafer si udržal lineárnu krivku dávkovej závislosti aj pri najvyššej dávke 50cGy, zatiaľ čo ImageStream pri tejto dávke spočítal v priemere iba 4 fokusy na bunku v porovnaní so šiestimi u systému Metafer (Obr.3 a 4). Z výsledkov vyplýva, že ImageStream je vhodný skôr na hodnotenie pokusov s malými dávkami ionizačného žiarenia, zatiaľ čo Metafer je rovnako vhodný na nízke aj vyššie dávky.

**Obr.4** Dávková závislosť počtu 53BP1 fokusov vyhodnotená systémom Metafer**Obr.5** Dávková závislosť počtu 53BP1 fokusov vyhodnotená systémom ImageStream

Pri porovnávaní počtu 53BP1 fokusov sme u Metaferu dostali lineárnu krivku dávkovej závislosti (Obr.4), avšak ImageStream nedokázal dostatočne citlivo odlíšiť kontrolné vzorky od vzoriek ožiarených nízkymi dávkami. Tento systém dokázal rozlíšiť až dávku 50cGy(Obr.5). Táto nízka senzitivita môže byť spôsobená tým, že pri meraní na ImageStream sú bunky zachytávané kamerou v pohybe, zatiaľ čo na Metaferi sú umiestnené na sklíčku a citlivosť je preto výrazne vyššia. Ďalšou výhodou Metaferu je aj to, že pri analýze je bunka rozrezaná na istý počet rezov(záleží od nastavenia), čo rovnako zvyšuje citlivosť analýzy.

Záver

V tejto štúdií sa nám nepodarilo štatisticky dokázať inhibičný vplyv mikrovlnného žiarenia na opravu dvojlákových zlomov. Ale aj napriek tomu z výsledkov je badať istý stupeň inhibície tvorby DNA opravných fokusov mikrovlnným žiarením.

Záverom nášho druhého cieľu je, že systém Metafer hodnotí počet DNA opravné fokusy citlivejšie a presnejšie ako systém ImageStream.

Pod'akovanie

Chcel by som poďakovať všetkým, ktorý mi pri vypracovávaní mojej práce akýmkoľvek spôsobom pomohli a boli dobrými učiteľmi pri učení sa nových metód, najmä docentovi Igorovi Belyaevovi za odborné vedenie, a doktorke Eve Markovej za veľmi cenné pripomienky k metódam.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Bekker-Jensen S., Lukas C., Kitagawa R., et.al. (2006) J. Cell Biol. 173, p.195
- [2] Sedelnikova O. A., Rogakou E. P., Panyutin I. G., et.al. (2002) Radiat. Res. 158, p.486
- [3] Redon, C. E., Dickey J. S., Bonner W. M., et.al. (2009) Adv. Space Res. 43, p.1171
- [4] Belyaev I. Y (2010) Eur. J. Oncol Library. 5, p.187
- [5] Xu S., Chen G., Chen Ch., et.al. (2013) PLoS One. 1(8), p.1
- [6] Marková E., Hillert L., Malmgren L., et.al. (2005) Environ. Health Perspect. 9(113), p.1172
- [7] Marková E., Malmgren L., Belyaev I. Y., (2010) Environ. Health Perspect. 3(118), p.

Impact and fate of fetal DNA in mouse and its implication to research concerning preeclampsia

Helena Fábryová¹, Eva Lengyelová¹, Barbora Vlková¹, Peter Celec^{1,2,3}

¹Comenius University in Bratislava, Faculty of Medicine, Institute of Molecular Medicine, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovakia;

²Comenius University in Bratislava, Faculty of Medicine, Institute of Pathophysiology, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovakia;

³Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Molecular Biology, Mlynská dolina 842 15 Bratislava, Slovakia; helena.fabryova@gmail.com

Abstract

Fetal DNA present in maternal plasma was found to be higher in women suffering from preeclampsia. It has been suggested that this extracellular fetal DNA is the consequence of placental damage, but it might also be a cause of preeclampsia. Our previous works suggest that circulating free fetal DNA is rather a cause of preeclampsia. In this work we examined the possible impact of fetal DNA on proteinuria and life span of exogenous DNA in mouse.

Key words: *preeclampsia, impact of fetal DNA on proteinuria, life span of exogenous DNA in mice*

Introduction and aim

Preeclampsia is the most common pregnancy related disorder. The main symptoms are hypertension and proteinuria. It is the main cause of perinatal mortality and morbidity [1]. The progress in understanding pathogenesis and etiology of preeclampsia is slow [2]. The facts that occurrence of preeclampsia is frequent, treatment is unsound and consequences fatal in many cases make research in the area of pathogenesis of preeclampsia both interesting and challenging. Preeclampsia is commonly referred to as “the disease of theories”. One of the theories about pathogenesis of preeclampsia is that elevated fetal DNA in preeclamptic women might be rather a cause than a result of preeclampsia [3].

Our previous works suggests that fetal DNA is rather a cause than a result of preeclampsia. One of the main findings in our previous work is that DNA extracted from rat pups increases proteinuria in rats especially when administered in the late phase of pregnancy. This is a period of pregnancy when fetal DNA is elevated in preeclamptic pregnancies compared to normal pregnancies [4]. In this work we injected DNA in male mice and examined the proteinuria outcomes as well as we tried to estimate the amount of detectable exogenous DNA and life span of it in mice.

Material and methods

Nephrotoxic effects of exogenous DNA

The pups from sacrificed mouse were homogenized in Cell Lysis Solution from Gentra Puregene Blood Core Kit B (Qiagen, Valencia, CA). The DNA from pups was isolated with the above mentioned kit according to DNA Purification from Tissue protocol with modifications for a larger volume. DNA was dissolved in water and aliquots for injections were stored at -20°C.

12 male mice C57/Bl6 (4 per group) were injected with saline, 100µg of DNA or 300µg DNA in the volume of 200µl five days in a row. Urine was collected for 12 hours after the first administration as well as after the five days of administration of the selected compound.

Proteinuria was determined by spectrophotometric method determining a complex occurring as a result of a reaction of pyrogallol acid with molybdenate ions in acidic environment [5]. Creatinine was determined by Jaffe method using a diagnostic reagent Creatinine FS (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Germany) [6].

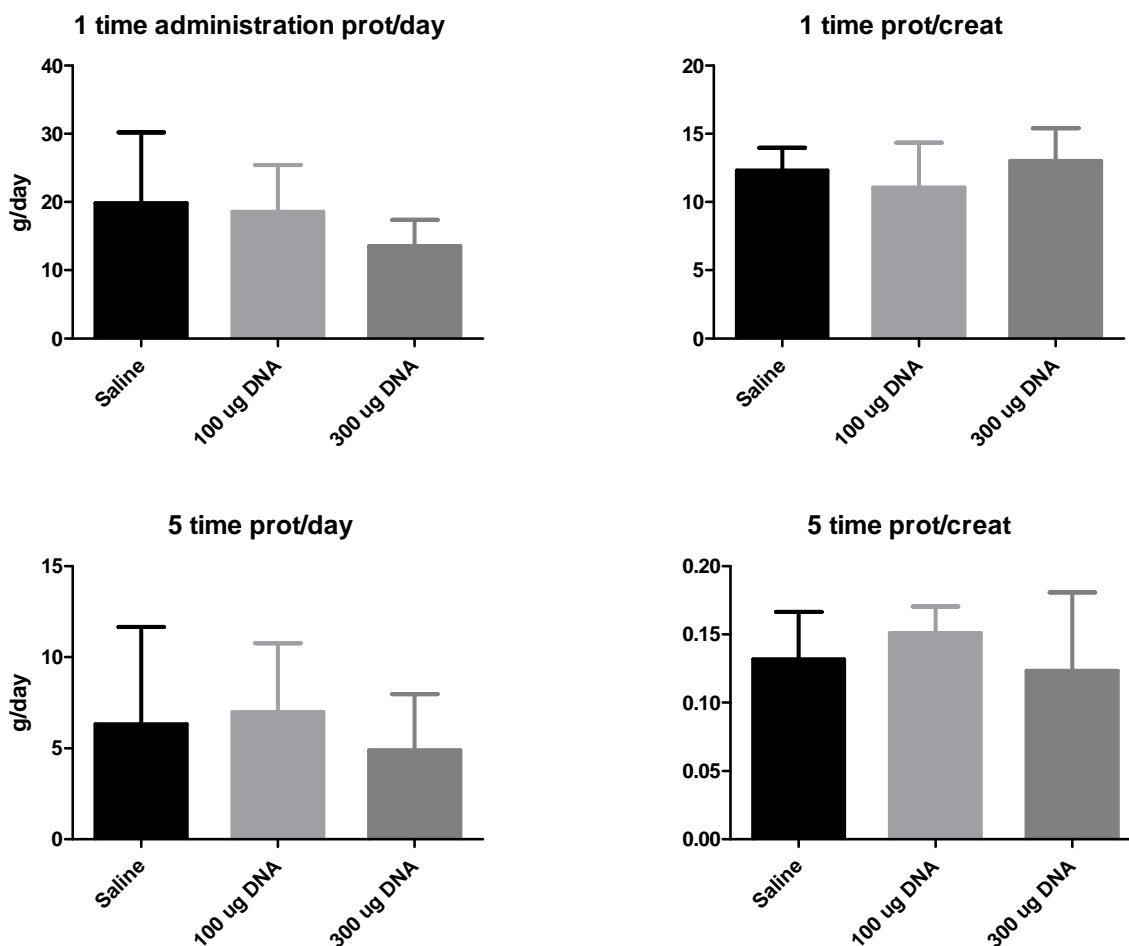
Life span of exogenous DNA in mice

We isolated the human male whole genome DNA using Gentra Puregene Blood Core Kit (Qiagen, Germany). 129/SvJ female mice were injected 24,6µg of human male whole genome DNA in 300 µl of saline either i.p. or i.v. The negative control was killed without injecting anything. The mice were killed 5 and 20 minutes after the administration of the given substance. Y DNA in blood was detected using QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Germany).

Results and discussion

We performed this experiment on male mice. The average values of proteinuria in diuresis after one time administration of the compound were 19,85g for saline; 18,55g for 100µg DNA; and 13,57g of proteins for 300µg DNA. The average values of protein/creatinine ratio after one time administration of the compound were 12,31 for saline; 11,05 for 100µg DNA; and 13,00 for 300µg DNA. The average values of proteinuria in diuresis after five times administration of the compound were 6,32g for saline; 6,98g for 100µg DNA; and 4,89g of proteins for 300µg DNA. The average values of protein/creatinine ratio after five times administration of the compound were 0,13 for saline; 0,15 for 100µg DNA; and 0,12 for 300µg DNA. We did not find any significant differences among groups (see Figure 1). This

fact might indicate that if there is a nephrotoxic effects of fetal DNA, it is conditioned by pregnancy. Pregnancy demands higher activity of the kidneys, hence it might be affected more easily.



„Fig. 1“. Proteinuria in mice administered DNA i.p. one time or five days in a row

Life span of exogenous DNA in mice

Mice injected i.p. were sacrificed after the planned times. All of the mice injected i.v. died almost immediately after injection (one survived 5 minutes time). The Y DNA was not detectable using the given kit in DNA isolated from blood from mice injected i.p. The only deliverable signal in real time PCR occurred in DNA isolated from mice injected i.v. that died immediately. No signal was detected in the mouse injected i.v. that survived the 5 minutes limit. This might be caused by the viscose nature of DNA which might have clotted the heart of the mouse.

Conclusion

Intraperitoneal injections of DNA do not cause elevated proteinuria. Fetal DNA in preeclampsia normally occurs in blood, but such high amounts as were administered in this experiment i.p. are not possible to administer i.v. Other works dealing with administration of fetal DNA to mice indicate that fetal DNA is a cause of preeclampsia [7] as well, but not deal with the estimation of fetal DNA or other exogenous DNA. We suppose that the amount might be so little that it is impossible to detect with currently available methods.

For future research, it would be interesting to administer DNA via osmotic pump, for it might simulate the condition occurring in preeclamptic pregnancy better.

Acknowledgement

I would like to thank to Peter Celec, MD, Ing., Dr., PhD., MPH for guidance and advice as well as to every person who contributed to this work.

References

- [1] Costante, G. and S. Filetti (2011) *Oncologist*. 16(1): p. 49-52.
- [2] George, E.M. and J.P. Granger (2011) *Curr Hypertens Rep*. 13(4): p. 269-75.
- [3] Vlkova, B., et al. (2010) *Med Hypotheses*. 74(6): p. 1030-2.
- [4] Lo, Y.M., et al. (1999) *Clin Chem*. 45(2): p. 184-8.
- [5] Watanabe, N., et al. (1986) *Clin Chem*. 32(8): p. 1551-4.
- [6] Mazzachi, B.C., M.J. Peake, and V. Ehrhardt (2000) *Clin Lab*. 46(1-2): p. 53-5.
- [7] Scharfe-Nugent, A., et al. (2012) *J Immunol*. 188(11): p. 5706-12.

Potravné správanie lariev obojživelníkov

Eva Farkašovská, Bystrík Ambruš

Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra ekológie, Mlynská dolina, 84215, Bratislava, Slovenská Republika; evafarkasovska@gmail.com

Abstrakt

Environmental conditions of animals influence their growth, development and also their behavior. Repertoire of behavior of tadpoles is limited to activities which support their development, growth and survive to the metamorphosis. Temperature and presence of predators are important external factors affected amphibian behavior. Presence of predators effected larval amphibians to decrease their activity while temperature induces its increase. We tested influence of predator presence and temperature on feeding preferences of larval stages of *Bufo bufo*, *Rana dalmatina* and *Hyla arborea* in experimental conditons. We compare conditions without changes, in presence of predators and higher temperature environment.

KLúčové slová: *feeding behaviour; Bufo bufo; Rana dalmatina; Hyla arborea.*

Úvod a formulácia cieľa

Mnohé larvy obojživelníkov obývajú dočasné habitaty v škále od dendroteliem padnutých stromov v tropických lesoch [1] po veľké nádrže v boreálnych habitatoch [2]. Pre tieto habitaty sú charakteristické nepredvídateľné dočasné podmienky a cyklické podmienky dostupnosti zdrojov. Je pravdepodobné, že interakcie biotických a abiotických faktorov ovplyvňujú ekológiu žubrienok [3]. Mnohé z habitatov využívaných žubrienkami sú obsadzované viac než jedným druhom a obsahujú aj herbivory iných taxonomických skupín, ktoré môžu so žubrienkami o zdroje súperiť [4]. Mnohé obsahujú tiež predátorov [5].

Repertoár správania žubrienok je obmedzený na aktivity, ktoré podporujú vývin, rast a prežitie po metamorfózu. Jeho súčasťou je potravné správanie. Pri vyhľadávaní potravy však zvyšujú mieru stretávania sa s predátormi, či schopnosť predátorov ich detekcie [6]. Významným vonkajším faktorom ovplyvňujúcim správanie obojživelníkov je teplota a prítomnosť predátorov. Prítomnosť predátorov vplyva na larvy obojživelníkov hlavne znižovaním ich aktivity, pričom zvyšovanie teploty naopak spôsobuje jej zvýšenie. Nakoľko potravné správanie vyžaduje určitú zvýšenú mieru aktivity pri jej vyhľadávaní, očakávaným je jeho zníženie v prítomnosti predátorov a jeho zvýšenie pri zvýšenej teplote.

Žubrienky sa nachádzajú v nespočetnom množstve akvatických habitatov, krmiac sa na mnohých miestach (bentos, otvorená voda, hladina) vo vodnom stĺpci a majú tak charakteristickú morfológiu a správanie [7]. Žubrienky sú zvyčajne považované za vysoko

špecializovaných filtrujúcich herbivorov [8]. Najviac prijímajú planktón z vodného stĺpca, získavaním organického materiálu zo sedimentov, alebo oškrabávaním materiálu z ponorených substrátov [7]. Neustónová blanka nachádzajúca sa na hladine vody je hojným miestom pre potravu [9]. Niektoré žubrienky sa špecializujú na potravu z tejto neustónovej blanky. Kvôli orientácii disku pri kĺmení majú vzpriamenú polohu relatívne k hladine. Typicky bentické a nektonické žubrienky v rybníkoch sa živia potravou z tohto povrchového filmu vertikálnym otočením na chrbát (aj u nás žijúce druhy rodov *Bufo*, *Hyla*, *Rana*) [7].

Rôzna potrava skonzumovaná larvami žiab sa líši v percente proteínov, karbohydrátov a lipidov. Odlišnosti v nutričnej kvalite medzi stravou sú zreteľné pokiaľ ide rozdiely medzi rastlinnými a živočíšnymi tkanivami. Rastlinné tkanivo je zvyčajne vyššie na karbohydráty a nižšie na lipidy a proteíny ako živočíšna hmota [10]. Zmena preferovaného typu potravného správania, môže viesť aj k zmene potravného zloženia u žubrienok.

Cieľom predloženej práce bolo porovnanie preferencie potravného správania u troch druhov obojživelníkov - *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758), *Rana dalmatina* (Bonaparte, 1839) a *Hyla arborea* (Linnaeus, 1758) v odlišných podmienkach prostredia.

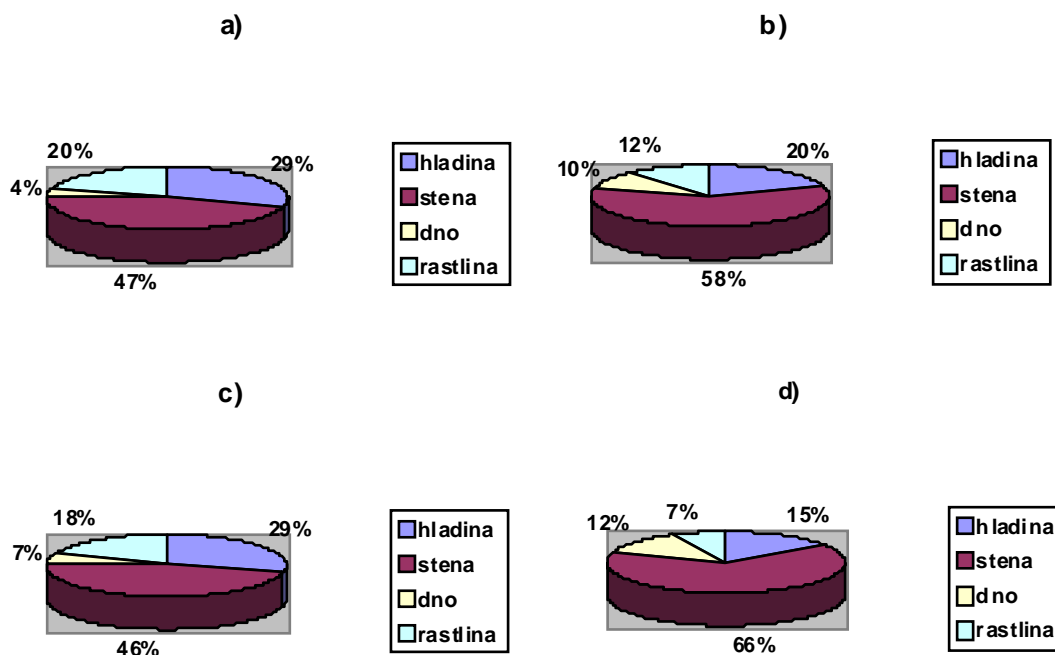
Materiál a metódy

Sledovali sme typ potravného správania u troch druhov obojživelníkov- *Rana dalmatina*, *Bufo bufo* a *Hyla arborea*. Sledovali sme či druhy využívajú potravu z hladiny, vyhľadávajú potravu na dne nádrže, alebo oškrabávajú nárasty zo stien alebo rastlín. U druhov *Bufo bufo* a *Rana dalmatina* sme porovnali typy potravného správania medzi kontrolným prostredím (bez predátora, 20°C), s prítomným predátorom- druhy rodu *Dytiscus*, prítomným predátorom- druhy rodu *Triturus* a pri zvýšenej teplote na 28°C. Porovnali sme aj tieto v rovnakom prostredí žijúce larvy navzájom či bude rozdiel v preferovanom type správania. Na základe toho sa dá predpokladať, či si druhy v prostredí konkurujú alebo nie. U druhu *Hyla arborea* sme porovnali len prostredie bez predátora a prostredie s prítomným predátorom- druhy rodu *Dytiscus*. Zaznamenávali sme frekvenciu výskytu v jednotlivých kategóriách v minútach v priebehu 30 minútového testu. Frekvencie výskytu jednotlivých typov potravného správania sme následne prerátali na ich percentuálne zastúpenie v jednotlivých typoch prostredia.

Výsledky a diskusia

Na základe percentuálneho zastúpenia hlavným typom potravného správania u druhov rodu *Bufo* a *Rana* bolo zoškrabávanie potravy zo stien nádrže. U druhu *Hyla arborea* bol preferovaným typom prijímanie potravy z hladiny. Tieto typy potravného správania mali najväčšie percento zastúpenia pri všetkých typoch prostredia.

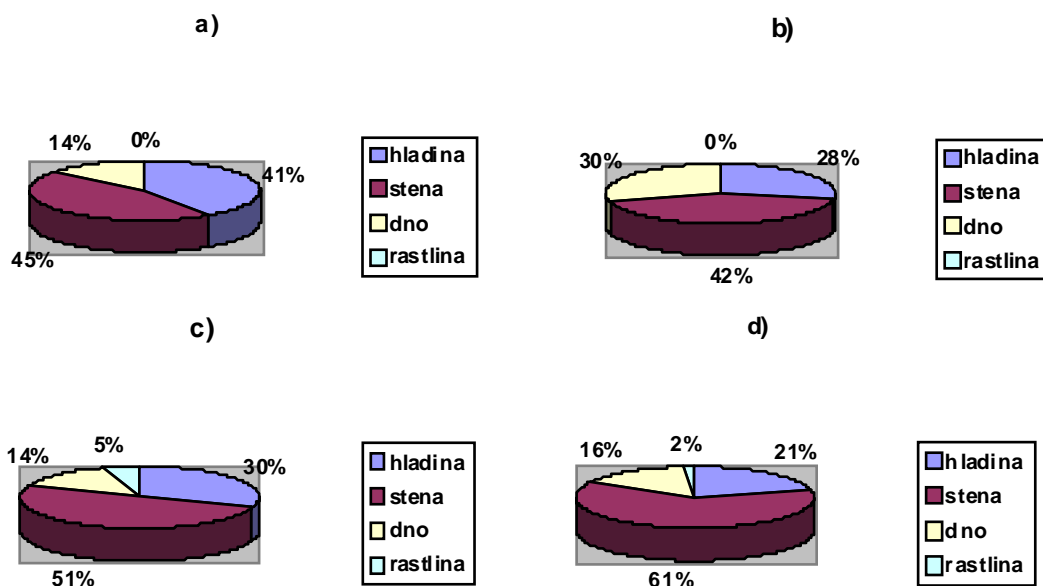
U druhu *Bufo bufo* v prostredí bez predátora predstavovalo prijímanie potravy z hladiny 29%, zoškrabávanie zo stien 47%, zberanie z dna 4% a zoškrabávanie z rastlín 20%. V prostredí s prítomnými druhmi rodu *Dytiscus* predstavovalo prijímanie potravy z hladiny 20%, zoškrabávanie zo stien 58%, zberanie z dna 10% a zoškrabávanie z rastlín 12%. V prostredí s prítomnými druhmi rosu *Triturus* bolo prijímanie potravy z hladiny 29%, zoškrabávanie zo stien 46%, zberanie z dna 7% a zoškrabávanie z rastlín 18%. Pri zvýšenej teplote bolo prijímanie potravy z hladiny 15%, zoškrabávanie zo stien 66%, zberanie z dna 12% a zoškrabávanie z rastlín 7% (Obr.1).



Obr. 1: percentuálne zastúpenie typov potravného správania u druhu *Bufo bufo* a) v prostredí bez prítomného predátora, b) v prítomnosti predátora- rod *Dytiscus*, c) v prítomnosti predátora- rod *Triturus*, d) pri zvýšenej priemernej teplote na 28°C.

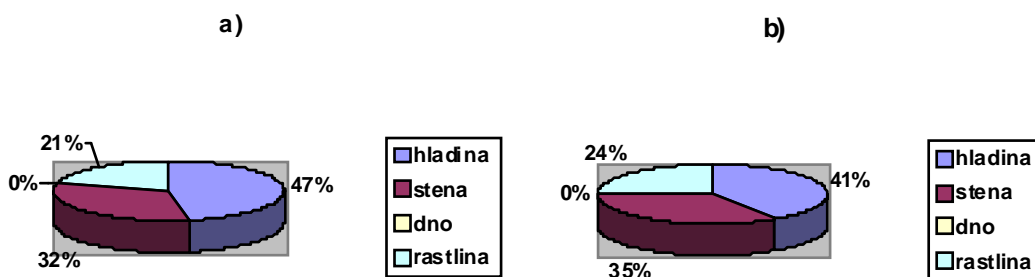
U druhu *Rana dalmatina* v prostredí bez predátora predstavovalo prijímanie potravy z hladiny 41%, zoškrabávanie zo stien 45%, zberanie z dna 14% a zoškrabávanie z rastlín 0%. V prostredí s prítomnými druhmi rodu *Dytiscus* predstavovalo prijímanie potravy z hladiny 28%, zoškrabávanie zo stien 42%, zberanie z dna 30% a zoškrabávanie z rastlín 0%.

V prostredí s prítomnými druhmi rodu *Triturus* bolo prijímanie potravy z hladiny 30%, zoškrabávanie zo stien 51%, zberanie z dna 14% a zoškrabávanie z rastlín 5%. Pri zvýšenej teplote bolo prijímanie potravy z hladiny 21%, zoškrabávanie zo stien 61%, zberanie z dna 16% a zoškrabávanie z rastlín 2% (Obr.2).



Obr. 2: percentuálne zastúpenie typov potravného správania u druhu *Rana dalmatina* a) v prostredí bez prítomného predátora, b) v prítomnosti predátora- rod *Dytiscus*, c) v prítomnosti predátora- rod *Triturus*, d) pri zvýšenej priemernej teplote na 28°C.

U druhu *Hyla arborea* v prostredí bez predátora prijímanie potravy z povrchového filmu hladiny predstavovalo 47% a v prostredí s prítomným predátorom- druhmi rodu *Dytiscus* to bolo 41%. Zoškrabávanie potravy zo stien v prostredí bez predátora predstavovalo 32% a s predátorom 35%. Zoškrabávanie potravy z rastlín bolo 21% bez predátora a 24% v prítomnosti predátora. Zberanie potravy z dna sa v žiadnom prostredí nevyskytlo (Obr.3).



Obr.3 : percentuálne zastúpenie jednotlivých typov potravného správania u druhu *Hyla arborea* a) v prostredí bez predátora, b) v prostredí s prítomným predátorom- rod *Dytiscus*

U druhu *Bufo bufo* došlo k následným zmenám. V prostredí s prítomným predátorom- druhmi rodu *Dytiscus* došlo k zvýšeniu zoškrabávania potravy zo stien a zberaniu potravy z dna a naopak k zníženiu zoškrabávania potravy z rastlín. V prostredí s prítomným predátorom- druhmi rodu *Triturus* v výrazným zmenám percentuálneho zastúpenia jednotlivých kategórií nedošlo. V prostredí so zvýšenou teplotou naopak došlo k zmene všetkých kategórií. K zvýšeniu percentuálneho zastúpenia došlo v prípade zoškrabávania potravy zo stien a zbierania potravy z dna a k zníženiu došlo v prijímaní potravy z hladiny a zoškrabávaní potravy z rastlín. U druhu *Rana dalmatina* došlo k nasledujúcim zmenám. V prostredí s prítomným predátorom- druhmi rodu *Dytiscus* došlo k zníženiu prijímania potravy z hladiny a k zvýšeniu zbierania potravy z dna. V prítomnosti predátora- druhy rodu *Triturus* došlo k zníženiu prijímania potravy z hladiny a zvýšeniu zoškrabávania potravy zo stien aj z rastlín. V prostredí so zvýšenou teplotou taktiež došlo k zníženiu prijímania potravy z hladiny a zvýšeniu zoškrabávania potravy zo stien a rastlín. U druhu *Hyla arborea* nedošlo k žiadnej výraznej zmene preferovaného typu potravného správania.

Záver

Preferovaným typom potravného správania u druhov rodov *Bufo* a *Rana* bolo zoškrabávanie potravy zo stien nádrže. U druhu rodu *Hyla* bol preferovaným typom prijímanie potravy z hladiny. U druhu rodu *Bufo* najvýraznejším faktorom prostredia ovplyvňujúcim potravné správanie bola zvýšená teplota, u druhu rodu *Rana* zvýšená teplo a prítomnosť predátora. Pri druhu rodu *Hyla* sa prítomnosť predátora neprejavuje výraznou zmenou v preferovanom type správania. U druhu rodu *Rana* sa takmer vôbec nevyskytovalo zoškrabávanie potravy z rastlín a u druhu rodu *Hyla* zase zberanie potravy z dna nádrže, čo znižuje konkurencie- schopnosť týchto troch druhov v prostredí.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Starett P. H. (1973) Evolutionary patterns in larval morphology. In Evolutionary biology of the anurans. Contemporary research on major problems. University of Missouri Press, Columbia. p. 251
- [2] Koskela P. (1973) Ann.Zool.Fennici 10, p. 414
- [3] Dunson W. A., Travis J. (1991) American Nat. 138, p. 1067
- [4] Morin P. J., Lawler S. P., Johnson E. A. (1988) Ecology 69, p. 1401
- [5] Rowe C. L., Sadinsky W. J., Dunson W. A. (1994) J.Herpetol. 28, p. 357

- [6] Gerritsen J., Strickler J. R. (1977) *J Fish Res Board Can.* 34, p. 73
- [7] McDiarmid R. W., Altig R. (1999) *Tadpoles: The biology of anuran larvae.* The University of Chicago Press, Chicago, p. 444
- [8] Duellman W. E., Trueb L. (1986) *Biology of amphibians.* New York. McGraw-Hill.
- [9] Danos S. O., Maki J. S., Remsen C. C. (1983) *Hydrobiologia* 98, p. 193
- [10] Kupferberg S. (1997) *Amer. Zool.* 37, p. 146

Výber a optimalizácia najvhodnejšej metódy na extrakciu proteínov zrna pšenice (*Triticum aestivum*)

Soňa Fekecsová, Martin Hajduch

Slovenská akadémia vied, Ústav genetiky a biotechnológií rastlín, Oddelenie reprodukčnej a vývinovej biológie, Akademická 2, P.O. BOX 39A, 950 07 Nitra, Slovenská republika; sona.fekecsova@savba.sk

Abstrakt

Wheat (*Triticum aestivum*) is the dominant agriculture crop being used in countries with moderate climate. Wheat is important for the production of bread, pasta and other food products and it is used in the manufacture of starch, alcohol and also in the cosmetics industry. The quality of bread depends mainly on wheat's attributes like special storage proteins, gliadins and glutenins. However, these proteins are also known to be responsible for food allergies and intolerances. Nowadays proteomic approaches are considered as appropriate and commonly used methods in the study of plant proteins. However, the most important precise analysis is the correct extraction of the total mixture of proteins. Our goal is to optimize the best method for the extraction of protein fractions. Because of each fraction of cereal proteins have characterized by solubility in different solvent is necessary to create the best protocols for their perfect isolation from protein mixture.

Kľúčové slová: pšenica; proteíny; extrakcia

Úvod a formulácia cieľa

Pšenica (*Triticum aestivum* L.) patrí medzi dominantné plodiny svetového hospodárstva. Patrí jej nezastupiteľné miesto v pekársko-pečivárenskom priemysle pri výrobe chleba, pečiva, cestovín, sušienok, cukrárskych výrobkov. Okrem potravinárskeho spracovania, pšenica ako obilnina s vysokým obsahom škrobu slúži ako surovina na výrobu liehu, ale uplatnenie našla aj v kozmetickom priemysle a v pivovarníctve ako náhrada časti sladu alebo pri výrobe rôznych špeciálnych typov pív [1]. Pšenica je rozhodujúcim zdrojom energie, sacharidov a rastlinných bielkovín, ako aj významným dodávateľom niektorých minerálnych látok (vápnik, železo, fosfor) a vitamínov skupiny B, predovšetkým tiamínu [2]. Široká miera využitia pšenice v potravinárstve či už priamo cez mlynské produkty alebo ako prísada do potravín priniesla i negatívnu stránku v podobe vzniku potravinových intolerancií a alergií. Všestranné využitie pšenice je možné vplyvom jej špecifickej proteínovej skladbe, predovšetkým v podobe zásobných proteínov, ktoré tvoria zhruba 80% sušiny hmotnosti zrna. Proteíny zrna pšenice rozdeľujeme na protoplazmatické (albumíny, globulíny) a zásobné (gliadíny, glutelíny). Albumíny a globulíny predstavujú fyziologicky aktívne proteíny. Zabezpečujú štruktúrne a metabolické funkcie. Zásobné proteíny predstavujú jedinečný súbor bielkovín tvoriacich vysokoelastickú kontinuálnu hmotu (lepok), vďaka čomu sú zodpovedné za typický tvar pekárskych výrobkov [3]. Okrem toho lepok sa často spomína v súvislosti s celiakiou ako najznámejšou potravinovou intoleranciou. Lepok (glutén)

pozostáva najmä z proteínov nazývaných gliadíny a gluteníny, ktoré sú viazané na polysacharid škrob v endosperme zrna obilnín [4]. Gliadíny sa nachádzajú v aleurónovej vrstve zrna a sú zastúpené vysokým obsahom aminokyselín glutamínu (36–45 %) a prolínu (14–30 %). Gluteníny prispievajú k pružnosti lepku a pomocou kovalentných interakcií s gliadínmi stabilizujú lepok. Na detekciu jednotlivých pšeničných frakcií sa používajú rôzne elektroforetické, chromatografické a imunologické metódy. Jednou z najčastejšie používaných metód je elektroforéza a jej vylepšenie - dvojrozmerná elektroforéza [5]. Dvojrozmerná elektroforéza (2-DE) zahŕňa dve po sebe nasledované analýzy a to izoelektrickú fokusáciu (IEF) deliacu proteíny podľa izoelektrického bodu (pI) a vertikálnu diskontinuálnu elektroforézu na polyakrylamidových géloch v prítomnosti dodecyl síranu sodného (SDS). V tomto kroku sa proteíny separujú podľa relatívnej molekulovej hmotnosti. Výsledkom je dvojrozmerné rozloženie proteínov, ktoré je možné následne zafarbiť a skúmať, pričom jeden spot-škrvna zodpovedá jednému proteínu [6].

Materiál a metódy

Izolácia proteínov

Proteínové frakcie boli extrahované z mechanicky homogenizovaných zrelých semien pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L. var. *Lutescens*) slovenskej odrody Viginta. Prvotná extrakcia prebiehala použitím homogenizačného média obsahujúceho fenol v zložení (50% fenol, 0,45 M sacharóza, 5 mM EDTA, 0,2% 2-ME, 50 mM Tris-HCl pH 8,8) a následným zrážaním zmesi celkových proteínov cez noc (-20°C) s ľadovým 0,1M octanom amónnym v 100% metanole podľa protokolu Hurkman a Tanaka (1986) [7]. Po vyzrážaní na druhý deň prebiehalo premývanie proteínov dvakrát v 0,1M octane amónnom v 100% metanole, dvakrát v 80% acetóne a raz v 70% etanole. Prečistené proteíny boli rozpustené v 100µl IEF extrakčného média (8M močovina, 2M tiomočovina, 2 % (w/v) CHAPS, 2% (v/v) Triton X-100, 50 mM dithiothreitol). Následne 50µg proteínu bolo zmiešané s 1,25µl amfolytu s rozhraním pH 5 - 8 a doplnili do výsledného objemu 125µl IEF extrakčným médiom, čím bola pripravená vzorka na izoelektrickú fokusáciu. Pred samotným spustením delenia proteínov bola vzorka centrifugovaná (18 000rpm) pri 4°C 20 min.

Dvojrozmerná elektroforéza (2-DE)

Proteíny boli nanosené na 7 cm dlhé IPG prúžky (BioRad) s rozhraním pH 5–8, 3-10, prekryté minerálnym olejom (1ml) a bol spustený vlastný proces separácie (Protean IEF Cell Bio-Rad). Po prebehnutí izoelektrickej fokusácie prebiehala separácia proteínov v

polakrylamidovom géle v prítomnosti SDS. Pripravené proteomické gély boli farbené pomocou Coomassie Brilliant Blue počas 16 hodín.

Izolácia proteínov

Druhá extrakcia spočívala v extrakcii jednotlivých proteínových frakcií podľa Yang a kol. 2011 s menšími úpravami [8]. 100mg rozdrvených zreých pšeničných semien bolo inkubované s 1 ml 25mM roztoku fosforečnanu sodného pH 7,5 pri 4°C počas 60 minút. Zmes bola mixovaná pri 550rpm. Po centrifugácii (20 800g 10 minút, 4°C) vzniknutý supernatant predstavoval albumínovú frakciu. Zvyšný pelet bol rozsuspendovaný a mixovaný (550rpm) s 1ml roztoku (0,1 M NaCl, 20mM DTT) pri 4°C 60 minút. Následne centrifugovaný pri 20 800g 10 minút 4°C. Čím bola získaná globulínová frakcia pšeničných proteínov. Opätovne bol pelet rozsuspendovaný 1ml 50% propanolu a mixovaný pri 1000rpm pri 21°C 30 minút. Po centrifugácii (20 800g 10 minút, 21°C) vzniknutý supernatant gliadínovej frakcie bol odobratý do čistej skúmavky. Postup pre získanie gliadínovej frakcie bol zopakovaný dvakrát. Pre získanie glutenínovej frakcie bol zvyšný pelet rozsuspendovaný roztokom (50mM Tris-HCl pH 7,5, 1% DTT) a mixovaný pri 1000rpm pri 60°C počas 30 minút, pričom každých 5 minút bolo mixovanie prerušené na dobu 30s. Následne prebehla centrifugácia vzorky pri 10 000g 10minút pri 21°C a supernatant bol prenesený do čistej skúmavky. Všetky odobraté frakcie boli zrážané 5-násobným objemom 0,1M octanu amónneho v 100% metanole pri 4 °C cez noc a premývanie prebehlo rovnako ako pri extrakcii fenolom.

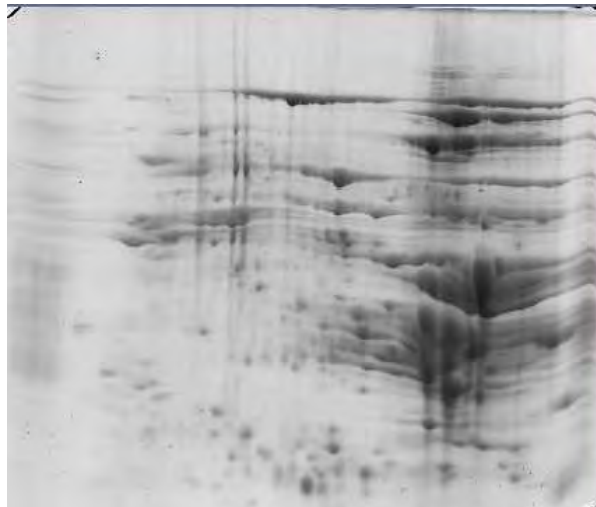
Dvojrozmerná elektroforéza (2-DE)

Separácia proteínov prebiehala tiež rovnakým spôsobom pomocou proteínovej dvojrozmernej elektroforézy. Proteíny boli vizualizované po farbení s Coomassie Brilliant Blue.

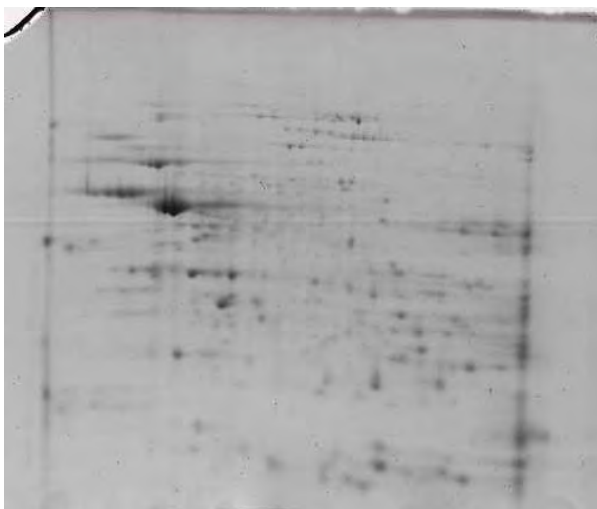
Výsledky a diskusia

Po izoelektrickej fokusácii (IEF) s pH rozhraním 5-8 a 3-10 a farbení gélov pomocou Coomassie Brilliant Blue sme získali proteínové gély vyizolovaných proteínov zo semien pšenice. Proteínový gél extrahovaných proteínov pomocou fenolu síce predstavoval zmes všetkých proteínov (Obr. 1), ale vzhľadom na nedokonalé rozseparovanie ho nie je možné použiť na ďalšie analýzy. Na druhej strane gély obsahujúce jednotlivé frakcie cereálnych proteínov (Obr. 2, 3, 4, 5) extrahované zmesou rôznych rozpúšťadiel predstavujú dobre

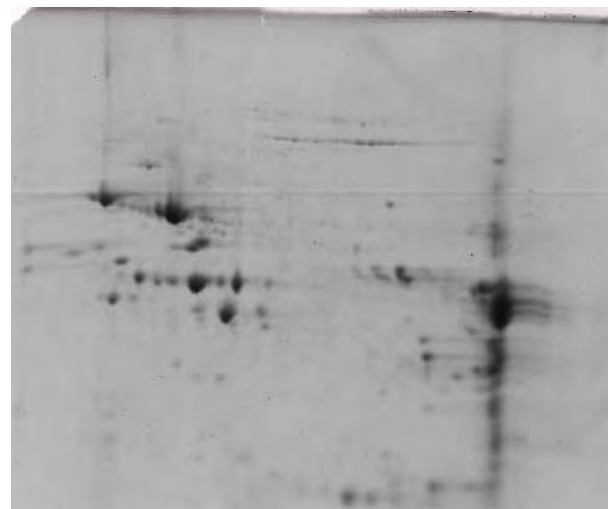
viditeľné samostatné škvrny proteínov vhodné na analýzy pomocou hmotnostnej spektrometrie.



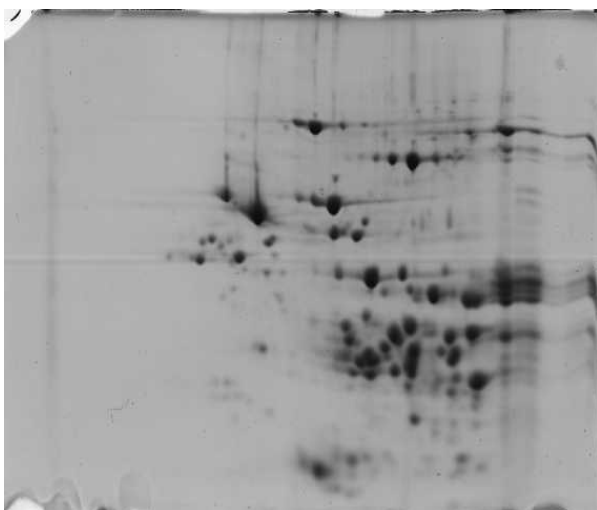
Obr. 1 Proteomický gél pšeničných proteínov extrahovaných fenolom (pH 3-10)



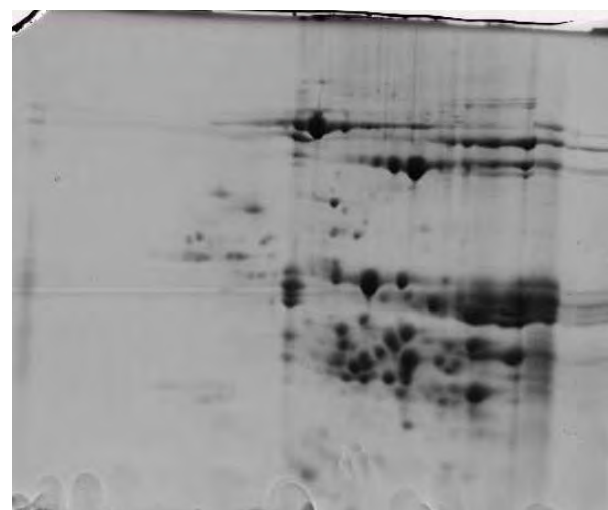
Obr. 2 Albumínová frakcia (pH 5-8)



Obr. 3 Globulínová frakcia (pH 5-8)



Obr.4 Gliadínová frakcia (pH 3-10)



Obr. 5 Glutenínová frakcia (pH 3-10)

Záver

Z vytvorených proteínových dvojrozmerných gélov zrna pšenice budú v nasledovných analýzach jednotlivé proteínové škvrny vyrezané a podrobené identifikácii na hmotnostnom spektrometri. Dáta sa budú ďalej spracovávať bioinformatickými metódami za účelom identifikácie bielkovín. Získané údaje nám poskytnú detailnejšie informácie a ucelený pohľad o pšeničných proteínoch.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Kumar P., Yadava R.K., Gollen, B., Kumar S., Verma R.K., Yadav S. (2011) Life Sci Med Res., vol. 22, p. 1
- [2] Tatham A.S., Shewry P.R. (2008) Clin. Exp. Allergy. 38(11), p. 1712
- [3] Belderok B., Mesdag H. Donner D.A. (2000) Bread-Making Quality of Wheat, Springer, New York, p. 155
- [4] Mamone G., Picariello G., Addeo F., Ferranti P. (2011) Expert rev. proteomic. 8(1), p. 95
- [5] Hulín P., Dostálek P., Hochel I. (2008) Chem. Listy. 102(5), p. 327
- [6] Kellner R.L.F., Meyer H.E., Wiley V.Ch. (1999) Microcharacterization of Proteins, p. 325
- [7] Hurkman W.J., Tanaka C.K. (1986) J. plant. physiol. 81(3), p. 802
- [8] Yang F., Jørgensen A.D., Li H., Søndergaard I.B., Finnie Ch., Svensson B., Jiang D., Wollenweber B., Jacobsen S. (2011) J Proteomics. 11(9), p. 1684

Kvantitatívna analýza génovej expresie apoptózy nenádorových buniek indukovaná fotoaktivovaným hypericínom

Jana Feruszová¹, Andrea Šoltýsová², Eliška Gálová¹

¹ *Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;*

² *Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; jana.feruszova@gmail.com*

Abstrakt

Hypericin is currently one of the most promising drugs used in photodynamic therapy (PDT), particularly because of its minimal toxic effects in dark and strong antitumor activity after photoactivation. There is a lot of information regarding the effects of hypericin on the molecular level, but its complete molecular mechanism of action and its effect on non-tumor tissue is still not completely understood. Therefore in our experiment, we subjected selected line of mouse liver epithelial cells to hypericin mediated photodynamic therapy (HY-PDT) and subsequent microarray analysis. The results suggest that HY-PDT induces apoptosis of non-tumor cells cultured *in vitro* by increasing the expression of apoptosis-inducing genes and down-regulation of anti-apoptotic genes.

Kľúčové slová: *microarray; hypericin; expresia*

Úvod a formulácia cieľa

Hypericin sa v posledných rokoch študuje najmä pre jeho využitie ako liečiva pri fotodynamickej terapii (PDT). Významné sú jeho schopnosti selektívne vyhľadávať nádorové bunky a tiež jeho minimálna toxicita bez fotoaktivácie [1]. Táto biologicky aktívna zložka je dokonca jednou z najsilnejších fotosenzitívnych látok nachádzajúcich sa v prírode [2].

Fotodynamická terapia je bezbolestná iteričná metóda, ktorá môže byť použitá ako kombinovaná liečba, ale aj ako samostatná terapia [3]. Je založená na podávaní netoxickej látky, ktorá sa selektívne uskladňuje v nádorových bunkách a následne sa ožiari viditeľným svetlom za prítomnosti kyslíka. Počas ožarovania sa fotosenzitizér aktivuje a generuje ROS (*reactive oxygen species*), ktoré sú toxické pre nádorové bunky a vedú k smrti týchto buniek a zároveň k indukcii apoptózy nádorového tkaniva [4].

V posledných rokoch sa vedci zaujímali najmä o *in vitro* a *in vivo* účinky hypericínu na nádorové bunky. Colasanti a jeho kolektív odborníkov vo svojej práci potvrdili farmakologickú účinnosť nízkych koncentrácií hypericínu po PDT. Na svoje experimenty použili nádorové bunky prostaty. Autori tiež zistili, že HY-PDT je vhodným kandidátom pre liečbu nádorov prostaty, ktoré už nereagujú ani na androgénnu terapiu [5].

V roku 2010 skupina vedcov Wang a kolektív vo svojej práci na nádorových bunkách CNE-2 (*human nasopharyngeal carcinoma cell line*) viacerými experimentmi potvrdili, že fotoaktivovaný hypericín v bunke spustí tvorbu ROS, ktoré napádajú mitochondriálnu membránu ako aj DNA priamym aj nepriamym spôsobom. Zistili tiež, že HY-PDT aktivuje endopeptidázy cysteínového typu, ktoré inhibujú rast buniek a indukujú apoptózu [6].

V roku 2012 Krammer a Verwanger vo svojej práci publikovali, že po pôsobení nízkych dávok hypericínu na nádorové bunky a po jeho následnej fotoaktivácii sú bunky schopné rásť. Zistili, že tento proces je indukovaný prostredníctvom p38 alebo *JNK survival pathways*, čo sú dráhy aktivované aj pri stresovej odpovedi [7].

Aj napriek veľkému množstvu poznatkov z oblasti genotoxikológie a molekulárnej biológie, kompletný molekulárny mechanizmus pôsobenia hypericínu doposiaľ nie je známy. Aj preto bolo naším prvotným cieľom odhaliť signálne dráhy zapojené v procese hypericínom sprostredkovanvej fotodynamickej terapie v nenádorových bunkách, a tým zefektívniť výskum v oblasti HY-PDT. V našej práci sme sa zamerali na schopnosť hypericínu indukovať apoptózu po kultivácii nenádorových buniek v podmienkach *in vitro*.

Materiál a metódy

Experimenty sme uskutočňovali na epiteliálnych bunkách izolovaných z pečene potkana – WBF 344.

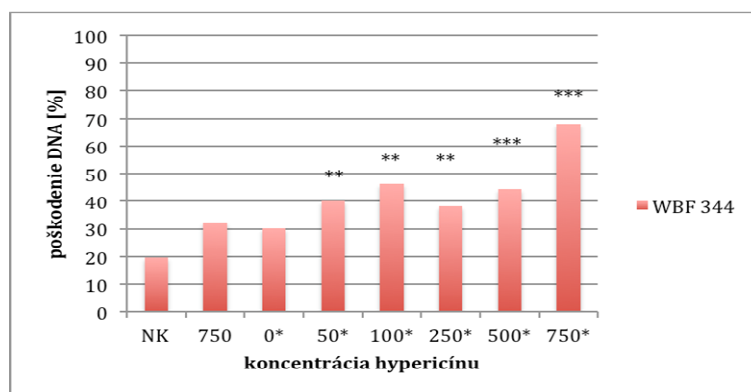
Prípravu buniek a fotoaktiváciu hypericínu sme realizovali podľa viacerých autorov [8, 9, 10].

Na zistenie potenciálneho genotoxického účinku hypericínu sme využili metódu *Comet assay* modifikovanú podľa [11, 12, 13] na nami zvolený modelový organizmus.

Na odhalenie molekulárneho mechanizmu účinku hypericínu sme využili metódu *Microarray*, pri ktorej sme boli schopní súčasným monitorovaním expresného profilu veľkého množstva génov sledovať vplyv hypericínu na zmenu ich expresného profilu, ktorý sa mení vplyvom študovaného liečiva. Pri realizácii experimentu sme postupovali podľa metód zverejnených na [14]. Izoláciu a purifikáciu RNA sme realizovali pomocou *Total RNA Isolation Mini Kit*. Podstatou *Microarray* metódy bola izolácia RNA z kontrolných aj ovplyvnených vzoriek, ich značenie Cy3 alebo Cy5 farbivkami, fragmentácia značenej RNA a jej nanášanie na *microarray* sklíčko, hybridizácia fragmentov RNA a následné skenovanie a analýza čipu použitím počítačového programu *GeneSpring GX*.

Výsledky a diskusia

Metóda *Comet assay* nám umožnila po ovplyvnení sledovaných epiteliálnych buniek pečene potkana rôznymi koncentraciami hypericínu, ich následnej fotoaktivácii, lýze a elektroforóze stanoviť koncentrácie sledovanej látky, ktoré pôsobia na DNA epiteliálnych pečeneňových buniek genotoxicky.



Obr. 1 Stanovenie percenta poškodenia DNA WBF 344 buniek po ovplyvnení hypericínom a následnej fotoaktivácii. (NK) – negatívna kontrola, nefotoaktivované bunky bez predovplyvnenia hypericínom. (750) – bunky ovplyvnené hypericínom s koncentraciou 750 ng.ml^{-1} , bez fotoaktivácie. (0*; 50*; 100*; 250*; 500*; 750*) – jednotlivé koncentrácie fotoaktivovaného hypericínu udávané v ng.ml^{-1} . Štatistická významnosť výsledkov je označená * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ and *** - $p < 0,001$

Na základe našich výsledkov sme si zvolili koncentráciu hypericínu 100 ng.ml^{-1} , ktorá štatisticky významne poškodzuje DNA zvolenej bunkovej línie avšak ako vyplýva z našich predošlých výsledkov, nespôsobuje vyššie percento apoptózy ako 30 % u sledovaných nádorových a nenádorových buniek (dáta neuvádzame).

Nakoľko je známe, že vyššie koncentrácie hypericínu po PDT indukujú apoptózu nádorových buniek [2] a molekulárny mechanizmus vplyvu hypericínu na nádorové bunky bol už z časti popísaný viacerými štúdiami [15, 16, 17], naším cieľom bolo zistiť, či po pôsobení hypericínu (100 ng.ml^{-1}) na nenádorovú myšiaciu bunkovú líniu a po následnej fotoaktivácii sa významne aktivujú dráhy zodpovedné za proces apoptózy, a tiež objasniť, ktoré gény indukujú apoptózu v nenádorových bunkách.

Po realizácii experimentu a bioinformatickej analýze *microarray* čipu, sme sa zamerali na štatisticky významne zastúpenú metabolickú dráhu apoptózy. Z porovnávacej analýzy vyplýva, že v ovplyvnenej a následne ožiarenej vzorke sa zvýšila expresia napr. Fas ligandu (Faslg) a tiež Fas receptora (Fas). Ich vzájomná interakcia spolu s FADD (*Fas-associated death domain protein*), kaspázou 8 a kaspázou 10 umožňuje vznik signalizačného komplexu

vyvolávajúceho bunkovú smrť. Autoproteolytické štiepenie kaspáz následne umožňuje aktiváciu *downstream* kaspáz čo vedie k apoptóze [18]. Na základe našich výsledkov môžeme tvrdiť, že fotoaktivovaný hypericín v nenádorových bunkách zvyšuje expresiu kaspázy 4 a kaspázy 3, ktorá hrá kľúčovú úlohu v exekučnej fáze apoptózy [18], ale tiež Bak1 génu, ktorý kóduje proteín lokalizovaný v mitochondriách a indukuje apoptózu [18].

V signálnej dráhe apoptózy po pôsobení HY-PDT sme tiež zaznamenali zníženie expresie niektorých antiapoptických génov, ako napr. Mcl1, Bcl2 alebo génov inhibujúcich apoptózu ako napr Birc2.

Záver

Z našich výsledkov vyplýva, že fotoaktivovaný hypericín je schopný štatisticky významne navodiť apoptózu aj sledovaných nenádorových buniek po ich kultivácii v *in vitro* podmienkach, up-reguláciou expresie zaznamenaných génov indukujúcich apoptózu a naopak down-reguláciou expresie vyššie spomínaných génov zapojených do inhibície priebehu apoptózy.

Nami získané výsledky sú nevyhnutné pre pochopenie pôsobenia hypericínu pri PDT na molekulárnej úrovni. A zároveň dávajú predpoklad pre syntézu účinných protinádorových liečiv.

Pod'akovanie

Táto práca bola finančne podporená grantom APVV-0040-10

Zoznam použitej literatúry

- [1] Agostinis P., Vantieghem A., Merlevede W., de Witte P. A. (2002) Int. J. Biochem. Cell Biol. 34, p. 221
- [2] Castano A. P., Demidova T. N., Hamblin M. R. (2004) Photodiagn. Photodyn. Ther. 1, p. 279
- [3] INTECH [Citované: 2. marec 2013] <<http://www.intechopen.com/books/breast-cancer-current-and-alternative-therapeutic-modalities/breast-cancer-and-current-therapeutic-approaches-from-radiation-to-photodynamic-therapy>>
- [4] Karioti A., Bilia A. R. (2010) Int. J. Mol. Sci. 11, p. 562
- [5] Colasanti A., Kisslinger A., Liuzzi R., Quarto M., Riccio P., Roberti G., Tramontano D., Villani F. (2000) J. Photochem. Photobiol. B. 54, p. 103

- [6] Wang X., Guo Y., Yang S., Wang C., Fu X., Wang J., Mao Y., Zhang J., Li Y. (2010) *J Pharmacol Exp Ther.* 334, p. 847
- [7] Krammer B., Verwanger T. (2012) *Curr. Med. Chem.* 6, p. 793
- [8] Jendželovský R., Mikeš J., Koval' J., Souček K., Procházková J., Kello M., Sačková V., Hofmanová V., Kozubík A., Fedoročko P. (2009) *Photochem. Photobiol. Sci.*, 8, p. 1716
- [9] Kleban J., Mikeš J., Horváth V., Sačková V., Hofmanová J., Kozubík A., Fedoročko P. (2008) *J. Photochem. Photobiol. B.* 93, p. 108
- [10] Mikeš J., Koval' J., Jendželovský R., Sačková V., Uhrinová I., Kello M., Kuliková L., Fedoročko P. (2009) *Photochem. Photobiol. Sci.* 8, p. 1558
- [11] Collins A. R. (2004) *Mol. Biotechnol.* 26, p. 249
- [12] Gichner T. (2003) *Mutat Res.* 538, p. 171
- [13] Speit G., Hartmann A. (2006) *Methods Mol Biol.* 314, p. 275
- [14] Agilent Technologies [Citované: 2. marec 2013]
<http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4140-90051_Two-Color_Tecan.pdf>
- [15] Ali S. M., Olivo M., Yuen G. Y., Chee S. K. (2001) *Int J Mol Med.* 5, p. 521
- [16] Ali S. M., Chee S. K., Yuen G. Y., Olivo M. (2002) *Int J Mol Med.* 6, p. 601
- [17] Berlanda J., Kiesslich T., Oberdanner C. B., Obermair F. J., Krammer B., Plaetzer K. J. (2006) *Environ Pathol Toxicol Oncol.* 25, p. 173
- [18] National Center for Biotechnology Information [Citované: 2. marec 2013]
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>>

Apoptóza nádorových buniek indukovaná fotoaktivovaným hypericínom

Jana Ferussová¹, Andrea Šoltýsová², Peter Ditte³, Eliška Gálová¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; jana.ferussova@gmail.com

² Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

³ Slovenská Akadémia Vied, Virologický ústav, Oddelenie molekulárnej medicíny, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika

Abstrakt

Hypericin as a natural product is especially known for its beneficial effects on the human body. The aim of our study was to monitor the impact of the wide range of concentration of photoactivated hypericin on its ability to induce DNA damage of non-cancer cells, and also its ability to induce cell growth inhibition, apoptosis and reduce viability of tested cancer cells using a variety of molecular-genetic methods.

Kľúčové slová: apoptóza; hypericín; genotoxicita; inhibícia rastu; viabilita

Úvod a formulácia cieľa

Hypericum perforatum L. (ľubovník bodkovaný), známy tiež ako bylina sv. Jána, ľubočník, je v súčasnosti jednou z navýznamnejších liečivých rastlín [1].

Z taxonomického hľadiska ju zaradujeme do rodu *Hypericum*, čeľade Hypericaceae, radu Malpighiales [2].

Hypericín je charakteristickou biologicky aktívnou zlúčeninou, ktorú zaradujeme medzi naftodiantróny. Spomínaná zlúčenina bola po prvýkrát izolovaná z komerčne často využíwanej rastliny - *Hypericum perforatum* L. [3] a je zodpovedná za veľké množstvo jej pozitívnych účinkov [4].

Hypericín sa v posledných rokoch študuje najmä pre jeho využitie ako liečiva pri fotodynamickej terapii (PDT). Fotodynamická terapia je založená na podávaní netoxickéj látky, ktorá sa selektívne uskladňuje v nádorových bunkách a následne sa ožiari viditeľným svetlom za prítomnosti kyslíka. Takáto látka je potom označovaná ako fotosenzitizér. Počas ožarovania sa fotosenzitizér aktivuje a generuje ROS (*reactive oxygen species*), ktoré sú toxické pre nádorové bunky a vedú k smrti týchto buniek a zároveň k rozkladu daného tkaniva [3].

Materiál a metódy

Na sledovanie vplyvu rôznych koncentrácií hypericínu na poškodenie DNA nenádorových buniek, ľudských lymfocytov sme využili metódu *Comet assay* [5, 6]. Pri realizácii experimentu sme použili podložné mikroskopické sklíčka so zábrusom s vrstvou 1 % *normal melting point* agarózy. Zmes lymfocytov izolovaných z periférnej krvi získanej metódou *finger prick* a 1 % roztok *low melting point* agarózy sme nanášali na podložné mikroskopické sklíčka a vložili na 1 hodinu do vopred pripraveného roztoku s požadovanou koncentráciou hypericínu. Po ovplyvnení ukotvených lymfocytov sme sklíčka vložili na 1 hodinu do lyzačného roztoku. Následne sme podložné mikroskopické sklíčka s ukotvenou jadrovou DNA nechali odvíjať 20 minút pri 4 °C, čím sme zabezpečili rozvoľnenie molekuly DNA. Po 20 minútach sme spustili elektroforézu pri 4 °C, konštantnom napätí 25 V, elektrickom prúde 260-320 mA a s dĺžkou trvania 30 minút. Následne sme sklíčka neutrallizovali v roztoku PBS a v destilovanej vode. Po minimálne 12 hodinách sušenia pri laboratórnej teplote sme sklíčka farbili pomocou 25 µl fluorescenčného farbiva etídium bromid (EtBr) a hodnotili poškodenie DNA pomocou fluorescenčného mikroskopu OLYMPUS BX 51.

Ďalšie experimenty sme realizovali na nádorových bunkách, ktoré sme ovplyvňovali a kultivovali podľa postupov publikovaných autormi z laboratória prof. Fedoročka [7, 8, 9]. Pomocou Bürkerovej komôrky sme analyzovali inhibíciu rastu sledovaných nádorových buniek po ich ovplyvnení zvolenými koncentraciami hypericínu a následnej fotoaktivácii oproti neovplyvnenej kontrole. V prvý deň experimentu sme nasádzali do jednotlivých jamiek kultivačnej platničky $5 \cdot 10^3$ buniek.

Využitím florescenčnej cytometrie sme detekovali schopnosť hypericínu indukovať apoptózu rôznych typov nádorových buniek. Bunky sme po ovplyvnení, fotoaktivácii a 48 hodinovej inkubácii [7, 8, 9] scentrifugovali a premyli v roztoku PBS. Následne sme adherentné nádorové bunky strypsinizovali a po ich uvoľnení z dna kultivačnej nádoby sme bunky zneutralizovali s roztokom verzénu s prídavkom 10 % FCS (*fetal calf serum*). Následne sme bunky fixovali na ľade v 70 % etanole. Po fixácii sme bunky hydratovali roztokom verzénu a preniesli do 96 jamkovej platničky kde sme ich inkubovali 30 minút pri 37°C s prídavkom interkalačného farbiva propidium jodidu a s prídavkom RNázy. Po 30 minútach sme florescenciu propidium jodidu analyzovali využitím FL2 kanálu florescenčnej cytometrie. Na kvantifikáciu počtu apoptických buniek sme využili počítačový program *InCyte*.

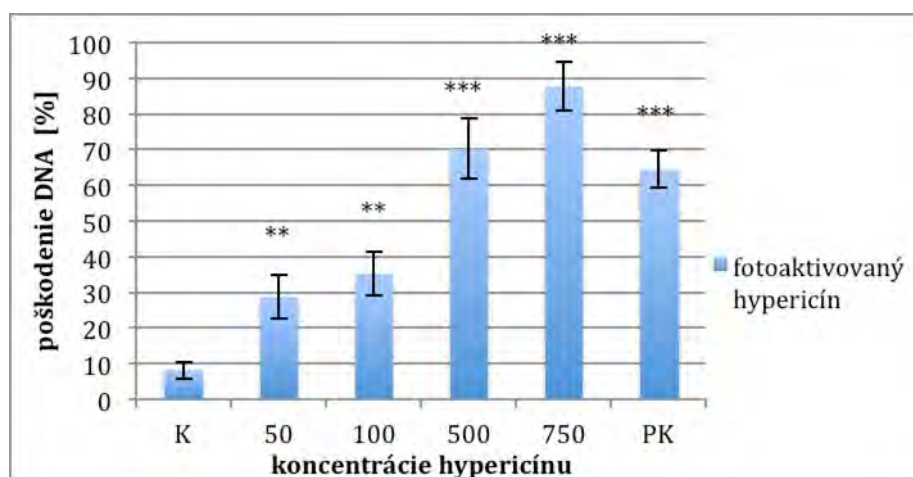
Na určenie viability sme hypericínom ovplyvnené a ožiarené bunky scentrifugovali, premyli, strypsinizovali, podobne ako to bolo pri analýze apoptózy a následne sme pri neutralizácii strypsinizovaných buniek použili verzén s prídavkom 10 % FCS a propídium jodidom. Takto pripravenú zmes sme preniesli do 96 jamkovej platničky a analyzovali viabilitu využitím FL2 kanálu florescenčnej cytometrie a počítačového programu *InCyte*.

Na odhalenie molekulárneho mechanizmu účinku hypericínu sme využili metódu *Microarray*, pri ktorej sme súčasným monitorovaním expresného profilu veľkého množstva génov sledovali vplyv hypericínu na zmenu ich expresného profilu, ktorý sa mení vplyvom študovaného liečiva pričom sme sa zamerali najmä na proces apoptózy. Pri realizácii experimentu sme postupovali podľa metód zverejnených na [10]. Izoláciu a purifikáciu RNA sme realizovali pomocou *Total RNA Isolation Mini Kit*. *Microarray* čip sme analyzovali pomocou softvéru GeneSpring GX.

Štatistickú analýzu sme spracovali pomocou t-testu.

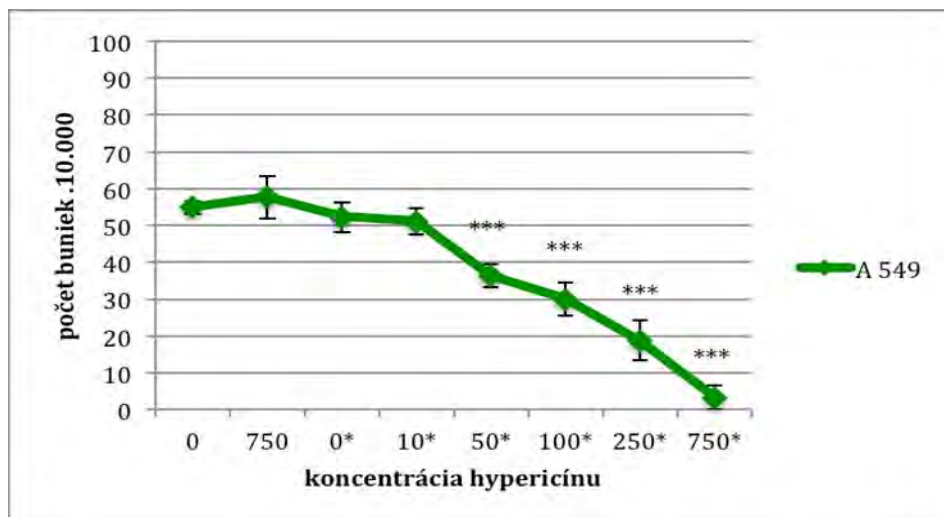
Výsledky a diskusia

Po vyhodnotení experimentu metódou *Comet assay* sme získali percento poškodenia DNA po pôsobení hypericínu na ukotvené bunky a po ich následnom ožiarení (Obr. 1). Získané výsledky nám poskytli prehľad vplyvu použitých koncentrácií na DNA vybraného typu buniek. Na základe týchto výsledkov sme postupovali aj pri výbere koncentrácií a pri realizácii ďalších experimentov.



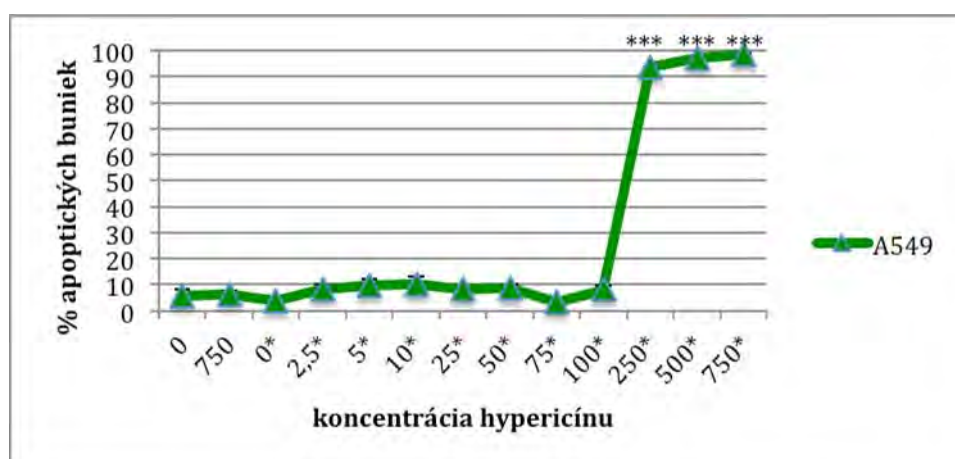
Obr. 1 Stanovenie percenta poškodenia DNA ľudských lymfocytov po ovplyvnení hypericínom a následnej fotoaktivácii. (K) – negatívna kontrola, fotoaktivované bunky bez predovplyvnenia hypericínom. (PK) – pozitívna kontrola s prídavkom 100 μM roztoku peroxidu vodíka. (50; 100; 500; 750) – jednotlivé koncentrácie hypericínu udávané v $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Štatistická významnosť výsledkov je označená * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ and *** - $p < 0,001$

Po spočítaní buniek pomocou Bürkerovej komôrky sme zistili, že vyššie koncentrácie hypericínu štatisticky významne znižujú rast sledovaných nádorových buniek (Obr. 2).

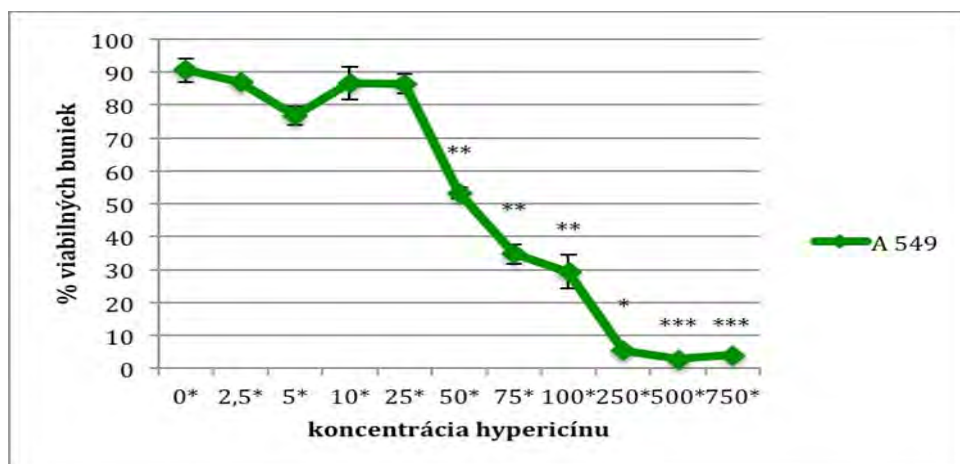


Obr. 2 Inhibícia rastu nádorových buniek po ich ovplyvnení hypericínom a následnom ožiarení. (0) – negatívna kontrola, nefotoaktivované bunky bez predovplyvnenie hypericínom. (750) – bunky ovplyvnené hypericínom s koncentráciou 750 ng.ml^{-1} , bez fotoaktívácie. (0*; 10*; 50*; 100*; 250*; 750*) – jednotlivé koncentrácie fotoaktivovaného hypericínu udávané v ng.ml^{-1} . Štatistická signifikantnosť výsledkov je označená * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ and *** - $p < 0,001$

Z výsledkov vylýva, že hypericín je skutočne schopný inhibovať rast sledovaných nádorových buniek. Nás zaujímalo, aký mechanizmus tento jav spôsobuje. Po analýze apoptózy sme zistili, že už koncentrácia fotoaktivovaného hypericínu 250 ng.ml^{-1} štatisticky významne indukuje apoptózu sledovaných nádorových buniek (Obr. 3). Zistili sme tiež, že fotoaktivovaný hypericín štatisticky významne znižuje viabilitu buniek (Obr. 4). Pričom ani najvyššia testovaná koncentrácia nefotoaktivovaného hypericínu tieto vlastnosti nevykazovala.



Obr. 3 Vplyv jednotlivých koncentrácií fotoaktivovaného hypericínu na apoptózu nádorových buniek. (0) – negatívna kontrola, nefotoaktivované bunky bez predovplyvnenie hypericínom. (750) – bunky ovplyvnené hypericínom s koncentráciou 750 ng.ml⁻¹, bez fotoaktivácie. (0*; 2,5*; 5*; 10*; 25*; 50*; 75*; 100*; 250*; 500*; 750*) – jednotlivé koncentrácie fotoaktivovaného hypericínu udávané v ng.ml⁻¹. Štatistická signifikantnosť výsledkov je označená * - p<0,05; ** - p<0,01 and *** - p<0,001



Obr. 4 Vplyv jednotlivých koncentrácií fotoaktivovaného hypericínu na viabilitu nádorových buniek. (0) – negatívna kontrola, nefotoaktivované bunky bez predovplyvnenie hypericínom. (750) – bunky ovplyvnené hypericínom s koncentráciou 750 ng.ml⁻¹ bez fotoaktivácie. (0*; 2,5*; 5*; 10*; 25*; 50*; 75*; 100*; 250*; 500*; 750*) – jednotlivé koncentrácie fotoaktivovaného hypericínu udávané v ng.ml⁻¹. Štatistická signifikantnosť výsledkov je označená * - p<0,05; ** - p<0,01 and *** - p<0,001

Naším cieľom bolo tiež potvrdiť schopnosť hypericínu indukovať apoptózu na úrovni génov. Po realizácii metódy *Microarray* a po následnej analýze neovplyvnenej fotoaktivovanej vzorky (kontroly), so vzorkou ovplyvnenou hypericínom s koncentráciou 100 ng.ml⁻¹ a následne fotoaktivovanou sme pomocou počítačového programu GeneSpring GX analyzovali niekoľko molekulárnych dráh, ktoré sa preukázali ako signifikantne zastúpené v ovplyvnených vzorkách oproti kontrolným. Medzi nimi bola aj dráha indukujúca apoptózu. To je dôkaz, že hypericínom sprostredkovaná PDT môže skutočne zvyšovať expresiu génov indukujúcich apoptózu sledovaných buniek a naopak znižovať expresiu antiapoptických génov.

Záver

V našej práci sme si pomocou metódy *Comet assay* zvolili koncentrácie fotoaktivovaného hypericínu na základe ich schopnosti indukovať poškodenie DNA. Zvolené koncentrácie sme následne aplikovali na nádorové bunky a zaznamenali sme signifikantnú inhibíciu ich rastu. Využitím fluorescenčnej cytometrie sme zistili, že inhibícia rastu je spôsobená schopnosťou fotoaktivovaného hypericínu znižovať viabilitu buniek a tiež

schopnosťou fotoaktivovaného hypericínu navodiť apoptózu sledovaných nádorových buniek. Metódou *Microarray* sme na záver potvrdili naše zistenia o schopnosti hypericínu indukovať apoptózu.

Pod'akovanie

Táto práca bola finančne podporená grantom APVV-0040-10.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Kresánek J., Krejča J. (1977) Atlas liečivých rastlín a lesných plodov. Osveta, Martin, p. 170
- [2] Mártonfi P. (2007) Systematika cievnatých rastlín. Vydavateľstvo Univerzity P. J. Šafárika, Košice, p. 1
- [3] Karioti A., Bilia A. R. (2010) Int. J. Mol. Sci., 11, p. 562
- [4] Takahashi I., Nakanishi S., Kobayashi E., et al. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 165, p. 207
- [5] Gichner T. (2008) Mutat. Res. 652, p. 186
- [6] Collins A. R. (2004) Mol. Biotechnol. 26, p. 249
- [7] Jendželovský R., Mikeš J., Kovaľ J., et al. (2009) Photochem. Photobiol. Sci., 8, p. 1716
- [8] Kleban J., Mikeš J., Horváth V., et al. (2008) J. Photochem. Photobiol. B. 93, p. 108
- [9] Mikeš J., Kovaľ J., Jendželovský R., et al. (2009) Photochem. Photobiol. Sci. 8, p. 1558
- [10] Agilent Technologies [Citované: 2. marec 2013] <http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4140-90051_Two-Color_Tecan.pdf>

Príprava glykokonjugátu z manooligosacharidu a proteínu ako potenciálnej antifungálnej vakcíny

Lucia Fiačanová¹, Eva Machová²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika;

lfiacanova@gmail.com

²Slovenská akadémia vied, Chemický ústav, Oddelenie imunochémie glykokonjugátov, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava, Slovenská republika

Abstrakt

The first part of thesis was focused on the isolation and characterization of mannan – the majority of carbohydrate antigen of the cell wall of the yeast form of *C. albicans* (CCY 29-3-103) serotype B, and the subsequent preparation of glycoconjugate from selected oligosaccharide and protein. The prepared mannan was subjected to structural analysis (elemental analysis, gas chromatography, NMR spectroscopy) and it was found, that acid-labile domain of mannan is containing only α -linked mannosyl units. Mixture of manooligosaccharides was prepared by specific cleavage of the main chain, and individual oligomers was separated by gas chromatography on the column of Biogel P-2. The demand for the preparation of glycoconjugate was to obtain product with high density of oligosaccharides in molecule of protein. The method of reductive amination was chosen for the preparation of glycoconjugate from selected tetramer and protein (BSA). The extent of conjugation was determined using MALDI-TOF MS method. In conjugate, 12 molecules of tetramer were bound to one molecule of BSA. This is sufficient density of antigenic determinants in molecule of glycoconjugate.

Kľúčové slová: *C. albicans*; manán; manooligoméry; imunitná odpoveď; glykokonjugát

Úvod a formulácia cieľa

C. albicans je oportúnny patogén, ktorý v súčasnosti predstavuje hrozbu najmä pre imunokompromitovaných jedincov. Aj napriek širokému spektru dostupných antifungálnych látok je úmrtnosť pacientov postihnutých kandidózou 30 – 50 %, a preto je potrebné hľadať alternatívne možnosti profylaxie a liečby [1]. Alternatívnym riešením v boji proti kandidózam je vakcinácia ohrozených jedincov [2]. Glykokonjugáty sa javia ako vhodné vakcíny, ktoré by sa v budúcnosti mohli využívať na profylaxiu a na terapiu kandidóz [3]. Glykokonjugáty sú tvorené fungálnym polysacharidom získaným z bunkovej steny. Takýto fungálny polysacharid predstavuje T-nezávislý antigén, ktorý indukuje len slabú imunitnú odpoveď. Po konjugácii fungálneho polysacharidu na proteínový nosič vznikne glykokonjugát, ktorý predstavuje T-závislý antigén. Podanie glykokonjugátu vedie po stretnutí s bunkami imunitného systému k vzniku imunitnej pamäte, ktorá je nevyhnutným fenoménom vakcinácie [4].

Cieľom práce je izolácia a charakterizácia manánu, majoritného sacharidového antigénu bunkovej steny kvasinkovej formy *C. albicans*, sérotyp B a následná príprava konjugátu z vybraného manooligoméru a proteínu.

Materiál a metódy

V práci bol použitý kmeň *C. albicans* CCY 29-3-103 sérotyp B zo zbierky kultúr kvasiniek CCY (Culture Collection of Yeast) so sídlom na Chemickom ústave SAV v Bratislave.

Kultivácia kvasinkovej formy kmeňa *C. albicans* CCY 29-3-103 sérotyp B. Kmeň bol oživený z kryoprotektívneho média preočkovaním na YPD agar (staticky, 27 °C, 24 h). Vyrastená kultúra sa následne preočkovala do 1000 ml banky s plochým dnom, ktorá obsahovala 600 ml tekutého YPD média. Naočkovaná kultúra sa kultivovala počas 48 h pri 27 °C na trepačke (108 ot/min). Vyrastená kultúra bola od média oddelená centrifugáciou (30 min, 3200 ot/min, 4 °C), získaná biomasa sa 2-krát premyla destilovanou vodou a 1-krát fyziologickým roztokom.

Izolácia manánu z bunkových stien kvasinkovej formy *C. albicans* CCY 29-3-103 sérotyp B sa uskutočnila pomocou cetavlonu podľa Lloyda [5]. Následne sa acetolýzou pripravili manooligoméry [6].

Rozdelenie manooligosacharidov sa realizovalo vylučovacou chromatografiou na kolóne Biogel P2. Pre prípravu konjugátu bol vybraný tetramér.

Tetramér sa konjugoval na hovädzí sérový albumín (BSA) metódou redukčnej aminácie optimalizovanou pre prípravu glykokonjugátov [7]. Rozsah konjugácie sa analyzoval prostredníctvom hmotnostnej spektrometrie (MALDI-TOF MS).

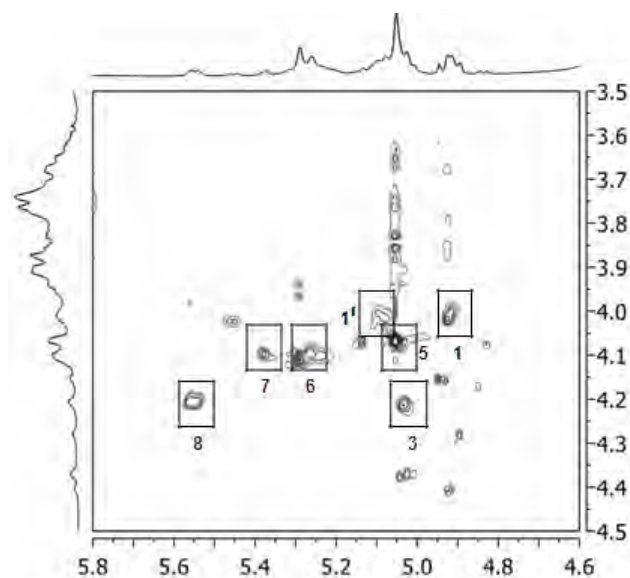
Výsledky a diskusia

Izolácia a charakterizácia manánu z bunkových stien kvasinkovej formy CCY 29-3-103 sérotyp B: z jednej kultivácie t.j. z 25 l inokulovaného média sa získalo 0,691 g manánu. V priebehu izolácie manánu boli izolované 3 frakcie, z ktorých sa na ďalšie experimenty použila frakcia B.

Stanovenie sacharidového zloženia frakcie B plynovou chromatografiou: frakcia B bola pre nás významnejšia, pretože podľa literárnych údajov má obsahovať najväčší obsah manózy. Plynovou chromatografiou sme zistili, že vzorky skutočne obsahovali veľké množstvo manózy - 92,8 %. Vo vzorkách sa nachádzala v zanedbateľnom množstve glukóza 2,9 %, ribóza 2,8 % a arabinóza 1,6 %.

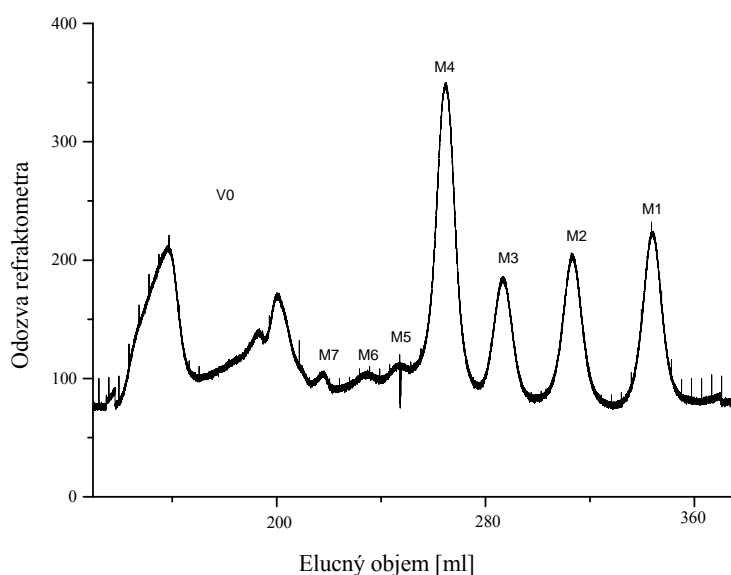
NMR (nukleárna magnetická rezonancia) manánu: Na posúdenie štruktúry pripraveného manánu sa merali jednorozmerné ¹H NMR spektrá a dvojrozmerné homokorelované ¹H - ¹H TOCSY NMR spektrá (obr. 1): manán *C. albicans* sérotyp B z kvasinkovej formy má vetvenú štruktúru, nevetvenému α-(1→6)-viazanému hlavnému

reťazcu prislúchajú signály **1** (δ 4,92/4,00 ppm) a **1'** (δ 5,1/4,00 ppm). Signál **8** (δ 5,54/4,12 ppm) je charakteristický pre β -(1 \rightarrow 2)-viazané manooligosacharidové reťazce v acido-labilnej oblasti manánu. Signály **3** (δ 5,03/4,21 ppm), **5** (δ 5,05/4,06 ppm), **6** (δ 5,28/4,10 ppm) a **7** (δ 5,37/4,09 ppm) prislúchajú α -(1 \rightarrow 2) a α -(1 \rightarrow 3)-viazaným manózovým zvyškom v bočných reťazcoch.



Obr. 1 ^1H - ^1H TOSCY NMR spektrum – manán kvasinka *C. albicans*, sérotyp B

Príprava manooligomérov z kvasinkovej formy *C. albicans* sérotyp B: acetolýzou manánu a deleníím produktov na kolóne Biogel P-2 sa získalo sedem frakcií manózy (M1-M7) (obr. 2). Najviac zastúpený oligomér v tomto manáne je tetramér (M4). Frakcia V_0 predstavuje nezhydrolyzovanú časť manánu. Pre prípravu konjugátu bol zvolený tetramér.



Obr. 2 Delenie produktov acetolýzy na kolóne Biogel P-2, kvasinková forma *C. albicans*, sérotyp B

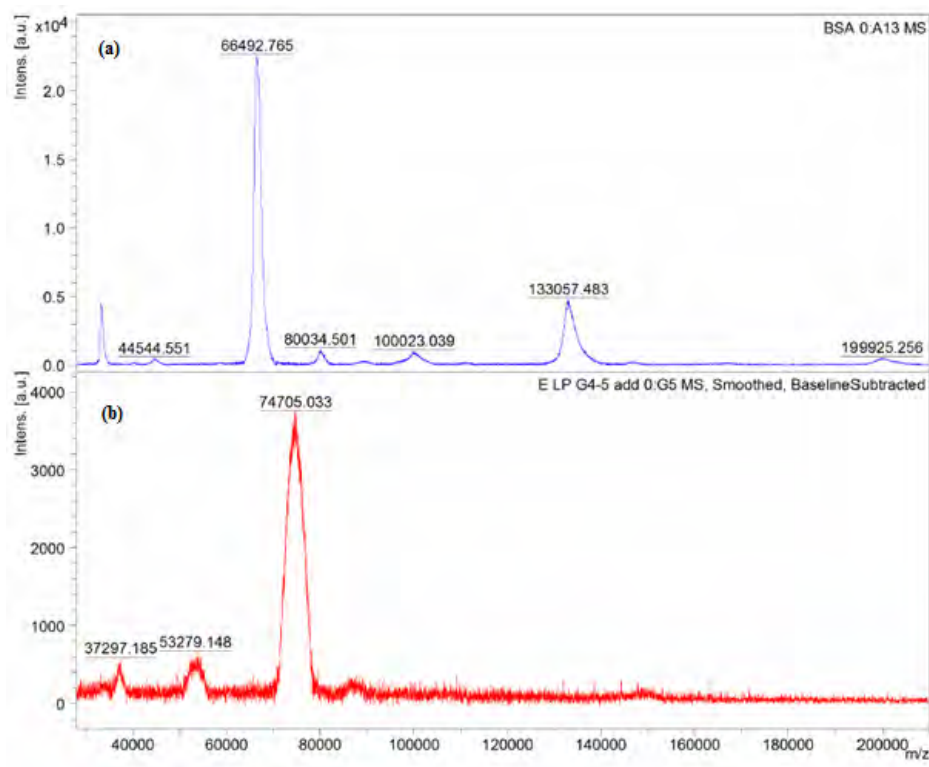
Pre prípravu konjugátu z tetraméru a proteínu (BSA) bola vybraná metóda redukívnej aminácie. Táto chemická metóda je formou aminácie, pri ktorej sa karbonylové skupiny sacharidu konvertujú na amíny cez imínový medziprodukt (obr. 3).



Obr. 3 Schématické znázornenie konverzie karbonylovej skupiny sacharidu na amíny na imínový medziprodukt

V našom prípade je nositeľom karbonylovej skupiny $\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}'$ manooligomér a nositeľom aminoskupiny $-\text{R}-\text{NH}_2$ proteín (BSA).

Po optimalizácii reakčných podmienok sa pristúpilo ku konjugácii tetraméru na BSA. Rozsah konjugácie bol hodnotený prostredníctvom MALDI-TOF MS (obr. 4 a, b). Graf a) zobrazuje samotné BSA s molekulovou hmotnosťou $66492,765 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, ktoré bolo zmiešané s maticou v pomere 1:1. V grafe b) je zobrazený konjugát tetramér - BSA s molekulovou hmotnosťou $74705,033 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, ktorý bol zmiešaný s maticou v pomere 1:1. Na základe výpočtov, vychádzajúcich z molekulových hmotností BSA a tetraméru sa zistilo, že na 1 molekulu BSA sa podarilo naviazať 12 jednotiek tetraméru.



Obr. 4 MALDI-TOF MS spektrá BSA a konjugátu tetramér

Záver

Cieľom práce bola izolácia a charakterizácia manánu *C. albicans* CCY 29-3-103 (sérotyp B), a následná príprava a charakterizácia sacharid-proteínového konjugátu z vybraného manooligoméru *C. albicans* a proteínu (BSA).

1. Manány získané z kvasinkovej formy *C. albicans* CCY 29-3-103 (sérotyp B) boli podrobené štruktúrnej analýze. Kombináciou plynovej chromatografie a NMR spektrometrie sa zistilo, že izolovaný manán obsahuje v acido-stabilnej časti iba α -viazané manopyranozylové jednotky, v acido-labilnej oblasti obsahuje molekuly manooligomérov viazaných výlučne β -glykozidovými väzbami. Vetvenie hlavného reťazca je pomerne vysoké.

2. Kľúčovým faktorom pri príprave konjugátu z oligoméru a proteínu bolo získať konjugát s čo najväčším počtom antigénových molekúl na molekule proteínu. Potrebné bolo zachovanie štruktúry antigénu, ktorá by mala byť čo najmenej pozmenená chemickými reakciami, potrebnými na naviazanie oligoméru na proteín. Pre prípravu konjugátu z vybraného manooligoméru (tetramér) a proteínu (BSA) bola zvolená metódu redukčnej aminácie. Rozsah konjugácie bol vyhodnotený prostredníctvom MALDI-TOF MS, ktorá preukázala dostatočnú hustotu naviazaného antigénového determinantu.

3. Ciele práce boli splnené. Pripravený konjugát sa použije na imunizáciu myši s cieľom zistiť odpoveď ich imunitného systému na manooligomér, a porovnať túto odpoveď s už známymi výsledkami pre konjugát, obsahujúci polymérny manán.

Pod'akovanie

Projekt bol realizovaný s finančnou podporou grantov VEGA 2/0040/10 a 2/0026/13.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Wisplinghoff H., Bischoff, T., Tallent S. M., et al. (2004) Clin. Infect. Dis. 39, p. 309
- [2] Mochon A. B., Cutler J. E. (2005) In Med. Mycol. 43(2), p. 97
- [3] Avci F. Z., Kasper D. L. (2010) Annu. Rev. Immunol. 28, p. 107
- [4] Cutler J. E., Deepe G. S., Bruce S. K. (2007) Nat Rev Microbiol, 5(1), p. 13
- [5] Lloyd K. O. (1970) Biochemistry, 9(17), p. 3446
- [6] Kocourek J., Ballou C. E. (1969) J Bacteriol, 100, p. 1175
- [7] Gildersleeve J. C., Oyindasola, O., Simpson J. T., et al., (2008) Bioconjug. Chem, 19(7), p. 1485

Sledovanie antioxidačného účinku extraktu z *Armoracia rusticana* pomocou metód DPPH assay a Reducing power assay

Michala Gáfriková, Petronela Imreová, Eva Miadoková

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky,
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; michala.gafrikova@gmail.com

Abstrakt

Armoracia rusticana (horseradish) is a perennial herb which is commonly used in many cuisine. It contains many active compounds, conductive to the humans – they are the source of vitamins, macronutrients, micronutrients, antioxidants and others, which support immune system and act as a prevention against diseases. Therefore we have been studying the antioxidant activity of the aqueous extract from this plant. We use the DPPH assay to study the scavenging activity of *A. rusticana* and the Reducing power assay to determine the ability to reduce Fe^{3+} ferikyanid complexes to Fe^{2+} ferokyanid complexes. We found out that the aqueous extract from *A. rusticana* have an antioxidant activity, which is realized through various mechanisms: it can scavenge free radicals and reduce Fe^{3+} ferikyanid complexes to Fe^{2+} ferokyanid complexes.

KLúčové slová: *Armoracia rusticana*; DPPH assay; Reducing power assay; ROS.

Úvod a formulácia cieľa

Enviromentálne faktory, ako napríklad ionizačné žiarenie, invázie patogénov a úbytok až nedostatok kyslíka, indukujú vznik oxidačného stresu. Stres spôsobený nedostatkom kyslíka v bunkách môže mať tri formy: hypoxiu, anoxiu a reoxygénáciu. Tvorba reaktívnych foriem kyslíka (ROS) je charakteristická pre hypoxiu a reoxygénáciu. Medzi ROS patrí peroxid vodíka a superoxidový anión (O_2^-), ktoré vznikajú pri rôznych reakciách v bunke. Majú schopnosť poškodzovať bunku a aj jej komponenty - najčastejšie sú poškodzované lipidy, proteíny, karbohydráty a nukleové kyseliny [1]. Medzi antioxidačné obranné mechanizmy organizmu patrí indukcia antioxidačných enzýmov (superoxid dizmutáza, kataláza, glutation peroxidáza) ako aj vychytávanie voľných radikálov, chelatovanie prechodných kovov, ktoré je sprostredkované neenzymatickými zlúčeninami (kyselina askorbová, α -tokoferol, polyfenolové zlúčeniny) [2].

Armoracia rusticana (chren dedinský) zaraďujeme do čeľade *Brassicaceae*, ktorá zahŕňa približne 3700 rôznych druhov rastlín [3]. *A. rusticana* je trváca bylina vysoká 100 – 150 cm. Má dlhý, valcovitý a hrubý koreň. Listy usporiadané do prízemnej ružice sú veľké, stopkaté, hrubo pílkovité. Stonka je vo vrchnej časti rozkonárená a ukončená zloženou metlinou. Kvety má biele a dozrievajú v oválne šešulky [4].

Bolo dokázané, že v rastline *A. rusticana* sa nachádza množstvo biologicky aktívnych látok, ktoré majú vplyv na jej antioxidačnú aktivitu. Jednou z takýchto zložiek je kyselina

askorbová (vitamín C). Je to šesťuhlíkatý laktón, ktorý sa syntetizuje z glukózy v pečeni väčšiny cicavcov s výnimkou človeka, opíc a morských prasiat [5]. Kyselina askorbová je syntetizovaná aj v rastlinách, ale biosyntetická cesta je odlišná [6]. Ak ľudia neprijímajú dostatok vitamínu C v potrave, deficiencia sa prejavuje mnohými klinickými prejavmi. Ochorenie, ktoré vzniká pri nedostatku vitamínu C v potrave sa nazýva skorbut [7]. Ak však človek vo svojej strave prijíma dostatočné množstvo vitamínu C je to prospešné pre jeho zdravie. Vitamín C zvyšuje odolnosť organizmu voči infekciám, zlepšuje hojenie rán a popálenín a znižuje výskyt šoku po zraneniach alebo operáciách [8].

Ďalšou dôležitou zložkou extraktu z *A. rusticana* sú flavonoidy [9]. Flavonoidy sú prírodné látky, ktoré sú objektom vedeckého výskumu a terapeutického záujmu [10]. Vzhľadom na ich nízku toxicitu sú veľmi bezpečné. Mnohé z nich majú antioxidantné a antimutagénne účinky, a preto sa môžu využívať ako chemopreventívne agensy. Bolo identifikovaných približne 8 000 rôznych látok s flavonoidovou štruktúrou [11]. Quercetín je typický flavonoid, ktorý je prítomný v ovocí a zelenine. Má priaznivé účinky na zdravie človeka [12]. Vďaka výraznému antioxidantnému účinku viacerí autori využívajú quercetín ako pozitívnu kontrolu pri determinácii antioxidantného účinku rôznych potenciálne bioaktívnych látok [13,14]. Kaempferol je častou zložkou potravín, ktoré pochádzajú z rastlín a využíva sa v tradičnej medicíne [15]. Predovplyvnenie ľudských lymfocytov kaempferolom má pozitívny účinok pri redukcii poškodenia spôsobeného peroxidom vodíka. So zvyšovaním koncentrácie kaempferolu sa zvyšuje aj jeho ochranný účinok. Podobne, ako v prípade quercetínu (oba flavonoidy sú nekonjugované), má vyššiu ochrannú funkciu ako flavonoidy konjugované s cukornatou zložkou [16].

Materiál a metódy

Rastlinný extrakt z *Armoracia rusticana* sme získali od doc. Gregáňa, ktorý pôsobí na Katedre chémie na Fakulte prírodných vied na Univerzite Mateja Bela. Rastlinný materiál (koreň) o váhe približne 70 g bol usušený pri laboratórnej teplote. Materiál bol extrahovaný 5-krát ručne do 150 ml vody (vodný extrakt) pri 65 °C a následne uskladnený v tme pri 4 °C.

Pripravili sme si 25 mg.ml⁻¹ zásobný roztok zmiešaním 0,025 g extraktu s 1000 µl PBS. Následne sme si zo zásobného roztoku pripravili ďalšie koncentrácie 2,5 mg.ml⁻¹; 0,05 mg.ml⁻¹; 0,25 mg.ml⁻¹ a 0,025 mg.ml⁻¹.

Metódu DPPH assay sme použili na stanovenie potenciálneho antioxidantného účinku extraktu. Pomocou tejto metódy môžeme sledovať jeho vychytávaciu tzv. *scavengerovú*

aktivitu. Metóda je založená na sledovaní schopnosti extraktu odovzdať atóm vodíka molekule DPPH (1,1-difenyl-2-picrylhydrazyl). Ak má sledovaná látka schopnosť odovzdať atóm vodíka, molekula DPPH prejde do redukovanej formy. Tento prechod môžeme sledovať aj vizuálne, a to odfarbením roztoku na bledo fialovú až svetlo žltú. K 950 μl DPPH roztoku pridáme 50 μl rôznych koncentrácií extraktu, necháme inkubovať 30 minút pri izbovej teplote v tme a následne meriame absorbanciu pri vlnovej dĺžke 517 nm pomocou spektrofotometra Genesys 10Bio, Electron Corporation. Ako pozitívnu kontrolu použijeme kyselinu askorbovú. Namerané hodnoty použijeme na výpočet % vychytávania DPPH radikálov podľa vzorca:

$$\% = (A_B - A_A) / A_B \times 100 \quad [I.]$$

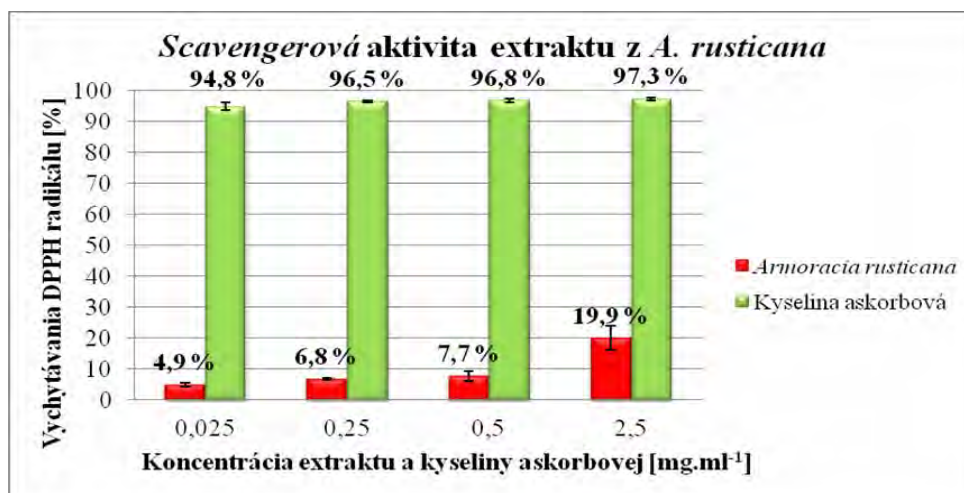
A_B- absorbancia DPPH radikálu; **A_A**- absorbancia zmesi extraktu s príslušnou koncentráciou a DPPH radikálu [17].

Metóda Reducing power assay slúži na sledovanie antioxidačnej schopnosti bioaktívnych látok. Zisťuje sa schopnosť látok redukovať železité ióny Fe^{3+} (v FeCl_3) na železnaté ióny Fe^{2+} . Bioaktívne látky s antioxidačnými vlastnosťami sú schopné redukcie Fe^{3+} ferokyanidových komplexov na Fe^{2+} ferikyanidové komplexy. Redukciu môžeme taktiež sledovať vizuálne na základe zmeny farby vzorky zo žltej na odtiene modrej farby. Jednotlivé koncentrácie a blank zmiešame s 0,5 ml fosfátového tlmivého roztoku a 0,5 ml ferikyanidu draselného a inkubujeme 20 minút pri 50°C. Potom pridáme 0,5 ml TCA a centrifugujeme 10 minút pri 3000 rpm. Odoberieme 0,5 ml vrchnej vrstvy do čistých eppendorfiiek a pridáme 0,5 ml destilovanej vody a 100 μl FeCl_3 . Meriame absorbanciu pri vlnovej dĺžke 700 nm pomocou spektrofotometra Genesys 10Bio, Electron Corporation [18].

Výsledky a diskusia

Na sledovanie vychytávacej tzv. *scavengerovej* aktivity extraktu z *A. rusticana* sme zvolili metódu DPPH assay. Pomocou tejto metódy sme chceli zistiť, či extrakt dokáže vychytávať voľné radikály. Ako pozitívnu kontrolu sme zvolili kyselinu askorbovú, ktorá je známa ako výborný antioxidant. Na grafe (Obr. 1) sú znázornené výsledky *scavengerovej* aktivity extraktu z *A. rusticana* v porovnaní s kyselinou askorbovou. Najnižšia sledovaná koncentrácia extraktu (0,025 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) vykazovala aj najnižšiu *scavengerovú* aktivitu – 4,9%. So zvyšujúcou sa koncentráciou stúpala aj *scavengerová* aktivita extraktu. Najvyššia sledovaná koncentrácia extraktu (2,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) mala aj navyššiu *scavengerovú* aktivitu – 20%.

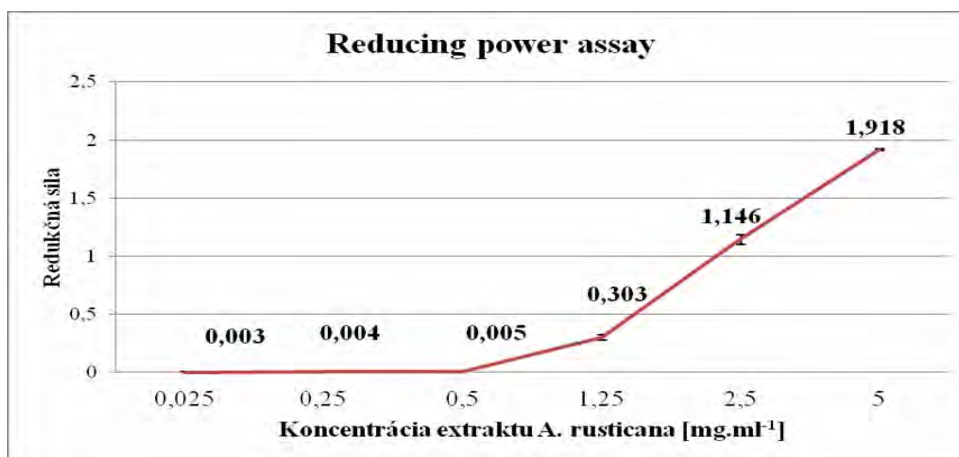
Ako je na obrázku vidno, všetky sledované koncentrácie kyseliny askorbovej vykazujú približne rovnako vysokú antioxidačnú aktivitu – od 95 do 97%. V porovnaní s kyselinou askorbovou má extrakt z *A. rusticana* oveľa nižšiu scavengerovú aktivitu. Najvyššia koncentrácia extraktu má skoro päťkrát nižšiu scavengerovú aktivitu ako kyselina askorbová.



Obr. 1 Antioxidačná aktivita extraktu z *Armoracia rusticana* v porovnaní s kyselinou askorbovou.

Extrakt má nižšiu antioxidačnú aktivitu v porovnaní s kyselinou askorbovou. Tento rozdiel je pravdepodobne spôsobený tým, že extrakt z *A. rusticana* obsahuje okrem kyseliny askorbovej aj množstvo iných zložiek, ako napríklad flavonoidy alebo peroxidázu. Jednotlivé zložky môžu na seba pôsobiť synergicky (vo svojom účinku sa podporujú) alebo antagonisticky (znižuje sa účinok) [19]. Predpokladáme, že rozdiel v antioxidačnej aktivite extraktu a samotnej kyseliny askorbovej môže byť podmienený prítomnosťou aktívneho enzýmu peroxidáza v extrakte, ktorý by mohol redukovať kyselinu askorbovú v extrakte, ako aj antagonizmom niektorých zložiek extraktu.

Schopnosť extraktu redukovať Fe^{3+} ferikyanidové komplexy (v FeCl_3) na Fe^{2+} fero cyanidové komplexy sme sledovali pomocou metódy Reducing power assay. Na základe predbežných výsledkov sme rozšírili škálu testovaných koncentrácií o dve koncentrácie – $1,25 \text{ mg.ml}^{-1}$ a 5 mg.ml^{-1} za účelom zistenia, či sa redukčný účinok zvyšuje so zvyšovaním koncentrácie extraktu z *A. rusticana*. Na grafe (Obr. 2) sú znázornené výsledky redukčnej sily extraktu z *A. rusticana*. Tri najnižšie koncentrácie ($0,025 \text{ mg.ml}^{-1}$; $0,25 \text{ mg.ml}^{-1}$; $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) mali najnižšiu redukčnú silu (od 0,003 do 0,005). Koncentrácia $1,25 \text{ mg.ml}^{-1}$ mala redukčnú silu 0,303. Koncentrácia $2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ vykazovala redukčnú silu 1,146. Najvyššiu redukčnú silu (1,918) sme sledovali pri najvyššej koncentrácii 5 mg.ml^{-1} .



Obr. 2 Redukčná sila extraktu z *Armoracia rusticana*

Záver

V našej práci sme sa zamerali na sledovanie antioxidačného účinku extraktu z *Armoracia rusticana* pomocou dvoch metód. Pomocou metódy DPPH assay sme sledovali *scavengerovú* aktivitu extraktu v porovnaní s pozitívnou kontrolou – kyselinou askorbovou. Zistili sme, že extrakt z *A. rusticana* má antioxidačnú aktivitu, ktorá sa zvyšuje so zvyšovaním koncentrácie. Antioxidačná aktivita extraktu je však nižšia ako antioxidačná aktivita kyseliny askorbovej, ktorá je tiež jednou zo zložiek extraktu z *A. rusticana*. Tento rozdiel pripisujeme prítomnosti množstva biologicky aktívnych zložiek v extrakte, pričom jednotlivé zložky môžu navzájom na seba pôsobiť synergicky alebo antagonisticky. Výsledná antioxidačná aktivita závisí od interakcií medzi jednotlivými zložkami, ale aj od koncentrácie jednotlivých zložiek v extrakte. Pomocou metódy Reducing power assay sme potvrdili, že extrakt z *A. rusticana* má schopnosť redukovať Fe^{3+} ferikyanidové komplexy na Fe^{2+} ferokyanidové komplexy. So zvyšovaním koncentrácie sme sledovali aj zvyšovanie redukčnej schopnosti extraktu z *A. rusticana*. Extrakt z *A. rusticana* má antioxidačnú aktivitu, ktorú realizuje pomocou vychytávania voľných radikálov aj redukciovou ferikyanidových komplexov.

Pod'akovanie

Táto práca bola realizovaná s podporou grantov VEGA 1/0025/11, Sk-BG-0006-10 a BG/SK/206.

Zoznam použitej literatúry

[1] Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V. (2003) Ann. Bot. London. 91, p. 179

- [2] Nijveldt R. J., van Nood E., van Hoorn D. E. C., et al. (2001) *Am. J. Clin. Nutr.* 74, p. 418
- [3] Al-Shehbaz I. A., Beilstein M. A., Kellogg E. A. (2006) *Plant Syst. Evol.* 259, p. 89
- [4] Kresánek J. ml., Kresánek J. st. (2008) *Atlas liečivých rastlín a lesných plodov*. Osveta, Martin, Slovenská republika, p. 116
- [5] Nishikimi M., Fukuyama R., Minoshima S., et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 269(18), p. 13685
- [6] Smirnoff N. (2001) *Vitam. Horm.* 61, p. 241
- [7] Padayatty S. J., Katz A., Wang Y., et al. (2003) *J. Am. Coll. Nutr.* 22(1), p. 18
- [8] Pauling L. (1970) *PNAS.* 67(4), p. 1643
- [9] Sigma-Aldrich [citované 27. február 2013] < <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/nutrition-research/learning-center/plant-profiler/armoracia-rusticana.html> >
- [10] Havsteen B. H. (2002) *Pharmacol. Therapeut.* 96, p. 67
- [11] Moon Y.J., Wang X., Morris M. E. (2006) *Toxicol. in Vitro.* 20, p. 187
- [12] Murota K., Terao J. (2003) *Arch. Biochem. Biophys.* 417, p. 12
- [13] Hamedeyazdan S., Fathiazad F., Sharifi S., Nazemiyeh, H. (2012) *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 13, p. 5843
- [14] Shin Y. S., Jo H. J., Lee S. W., et al. (2012) *J. Med. Plants Res.* 6(31), p. 4615
- [15] Calderón-Montaño J. M., Burgos-Morón E., Pérez-Guerrero C., López-Lazaro M. (2011) *Mini Rev. Med. Chem.* 11, p. 298
- [16] Noroozi M., Angerson W. J., Lean M. E. J. (1998) *Am. J. Clin. Nutr.* 67, p. 1210
- [17] Molyneux P. (2004) *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26(2), p. 211
- [18] Benzie I. F. F., Strain J. J. (1996) *Anal Biochem.* 239(1), p. 70
- [19] Silva C. R., Monteiro M. R., Rocha H. M., (2008) *Toxicol. in Vitro.* 22(1), p. 212

Stanovenie výskytu génových fúzií v bunkách pupočníkovej krvi

Beáta Gajdošechová^{1,2}, Pavol Košík², Milan Škorvaga², Igor Beliaev²

¹ *Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská Dolina, 845 12 Bratislava,*

² *Ústav experimentálnej onkológie SAV, Vlárská 7, 833 91 Bratislava 37, Slovensko; beagajdosechova@gmail.com*

Abstrakt

Leukemia is a clonal heterogeneous disorder arising transformation of a single cell. Acute leukemia in children is the most common form of cancer in developed countries. Donor cell leukemia (DCL) is a well recognised complication that occurs up to the incidence 4% after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. The DCL mortality is very high. One possible mechanism for development of DCL is that preleukemic clones were already present in the donor before transplant. The screening of umbilical cord blood (UCB) may be of high importance for preventing DCL. Screening is based on analysis of fusion genes in UCB. The aim of the work is to determine the incidence of gene fusions in samples of umbilical cord blood in Slovak populations and determination of susceptibility to leukemia in pediatric patients. Clarification of the frequency of gene fusions will have an impact on the use of UCB for transplantation of stem cells, which preleukemic stem cells may be transplanted from donor to recipient.

Kľúčové slová: leukemia; donor cell leukemia; gene fusions; umbilical cord blood

Úvod a formulácia cieľa

Leukémia je zhubné nádorové ochorenie ľudského organizmu, ktoré vzniká malígnou transformáciou jednej bunky, pravdepodobne pluripotentnej hematopoetickej kmeňovej bunky (HSC) alebo zrelšej progenitorovej bunky [1], [2], [3], [4]. Predpokladá sa, že transformácia začína patologickým procesom, teda zmeny jednej krvotvornej bunky resp. leukemického klonu. Detská leukémia je najčastejšou formou rakoviny u detí v rozvinutých krajinách, kde je zodpovedná za 1/3 malígntí v tejto vekovej skupine [5].

Viac ako 200 genetických zmien, vrátane bodových mutácií, delécií a inverzií súvisí s leukémiou, pričom mnohé z nich vedú k chromozómovým zmenám ako sú napr. hyperdiploidita a translokácie. Najčastejšie sa vyskytujú recipročné translokácie s vymenenými ramenami chromozómov. Takéto translokácie vedú k chimerickým alebo fúznym génom, ktoré produkujú hybridné proteíny so zmenenými vlastnosťami napr. aktivovaná kinázová aktivita alebo nová transkripčná regulácia [6], [7].

Samotné translokácie nie sú dostatočné pre vznik ochorenia, ale pomocou nich možno predpovedať riziko vzniku leukémie u detí, ktoré sú nositeľmi fúzií. Akútna leukémia, ktorá je najzastupenejšou formou výskytu u detí, vyžaduje prítomnosť dvoch genetických lézií, z ktorých jedna blokuje diferenciáciu progenitora/HSC, obvyčajne translokácia, ktorá

predchádza vzniku leukémie a neskôr druhá lézia, ktorá stimuluje proliferáciu – obyčajne bodová mutácia [8]. Práve druhý zásah je rozhodujúci pre vznik leukémie.

Hlavným cieľom je stanovenie incidencie výskytu génových fúzií v bunkách pupečníkovej krvi (UCB) a verifikácia metód na štúdium génových fúzií, porovnaním ich senzitivity na detekciu fúzných génov. Ďalším cieľom je posúdenie rizika pôsobenia mikrovlnného žiarenia na indukciu génových fúzií vo vzorkách pupečníkovej krvi.

Materiál a metódy

Zvolili sme si CD34⁺ bunky, pretože tento typ buniek obsahuje populáciu kmeňových a progenitorových buniek, ktoré patria medzi najdôležitejšie v etiológii detskej leukémie. Úplné UCB vzorky boli získané do 24 hodín od odberu. Mononukleárne bunky (MNC) boli separované pomocou gradientovej centrifugácie. Frakcie CD34⁺ a CD34⁻ boli izolované pomocou imunomagnetických metód z mononukleárných buniek (MNC) frakcie kostnej drene (KD) alebo UCB vzoriek. Vzorky boli odoberané v troch frakciách a následne boli zmrazené v tekutom N₂.

Izolácia RNA je metóda na získavanie genetického materiálu v podobe ribonukleovej kyseliny. Izolácia vzoriek UCB bola uskutočnená pomocou metódy s využitím RNazolu (Research Molecular Center) podľa protokolu uvedeného výrobcem. U všetkých vzoriek RNA bola zmeraná koncentrácia a čistota na prístroji Nanodrop. Nasledovala reverzná syntéza RNA→cDNA.

Často sa vyskytujúce fúzne transkripty chromozomálnych translokácií boli analyzované pomocou multiplex reverznej transkripcie a Real Time PCR (RQ PCR) [9]. Ide o metodiku, ktorá dosahuje vysokú citlivosť 10⁻⁴ - 10⁻⁵. Senzitivita dosahuje úroveň 1-3 kópie / 100 000 buniek. Expresia 18S ribozómového génu bola použitá ako interná kontrola. Primery boli navrhnuté podľa špecifických translokácií [9], [10]. Ako próby boli použité TaqMan próby s 5' koncom nefluoreskujúcim farbivom FAM a na 3' konci s reportérovým farbivom BHQ [9], [10].

Výsledky a diskusia

Senzitivitu jednotlivých PCR techník (RQ-PCR, Nested PCR a Multiplex PCR) sme stanovili pomocou reakcií za rovnakých podmienok ako u analyzovaných vzoriek, avšak namiesto templátu v každej reakcii bolo použité definované množstvo komerčného štandardu s naklonovanou translokáciou 1-100 kópií na reakciu. Porovnaním senzitivity jednotlivých

metód sme zistili, že najväčšiu senzitivitu dosahuje RQ-PCR, porovnateľnú s Nested PCR. Senzitivita dosahuje úroveň 1-3 kópie/10⁵ buniek (Tab.1, Tab.2) Naproti Multiplex PCR dosahuje senzitivitu 20-100 kópií/10⁵ buniek. Práve preto bola na detekciu využitá metodika detekcie pomocou RQ-PCR.

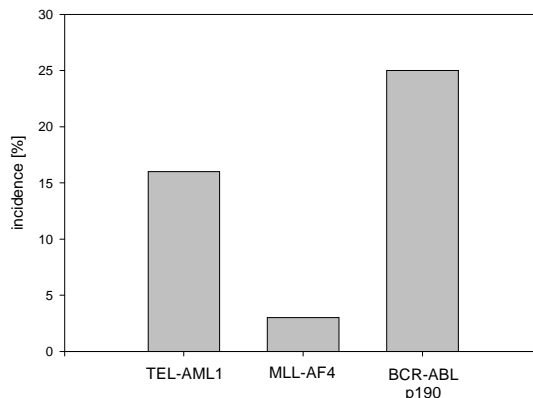
Tab. 1 Senzitivita Multiplex PCR

Copies/5x10 ⁴ cells	TEL-AML1	MLL-AF4	BCR-ABL p190
10	0.6	0.8	0.4
50	1	1	0.8
100	1	1	1

Tab. 2 Senzitivita RQ PCR a Nested PCR

Copies/10 ⁵ cells	TEL-AML1		MLL-AF4		BCR-ABL p190	
	RT-QPCR PCR	Nested PCR	RT-QPCR PCR	Nested PCR	RT-QPCR PCR	Nested PCR
1	0.6	0	0.2	0.2	0.4	0.6
3	0.8	0.6	-	0.4	0.6	0.6
5	0.6	0.8	1	0.8	1	0.8
10	1	1	1	1	1	1

Hlavným cieľom bolo stanovenie incidencie výskytu génových fúzií v bunkách pupečníkovej krvi pomocou vysoko citlivej metódy Real Time PCR a následná verifikácia výsledkov iným laboratóriom. Celková RNA bola vyizolovaná z viac ako 350 probandov. 200 vzoriek UCB bolo použitých na cDNA syntézu. cDNA ako templát sme následne použili na detekciu génových fúzií pomocou RQ-PCR. Testovali sme 3 translokácie: BCR-ABL p190, TEL-AML1 a MLL-AF4. Nami získaná incidencia dosiahla úroveň 25% pozitívnych probandov (50/200) na translokáciu BCR-ABL p190, 16% pozitívnych probandov na translokáciu TEL-AML1 (32/200) a 3% pozitívnych probandov na translokáciu MLL-AF4 (6/200) (Obr.1).



Obr. 1 Frekvencia incidencie génových fúzií - Incidencia výskytu frekvencie génových transkriptov TEL-AML1 (16%), MLL-AF4 (3%), BCR-ABL p190 (25%) v 200 vzorkách pupočníckovej krvi v populácii v slovenskej populácii

Doposiaľ v literatúre neexistujú žiadne údaje o frekvencii výskytu fúzných transkriptov MLL-AF4 a BCR-ABL p190 v bunkách pupočníckovej krvi, takže ich nemôžeme porovnávať s výsledkami iných skupín. Vzhľadom na neočakávanú vysokú incidenciu výskytu fúzných transkriptov TEL-AML1 vo vzorkách UCB (predpokladaná incidencia 1-2%) bolo 20 MNC peletov poslaných na analýzu do certifikovaného laboratória NOÚ (Tab. 3).

Tab. 3 Verifikácia výsledkov na NOÚ - porovnanie výsledkov detekcie génových fúzií CRI - Ústav experimentálnej onkológie a NCI – Národný onkologický ústav

No.	Proband	TEL-AML1		MLL-AF4		BCR-ABL p190	
		CRI	NCI	CRI	NCI	CRI	NCI
1.	29	1/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3
2.	41	1/3	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3
3.	52	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3	1/3
4.	68	0/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3
5.	84	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3
6.	139	1/3	0/3	0/3	1/3	1/3	0/3
7.	140	2/3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3
8.	141	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3	1/3
9.	144	3/3	0/1	0/3	0/1	2/3	0/3
10.	145	0/3	1/3	1/3	0/3	2/3	1/3
11.	146	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3	0/3
12.	150	0/3	0/3	0/3	0/1	1/3	0/1
13.	163	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3
14.	191	-	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3

15.	203	0/3	0/1	0/3	0/3	2/3	0/3
16.	206	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3
17.	214	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
18.	215	1/3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3
19.	216	1/3	0/3	0/3	0/3	2/3	0/3
20.	217	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3	0/3

Údaje z referenčného laboratória potvrdili prítomnosť 5 pozitívnych probandov na translokáciu BCR-ABL p190. Žiadna iná translokácia nebola nájdená. Nami získané údaje rozhodne potvrdzujú prítomnosť génových fúzií v pupečníkovej krvi zdravých novorodencov.

Na presnejšiu kvantifikáciu sú potrebné ešte ďalšie štúdie a porovnávanie získaných výsledkov s inými vedeckými skupinami.

Záver

Pri vývoji stratégií zameraných na liečbu a prevenciu detskej leukémie je kľúčovou otázkou posúdenie náchylnosti na detskú leukémiu. Jedným zo spôsobov je hľadanie chromozómych translokácií špecifických pre leukémiu v hematopoetických kmeňových bunkách (HSC) pupečníkovej krvi (UCB).

Incidencia výskytu detskej leukémie je 1:10000, vzhľadom na nami zistenú vyššiu frekvenciu génových fúzií, 25% BCR-ABL p190, 16% TEL-AML1 a 3% MLL-AF4, je veľmi dôležité percentuálne zastúpenie fúzných transkriptov bunkách HSC alebo v progenitorových bunkách, v ktorých potenciálna génová fúzia môže tvoriť základ predispozície na vznik a rozvinutie sa ochorenia.

Pod'akovanie

Chcela by som poďakovať kolektívu Ústavu experimentálnej onkológie SAV za vedenie a získavanie nových odborných vedomostí.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Bonnet D., Dick J. E. (1997) Nat. Med. 3(7), p. 730
- [2] Greaves M. F., Wiemels J. (2003) Nat. Rev. Cancer 3(9), p. 639
- [3] Mchale C. M., Smith M. T. (2004) Am. J. Hematol. 75(4), p. 254
- [4] Ford A. M., Palmi C. (2009) J. Clin. Invest. 119(4), p. 826
- [5] Rossig C., Juergens H. (2008) Radiat. Prot. Dosimetry 132(2), p. 114

- [6] Look A. T. (1997) *Science* 278(5340), p. 1059
- [7] Rowley J. D. (1998) *Annu. Rev. Genet.* 32, p. 459
- [8] Kelly L. M., Gililand D. G. (2002) *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3, p. 179
- [9] Pakakasama S., Kajanachumpol S., Kanjanapongkul S. et al (2008) *Int. J. Lab. Hematol.* 30(4), p. 286
- [10] van Dongen J. J., Macintyre E. A., Gabert J. A. et al (1999) *Leukemia* 13(12), p. 1901

Vývin morfológických znakov počas vegetačného obdobia pri druhoch z rodu *Mentha*

Andrea Kadášová, Terézia Gáľusová

Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Fakulta prírodných vied, Katedra botaniky a genetiky, Nábřežie mládeže 91 949 74 Nitra, Slovensko, adin131@gmail.com

Abstrakt

Mentha is the large genus of aromatic plants. Their hallmark is the content of essential oils with healing properties. The oil is produced in the leaf, in special epidermal structures, the glandular trichomes. The aim of this research was to find out, how the morphological characters are developed during the growing season of the two selected species of the genus *Mentha* (mint) – Peppermint (*Mentha × piperita* L.) and Spearmint (*Mentha spicata* L.). We focused on the morphological structure of leaves and on structures associated with secretion of the content substances, the glandular trichomes. An integral part of the research was to monitor the weather conditions and its connection with dynamics of changes on plants throughout the growing season of the year 2011 and also the solving the methodical matters.

KLúčové slová: Peppermint; Spearmint; glandular trichomes; morphology of leaves.

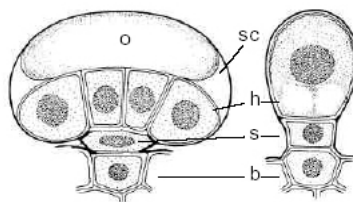
Úvod a formulácia cieľa

Rod mäta (*Mentha* L.) tvoria väčšinou trvalky so štvorhrannými stonkami, na ktorých vyrastajú protistočne listy a kvety vytvárajú práslenovité či hlávkovité súkvetia. Mäta pieporná a mäta klasnatá patria do čeľade hluchavkovitých (*Lamiaceae*), ktorá zahŕňa hlavne liečivé a aromatické rastliny. Každý druh má charakteristickú arómu; spôsobujú ju esenciálne oleje, obsiahnuté v žľaznatých trichómoch. Silice sú prchavé, tekuté látky, zložené z viacerých zlúčenín, charakteristických pre každý druh. Hlavnou zložkou silice mäty piepornej je mentol. Esenciálny olej mäty klasnatej ho neobsahuje a je nahradený karvónom. Obsahové látky týchto druhov majú uplatnenie v medicíne, kozmetike, liehovarníctve a potravinárskom priemysle, ale aj v ľudovom liečiteľstve [1, 2].

Žľaznaté trichómy majú jedno alebo viacbunkovú nohu/stopku, na ktorú nasadá jedno či viacbunková žľaznatá hlavička, pokrytá kutikulou. Pod kutikulou sa zhromažďujú výlučky sekréčných buniek a po jej narušení sa uvoľňujú do prostredia. Pri mladých orgánoch sa môže kutikula opäť regenerovať [3].

Na listoch mäty sa vyskytujú tri typy trichómov. Krycie trichómy, ďalej hlavičkaté krátkostopkaté žľaznaté trichómy (angl. „capitate“) s jednobunkovou stopkou a jednobunkovou sekréčnou hlavičkou, pokrytú kutikulou a nakoniec štítovité žľaznaté trichómy (angl. „peltate“), zložené z bazálnej bunky, stopky a spravidla z osembunkového

apikálneho disku sekrečných buniek, ktoré od kutikuly oddeľuje subkutikulárna zásobná dutina (Obr. 1) [4, 5].



Obr. 1 Žľaznaté trichómy čeľade *Lamiaceae*. Vľavo typ „peltate“ – štítovitý trichóm a vpravo typ „capitate“ – hlavičkatý trichóm. Stavba: **b** (basal cells) = bazálna bunka, **s** (stem) = noha/stopka, **h** (head cells) = sekrečné bunky – miesto, kde sa syntetizuje silica, **sc** (subcuticular storage cavity) = subkutikulárna zásobná dutina, **o** (oil drop) = kvapky silice [6]

Náš výskum sa sústredil na meranie veľkosti listov a množstvo trichómov s ohľadom na vyhodnotenie dynamiky prítomnosti žľaznatých trichómov na listoch počas vegetačného obdobia vo vzťahu ku klíme, lokalite a druhu.

Materiál a metódy

Vybrané druhy rastlín (*M. × piperita*, *M. spicata*) sme pozorovali v Záhrade liečivých a jedovatých rastlín. Záhrada sa nachádza v areáli Katedry botaniky a genetiky Univerzity Konštantína filozofa v Nitre. Náhodný odber 25 listov z oboch druhov sme realizovali približne v mesačných intervaloch počas celého vegetačného obdobia rastlín v roku 2011. Štatistické spracovanie výsledkov (Tukeyho test, t-test) sme urobili pomocou počítačového programu SigmaStat. Version 2.03 ©1992 – 1997 SPSS Inc.

Meranie plochy listu:

- polárnym planimetrom – najprv sme obkreslili list 3-krát na čistý papier. Potom sme priložili hrot obežného ramena planimetra na východiskový bod obvodu listu a pohybovali sme hrotom po celom jeho obvode v smere hodinových ručičiek. Toto sme opakovali ešte 2-krát. Zo zapísaných hodnôt sme aritmetickým priemerom vypočítali plochu listu v cm^2 .
- prepočítavacím koeficientom – táto metóda sa opiera o už zistenú nameranú plochu, pomocou presných metód, napr. planimetria. Na vybraných listoch priemernej veľkosti z každého druhu sme odmerali ich dĺžku, šírku a polárnym planimetrom (exaktne) plochu. Veľkosť plochy listu sme použili na zistenie prepočítavacieho koeficientu k . Listovú plochu sme potom stanovili násobením lineárnych rozmerov a koeficientu k ; $d \times š \times k$ [7].
- bodovou metódou – na začiatku sme si pripravili systém bodov s rozmermi $0,5 \times 0,5 \text{ cm}$ na priesvitnú fóliu (1 bod = $0,25 \text{ cm}^2$). Potom sme pod fóliu umiestnili list a spočítali sme body, ktoré prekryvali listovú čepeľ. Zásahy na okraji čepele sme počítali iba každý druhý.

Meranie sme zopakovali aspoň trikrát, pričom sme list vždy pootočili o 30°. Z nameraných hodnôt sme vypočítali aritmetický priemer. Výslednú plochu v cm² sme vypočítali tak, že sme aritmetický priemer vynásobili číslom 0,25 [8].

Počítanie žľaznatých trichómov:

Použili sme na to metódu odtlačkov listov na nitrocelulóзовú fóliu (ďalej „celofán“). Pripravili sme si roztok Tollensovo činidlo – 10 % hydroxidu sodného (NaOH), 2 až 3 kvapky 10 % dusičnanu strieborného (AgNO₃) a niekoľko kvapiek čpavku na rozpustenie zrazeniny až do vzniku číreho roztoku. Do misky sme naliali primerané množstvo roztoku a na celofán sme umiestnili listy otočené vrchnou stranou nadol a pritlačili ich asi na 10 sekúnd podložným (mikroskopickým) sklíčkom. Po osušení a vyschnutí sme na celofánových odtlačkoch nenašli žiadne škvryny ktoré sme mali pozorovať po vyzrážaní striebra. A tak sme trichómy pozorovali priamo na liste, ktorý bol ponorený v roztoku asi 10 sekúnd. Trichómy sme počítali pomocou priehľadnej fólie s nakreslenou mriežkou (jeden štvorec s rozmermi 0,5 x 0,5 cm, 0,25 cm²). Výsledné hodnoty sme prepočítali na 1 cm² povrchu listu [9].

Výsledky a diskusia

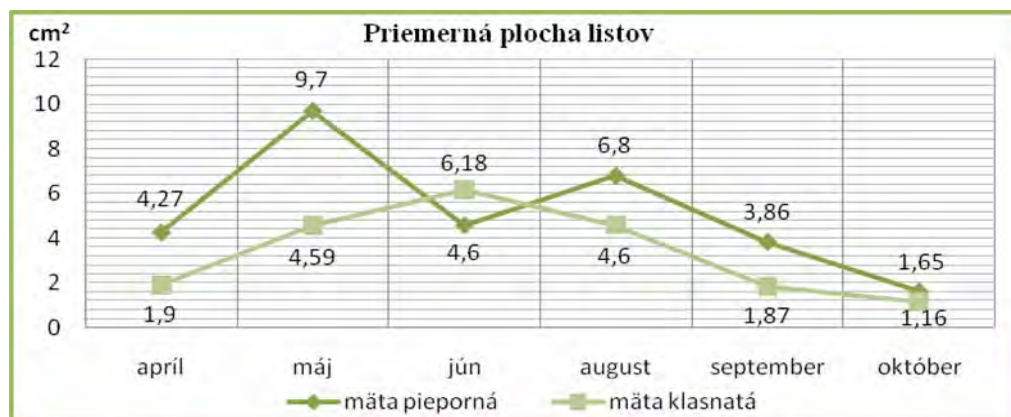
Výskum sme začali zisťovaním veľkosti dĺžky a šírky listov, približne v mesačných intervaloch od apríla do októbra. Listy mäty piepornej sú podľa našich výsledkov dlhé 27 – 54 mm a široké 15 – 26 mm. Podobné hodnoty sme namerali pri mäte klasnatej, kde boli listy dlhé 18 – 55 mm a široké 12 – 24 mm (Tab. 1). V priemere za mesiac narástli pri m. piepornej o 26,28 mm, kým pri m. klasnatej len o 18,32 mm. Môžeme skonštatovať, že rast do dĺžky u mäty piepornej je rýchlejší ako pri mäte klasnatej a trvá raz tak dlho.

Tab. 1 Porovnanie priemernej dĺžky a šírky listov mäty piepornej a mäty klasnatej počas vegetačného obdobia

Priemerné dĺžky a šírky listov mäty piepornej a mäty klasnatej v mm												
	19.4.2011		16.5.2011		14.6.2011		8.8.2011		8.9.2011		11.10.2011	
	dĺžka	šírka	dĺžka	šírka	dĺžka	šírka	dĺžka	šírka	dĺžka	šírka	dĺžka	šírka
mäta pieporná	27,76	22,04	54,04	26,08	46,88	22,2	45,64	21,56	36,52	18,72	29,12	15,56
mäta klasnatá	18,44	16,4	40,48	19,04	55,08	23,68	38,36	19,04	24,8	13,52	23,16	12,76

Pri porovnaní šírky listov oboch druhov (Tab. 1) sme zistili, že m. pieporná narástla do šírky za 1 mesiac (od apríla do mája) v priemere o 4,04 mm. Šírka listov m. klasnatej rástla až 2 mesiace (apríl – máj). Nárast bol o 7,28 mm, v priemere za mesiac je to 3,64 mm, čo je menej ako rástli do šírky listy m. piepornej. Namerané hodnoty plochy listov pri mäte piepornej sa približne zhodovali s rastom a poklesom hodnôt priemernej dĺžky a šírky listov

(Obr. 2). Nekoreluje pri nich iba augustová hodnota, pretože od maxima v máji (9,7 cm²) mala veľkosť listov už klesať.



Obr. 2 Graf porovnania priemernej plochy listov m. piepornej a m. klasnatej počas vegetačného obdobia

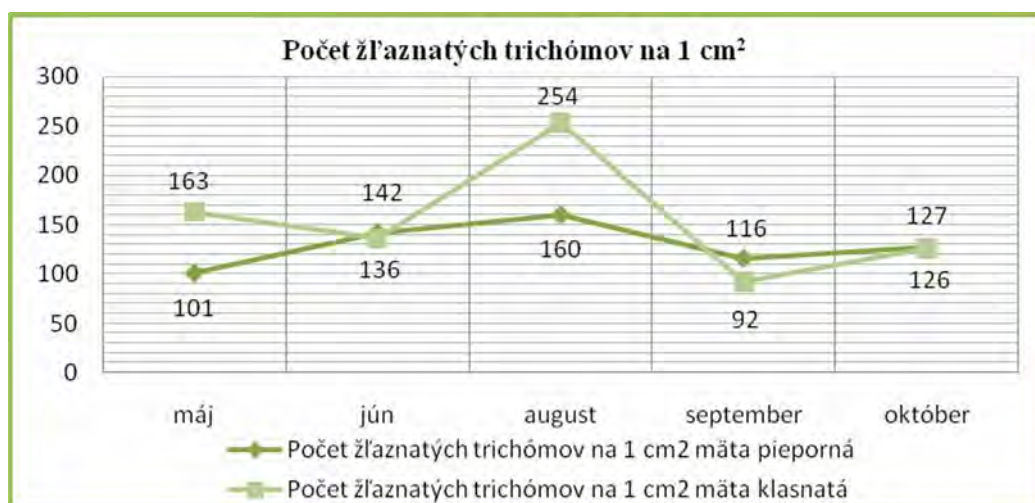
V auguste sme však zistili veľmi vysokú hodnotu plochy, až 6,8 cm². Priemerná dĺžka v tomto mesiaci bola 45,64 mm a šírka 21,56 mm. Odobratý list m. piepornej, určený na výpočet prepočítavacieho koeficientu k , mal v auguste rozmery: d 55 mm a $š$ 26 mm, čiže bol o necelých 10 mm dlhší a o vyše 4 mm širší ako bol priemer. Ďalšie hodnoty mali už len klesajúcu tendenciu, ako sme aj očakávali. Rast listov v priebehu roka u m. klasnatej sa taktiež zhodoval s údajmi o dĺžke a šírke listov. Najprv stúpajúca tendencia až do júna s najväčšou hodnotou plochy 6,18 cm². Potom nastal pokles až do októbra na hodnotu 1,16 cm². Zistili sme, že m. pieporná mala počas celého sledovaného obdobia väčšie listy ako m. klasnatá. Rozdiely vo veľkosti listovej plochy skúmaných druhov boli štatisticky významné v prospech m. piepornej ($P < 0,001$). Opak nastal len v júni, preukazný rozdiel v prospech mäty klasnatej hovorí o rozdielnej akcelerácii rastu.

Na počítanie žľaznatých trichómov sme použili Tollensovo činidlo, ktoré tieto štruktúry na liste zvýraznilo, a tým zjednodušilo počítanie. Mäta pieporná aj mäta klasnatá mali najväčší počet žľaznatých trichómov v auguste (m. p. 160/cm² a m. k. 254/cm²; Obr. 3).

Na tvorbu silice vplývajú významne vonkajšie podmienky. Pri dostatočných zrážkach pôsobia vyššie teploty v júli a auguste (20 – 24 °C) priaznivo na tvorbu silice. Veľmi vysoké teploty, ale spôsobujú vyparovanie silice. Významný vplyv na tvorbu silice má prúdenie vzduchu. Slabší vietor napomáha k vyššiemu podielu silice v trichómoch. Vplyv vetra je dokonca významnejší ako vplyv tepla [10].

V auguste 2011 dosahovali priemerné teplotné hodnoty 20,5 °C, čo bol v podstate teplý mesiac a vietor dosahoval priemernú rýchlosť 12,3 km/h. V júni a júli bol vietor silnejší

ako v auguste. Môžeme teda povedať, že v auguste bolo najviac žľaznatých trichómov zaznamenaných na listoch oboch druhov vďaka priaznivým klimatickým podmienkam.



Obr. 3 Graf porovnania počtu žľaznatých trichómov na listoch m. piepornej a m. klasnatej

Krivka v grafe (Obr. 3) pri mäte klasnatej neukazuje na očakávaný priebeh. Počet trichómov najskôr klesol od mája do júna o 27 trichómov/cm². Potom sa počet trichómov v auguste takmer zdvojnásobil na 254/cm². V septembri zase klesol na minimum a v októbri narástol o 35 trichómov/cm². Pri mäte piepornej má táto krivka plynulejší priebeh. Najskôr od mája do augusta prebieha nárast počtu trichómov zo 101 na 160/cm². Potom z maxima v auguste nastal pokles v septembri ale v októbri nastal mierny nárast na o 11 trichómov/cm² (Obr. 3). Štatisticky významné rozdiely v počte trichómov sme zaznamenali pri m. klasnatej od júna do septembra. Pri mäte piepornej to bolo medzi mesiacmi máj až september.

Záver

Z meraní dĺžky a šírky listov sme zistili, že mäta piepornej má kratšie a širšie listy a mäta klasnatej má dlhšie a užšie listy. V júni boli listy m. klasnatej dlhšie aj širšie ako listy m. piepornej. Tento rozdiel ilustruje fakt, že listy m. piepornej dosiahnu svoje maximum rastu už v máji a m. klasnatej až v júni. Súčasťou výskumnej práce bolo aj porovnanie viacerých metodických postupov. Pre efektívnejšie meranie plochy listov sme skombinovali využitie polárneho planimetra a lineárne rozmery listu (dĺžka, šírka) na výpočet prepočítavacieho koeficientu k . Tak ako pri dĺžke a šírke listov aj hodnoty plochy listov rástli do mája a júna, a potom klesali. Pokles veľkosti listov m. piepornej v júni oproti augustu mohol byť ovplyvnený aj výberom listu na stanovenie prepočítavacieho koeficientu k . Do nášho výskumu sme zaradili aj počítanie žľaznatých trichómov na liste. Po vyskúšaní niekoľkých

postupov sme trichómy vyhodnocovali na listoch priamo po pôsobení Tollensovho činidla, ktoré zvýraznilo žľaznaté trichómy a ľahko sme ich rozoznali medzi krycími trichómami. Nárast plochy listov oboch druhov, koreluje s nameranými dĺžkami a šírkami listov. Jedine v auguste pri mäte piepornej, plocha listov výrazne narástla oproti júlu, čo bolo spôsobené zlým výberom listu na výpočet prepočítavacieho koeficientu k . Zistili sme, že plocha listov a počet trichómov na liste nekoreluje významne. Dôkazom toho je, že listy m. piepornej dosahujú maximum plochy listov v máji a m. klasnatej v júni, ale maximálny počet trichómov obidvoch druhov sme zaznamenali až v auguste (ideálna klíma na tvorbu silíc – teploty v júli a auguste 20 – 24 °C, slabší vietor; zber listov za slnečného počasia), kedy už plocha listov pri oboch druhoch poklesla. V dôsledku veľmi dobrých klimatických podmienok v auguste, sme v tomto mesiaci napočítali najviac trichómov za celé vegetačné obdobie pri obidvoch druhoch. Tieto výsledky poukazujú na významný vplyv počasia, lokalilty a druhu na prítomnosť vylučovacích orgánov a tým aj na obsah esenciálnych olejov v priebehu vegetačného obdobia u rastlín z rodu *Mentha*.

Pod'akovanie

Práca vznikla aj s podporou riešenia KEGA 044UKF-4/2012 a APVV LPP-0125-07.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Liečivé rastliny. [cit. 20. február 2013] <<http://www.liecive.herba.sk/index.php/rok-2009/35-5-2009/436-mata-piepor-na-mint-.html>>
- [2] Velgosová M., Velgos Š. (1988) Naše liečivé rastliny. Slovenské pedagogické nakladateľstvo, Bratislava, p. 40
- [3] Votrubová O. (2010) Anatomie rostlin. Univerzita Karlova - Karolinum, Praha, p. 92
- [4] Sharma S., Sangwan N. S., Sangwan R. S. (2003) Current science 84(4), p. 544
- [5] Turner G. W., Gershenzon J., Croteau R. B. (2000) Plant Physiol. 124(2), p. 655
- [6] Fahn A. (1988) New Phytol. 108(3), p. 229
- [7] Zima M. (1984) Návodý na cvičenia z biologických základov rastlinnej výroby. Príroda, Bratislava, p. 81
- [8] Vinter V. (2008) Srovnání anatomické a morfologické stavby slunných a zastíněných listů u listnatých stromů a keřů. Univerzita Palackého, Olomouc, p. 2
- [9] Peterson R., Peterson C., Melville L. (2008) Teaching Plant Anatomy. NRC Press, Ottawa, p. 56
- [10] Špaldon E. a kol. (1982) Rastlinná výroba. Príroda, Bratislava, p. 573

Increased bacterial persistence in *Escherichia coli* under selective pressure

Lucia Gavulová¹, Daniel E. Rozen²

¹*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of molecular biology, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovakia; lucia.gavulova@gmail.com*

²*Leiden University, Institute of Biology Leiden, Department of molecular microbiology and biotechnology, Sylviusweg 72, 2333 BE Leiden, The Netherlands; d.e.rozen@biology.leidenuniv.nl*

Abstract

Bacterial persistence describes a phenomenon wherein a small subpopulation of cells is able to survive a challenge under antibiotic pressure better than the majority of the population. Persisters remain dormant but are able to re-grow after antibiotic treatment; moreover the fraction of persister cells is increasing after each treatment with antibiotic. This phenomenon is one of the reasons standing behind the ineffectiveness of antibiotic treatment in most infectious diseases caused by bacteria, mainly those treated for a longer period of time. Data presented in this work show that bacterial persistence in model organism such as *Escherichia coli* K-12 is significantly increasing after few repeats of selective pressure with ampicillin, β -lactam antibiotic to which *E. coli* is normally susceptible and that evolved persisters are more tolerant against the same antibiotic pressure than ancestor strains.

Key words: *Escherichia coli*, bacterial persistence, antibiotic treatment, ampicillin

Introduction and aim of the study

Approximately 0,001 percent to 0,1 percent of the cells of an isogenic bacterial population display tolerance to prolonged treatment with high doses of bactericidal antibiotics, leading to a biphasic killing pattern of bacterial populations upon treatment with bactericidal antibiotics [1]. Cells from this subpopulation are so-called “persister cells”. In contrast to resistant cells, persisters are genetically identical to susceptible bacteria, constituting phenotypic variants of the wild type. Although their phenotypic tolerance allows them to remain viable in the presence of bactericidal antibiotics, persister cells are generally nongrowing [2].

The clinical relevance of microbial persistence is gradually emerging now that evidence has been provided for a causal link between therapy failure and the presence of persister cells [3]. Their transient insensitivity to bactericidal antibiotics combined with the ability to revert from this multidrug tolerant to an antibiotic-sensitive state in which cells rapidly divide make them of substantial importance for the recalcitrance of chronic infections [2].

It is essential to find a way how to deal with bacterial persistence phenomenon in treating infectious diseases. Therefore there is need to observe how bacterial persistence is maintained, what are the triggers and most importantly how it can be eradicated.

Main goal of this research was to select persisters in *Escherichia coli* K-12 using β -lactam antibiotic ampicillin and later compare the effectiveness of the same antibiotic treatment between evolved persister culture and strains from which they arised.

Materials and methods

Bacterial strains:

Tab. 1 Used bacterial strains of *E. coli*, their genotype and source

<i>E. Coli</i> K-12 strain BW25113	Genotype	Source
Wild type	<i>F</i> , $\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787}>::\text{rrnB-3}$, λ , <i>rph-1</i> , $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, <i>hsdR514</i>	Remus Dame via KEIO strain collection
DPS	<i>F</i> , $\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787}>::\text{rrnB-3}$, λ , <i>rph-1</i> , $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, <i>hsdR514</i> , <i>dps</i>	Remus Dame via KEIO strain collection
FIS	<i>F</i> , $\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787}>::\text{rrnB-3}$, λ , <i>rph-1</i> , $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, <i>hsdR514</i> , <i>fis</i>	Remus Dame via KEIO strain collection
Hha	<i>F</i> , $\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787}>::\text{rrnB-3}$, λ , <i>rph-1</i> , $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, <i>hsdR514</i> , <i>hha</i>	Remus Dame via KEIO strain collection
H-NS	<i>F</i> , $\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787}>::\text{rrnB-3}$, λ , <i>rph-1</i> , $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, <i>hsdR514</i> , <i>h-ns</i>	Remus Dame via KEIO strain collection
cbpA	<i>F</i> , $\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787}>::\text{rrnB-3}$, λ , <i>rph-1</i> , $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, <i>hsdR514</i> , <i>cbpA</i>	Remus Dame via KEIO strain collection
stpA	<i>F</i> , $\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787}>::\text{rrnB-3}$, λ , <i>rph-1</i> , $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, <i>hsdR514</i> , <i>stpA</i>	Remus Dame via KEIO strain collection

Time-kill curves experiment

Escherichia coli strains grown overnight in 3ml of LB broth were diluted 1:100 in 3ml fresh LB broth and incubated at 37°C with shaking for 2 hours to a density of around 10^8 cells/ml. Cultures were then sampled and subsequently treated with 48 μ g/ml or 34 μ g/ml concentration of ampicillin (stock 48mg/ml) and sampled every hour for 4 hours. To determine the number of colony-forming units per millilitre (CFU/ml) cultures were sampled by appropriate serial dilution in 1x concentrated PBS and plated onto LB agar. All time-kill experiments were repeated several times with twofold replication.

Persister selection

Six replicates of *E. coli* (wild type, DPS, Hha) were grown overnight in 3ml of LB broth at 37°C with shaking. Subsequently they were diluted 1:100 in 1ml fresh LB broth and incubated at 37°C with shaking for 2 hours to a density of around 10^8 cells/ml. Cultures were

then sampled and treated for 4 hours with the same concentration of ampicillin as used in time-kill curves experiment. Cultures were then sampled and washed with 1x concentrated PBS by centrifuging at 14 000 rpm for 1 min. Pellet with cells was resuspended in 1ml of fresh LB broth. Cultures were then incubated overnight at 37°C with shaking, during which time they recovered from drug exposure and grew to reach a stationary phase. The same procedure as above was used to initiate second up to ninth round of experiment. To determine the number of colony-forming units per millilitre (CFU/ml) cultures were sampled by appropriate serial dilution in 1x concentrated PBS and plated onto LB agar.

Results and discussion

Time-kill curves for seven strains of *Escherichia coli* K-12 KEIO strain collection (a set of single-gene deletion mutants of *Escherichia coli* K-12) were made using ampicillin (concentration 48µg/ml based on results from Minimal Inhibitory Concentration (MICs) tests which were made previously) (Fig. 1). Strains were exposed to antibiotic pressure for four hours and CFU/ml were counted the next day. This experiment was repeated eight times to ensure the verification of the results and the strains were also grown on the LB agar plates with addition of the same concentration of antibiotic as used in time-kill curves to verify that strains are not resistant to antibiotic. In no case the growth was observed. From the results it is obvious that there is variation between different strains of *E. coli* and the fraction of died cells after four hour long exposure is between three and five logs. The fraction of survived cells after each day can be considered as a population of persister cells.

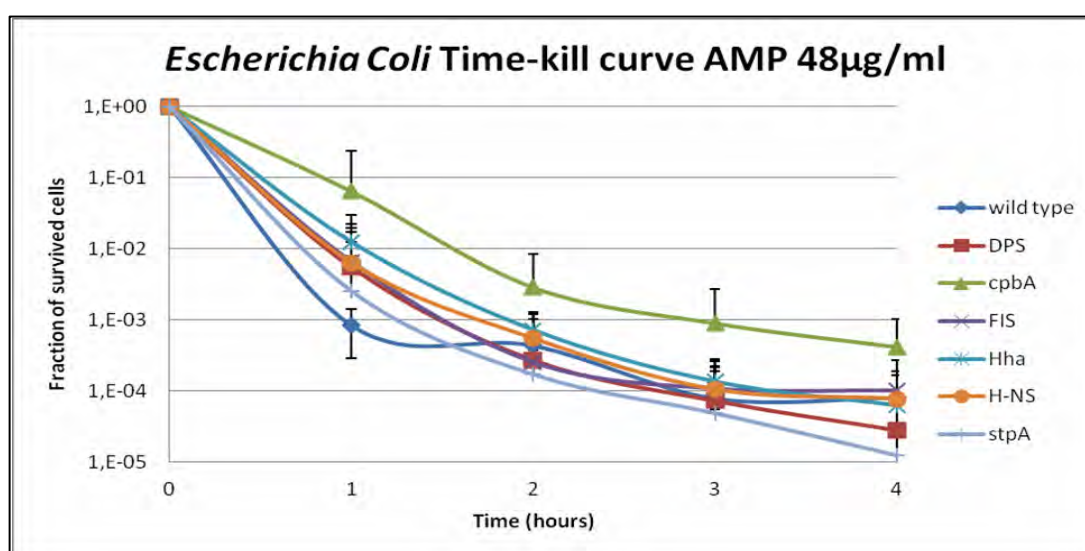


Fig. 1 Time-kill curve in *Escherichia coli* strains using 48µg/ml concentration of ampicillin during four hour long exposure.

Based on the results from time-kill curves six replicates of three strains were picked – wild type, DPS and Hha strain and the experiments for persister selection were made (Fig.2). The four hour long ampicillin exposure was repeated nine times and after each run the strains were washed and grow overnight to have time to recover from drug exposure. The fraction of survived cells after each day can be considered as a population of persister cells. It is shown that fraction of persisters is increasing in time which can be compared to the long treatment by antibiotics in infectious diseases and one of the reasons why the treatment is not effective after certain period of time. There is also observed slight variation across the replicates of strains and across the strains as well. In some cases, e.g. Hha replica 2, the resistant was developed after two days of experiment.

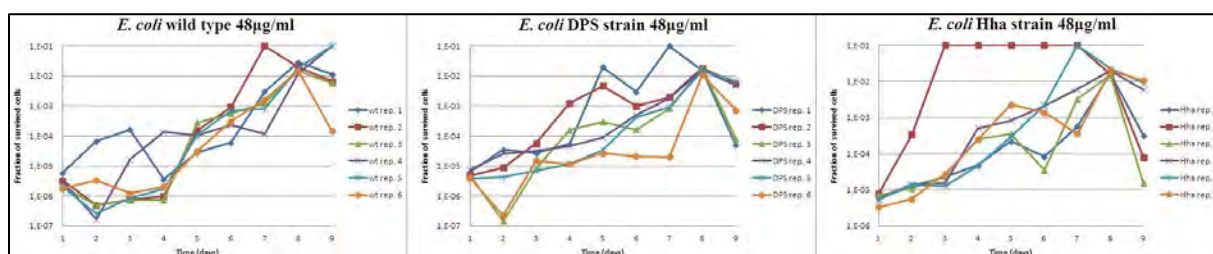


Fig. 2 Persister selection in *Escherichia coli* wild type, DPS and Hha strain in time (days). Values above 1E-01 are showing not countable data.

Some of the evolved persister replicates (wild type rep. 1, 2 and 3; DPS rep. 3, 4 and 5; Hha rep. 2 and 5) were picked to repeat time-kill curves as well as with ancestor (paternal) strains *E. coli* to compare fraction of survived cells before and after evolving bacterial persistence (Fig. 3). As the results show, there is difference minimally one to three or one to four logs (wild type and Hha strain or DPS strain, respectively) between evolved persisters and ancestor strains, which are confirming that evolved persister cultures are more tolerant to antibiotic exposure than ancestors of the same strain.

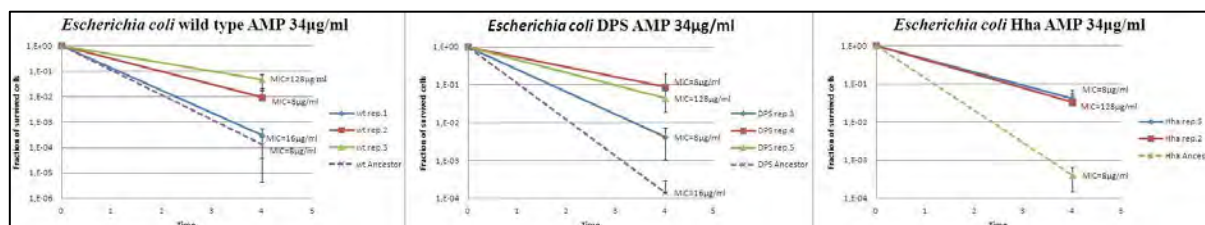


Fig. 3 Time-kill curves in *Escherichia coli* wild type, DPS and Hha strain in time (hours) using 34µg/ml concentration of ampicillin. Compared evolved persister replicates versus ancestors.

Conclusion

In our work we were successful in preparing bacterial cultures of *Escherichia coli* with evolved persisters. Moreover we proved that those evolved persisters are more tolerant to antibiotic exposure than ancestors in the same period of time confirming the hypothesis that bacterial infections treated with the same concentration of antibiotic for a long time is later more tolerant to antibiotic treatment.

There is need to test whether these evolved persister cultures are more tolerant against other antibiotic within or outside the same antibiotic group and how the bacterial persistence is evolving during the cell cycle. To test this we have to repeat experiments with the cultures in which the cells are synchronized in their cell cycle.

Acknowledgements

Research was funded by Institute of Biology Leiden at Leiden University, The Netherlands.

Bibliography

- [1] Lewis K. (2010) *Annu. Rev. Microbiol.* 64, p. 357
- [2] Kerren I., Kaldalu N., Spoering A., et al. (2004) *FEMS Microbiol. Lett.* 230 (1), p. 13
- [3] Kint C. I., Verstraeten N., Fauvart M., et al. (2012) *Trends Microbiol.* 20(12), p. 577

Biodegradačné účinky termofilných a termotolerantných baktérií z vodného prostredia

Tomáš Grivalský¹, Katarína Chovanová¹, Nikoleta Šaková^{1,2}

¹*Slovenská akadémia vied, Ústav molekulárnej biológie, Lab. environmentálnej a potravinovej mikrobiológie, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovenská republika, tomasgrivalsky(at)gmail.com*

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

Abstrakt

The submitted study is oriented on the investigation of thermophiles and thermotolerant bacteria in water environment. We have developed a new cultivation approach where the bacterial cultures grew in a simulated natural environment. We were able to isolate 11 thermotolerant and 3 thermophiles bacteria by filtration of the water from Dunaj River. These results are very interesting, because the temperature of water, during sampling, was 4 °C. Thermotolerant bacteria survive a temperature of 60 °C and have the optimal growth around 37 °C. Thermophile bacteria grew very well at the temperature of 60 °C. By 16S rDNA sequencing analysis the thermotolerant bacteria showed to belong to the genus *Bacillus* while the thermophile isolates belonged to the genus *Geobacillus*. The isolated strains were screened to potential proteolytic and lipolytic abilities and some positive results were obtained.

Kľúčové slová: biodegradačné účinky; termofily; *Geobacillus*; 16S rDNA

Úvod a formulácia cieľa

Baktérie schopné rásť v laboratórnych podmienkach predstavujú len nepatrnú čiastku, približne 1 %, z celkového počtu baktérií [1]. Jednou z metód kultivácie tzv. nekultivovateľných mikroorganizmov je čo najlepšie napodobniť ich pôvodný ekosystém. Takéto nové kultivačné prístupy nám umožňujú viac pochopiť fungovanie jednotlivých ekosystémov, a zároveň získanie doteraz nepoznaných mikroorganizmov má potenciál využitia v biotechnologickom a farmaceutickom priemysle. V súčasnosti sa pre objavovanie nekultivovateľných mikroorganizmov využívajú nové metódy, akými sú napríklad difúzna komora [2] alebo ichip technológia [3].

Jednou z podmienok rastu baktérií je teplota. Na základe optimálnych podmienok rastu rozdeľujeme baktérie na psychrofilné (optimum 10 °C), mezofilné (optimum 35 °C) a termofilné (veľmi variabilné optimum od 45 °C po viac ako 100 °C). Ich teplotné minimá a maximá sa v postupnom slede prelínajú [4].

V environmentálnom prostredí bolo doteraz objavených pomerne málo mikroorganizmov schopných depolymerizácie [5]. Biodegradovateľné alifatické polyestery ako napríklad PLA (kyselina poly-mliečna), PHB (poly-butylén sukcinát) a PHBSA (poly-butylén sukcinát-co-adipát) sú na základe ich fyzikálno-chemických vlastností jedným z

najslubnejších materiálov environmentálnych biotechnológií. Ich potenciál spočíva najmä vo výrobe a náhrade konvenčných plastov, a teda v redukcii znečistenia životného prostredia. Niektoré depolymerázy sú schopné degradovať kazeín, fibrín alebo vykazujú lipázovú alebo esterázovú aktivitu [6]. V súčasnosti sa stále hľadajú mikroorganizmy schopné rýchlej depolymerizácie. Využitie mikrobiálnych PLA depolymeráz spočíva v recyklácii PLA, zatiaľ čo PHB depolymerázy sú účinné pri kompletnej degradácii na vodu a CO₂ [7, 8].

Cieľom tejto práce je pomocou kombinácie techník mikrobiológie a molekulárnej biológie hľadať nové mikroorganizmy s využiteľnými termostabilnými a depolymerizačnými vlastnosťami pre environmentálne prijateľné biotechnologické účely.

Materiál a metódy

Zdrojom mikroorganizmov bolo prostredie rieky Dunaja v oblasti Chorvátskeho ramena. Mikroorganizmy boli zachytené filtráciou vody cez nitrocelulóзовé hydrofilné filtre s veľkosťou pórov 0,3 μm. Následne boli filtre položené medzi agarové média (prefiltrovaná voda z Chorvátskeho ramena, 1,5 % agar, 1 % trypton, 0,5 % kvasničný autolyzát, 0,5 % chlorid sodný) tzv. sendvič a uložené v prostredí vody z Dunaja pri teplotách 70 °C, 60 °C, 37 °C a 4 °C. Po niekoľkých dňoch bol samostatný filter vybratý zo „sendviča“, prenesený na misku s agarom a nechal sa rásť pri teplotách 70 °C, 60 °C, 37 °C a 4 °C.

Z izolovaných baktérií bola izolovaná DNA kitom Simax (E.coli) pre izoláciu gram-pozitívnych baktérií.

Narastené a izolované baktérie boli testované na proteázovú aktivitu na mliečnom agare (3/4 w/v 2% živný agar, 1/4 w/v mlieko,) a keratínovom médiu (fyz. roztok, perie) a na lipázovú aktivitu na médiu Spirit (Sigma-Aldrich), tween 80 médiu (1% peptón, 0,01% chlorid vápenatý, 1,5% agar, 1% tween 80, dd H₂O, pH = 7,4) a tributyrínovom médiu (1% tributyrín, 0,5% peptón, 0,3% kvasničný autolyzát, 2% agar, dd H₂O),

Izolovanú DNA z baktérií sme použili ako templát do PCR reakcie s primery 27F a 685r pre 16S rDNA úseky, získané reakcie boli poslané do firmy Microgene (Holandsko).

Výsledky a diskusia

Na základe kultivácie baktérií získaných z oblasti Chorvátskeho ramena Dunaja (4 °C) sme izolovali 11 termotolerantných baktérií (označených TR_1 – TR_11) schopných prežiť teplotu 60 °C a rásť pri teplote 37 °C. Následnou sekvenačnou analýzou 16S rDNA úsekov sme tieto údaje potvrdili **Tab.1**. Bližšie určenie jednotlivých kmeňov týchto baktérií si

vyžaduje podrobnejšiu mikrobiologickú a sekvenačnú analýzu. Pri jednotlivých izolátoch sme testovali degradačnú aktivitu tzv. metódou tvorby zón okolo baktérií **Tab. 1**. Všetky vzorky vykazovali degradačnú aktivitu na keratínovom médiu. Testy metódou tvorby zón okolo mikroorganizmov sú najrozšírenejšími metódami pri určovaní mikroorganizmov s degradačnými schopnosťami.

Tab.1 Identifikácia baktérií na základe sekvenčnej similarity v oblasti 16S rDNA úsekov v programe BLAST a degradačné schopnosti termotolerantných baktérií pri teplote 37°C. Intenzita degradácie je označená počtom znamienok „+“.

Kmeň	Podobnosť	Dĺžka pokrytia sekvencie	Identita sekvencie	Tween 80 agar	Milk agar	Spirit
TR_1	KC434963 <i>Bacillus pumilus</i> KC434960 <i>Bacillus safensis</i> KC414720 <i>Bacillus aerophilus</i> KC414719 <i>Bacillus altitudinis</i>	100% 100% 100% 100%	100% 100% 100% 100%	++	+	++
TR_2	KC441794 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KC166138 <i>Bacillus subtilis</i> JX993749 <i>Pseudomonas fluorescens</i> KC172012 <i>Bacillus methylophilus</i> GQ475508 <i>Brevibacillus brevis</i>	100% 100% 100% 100%	100% 100% 100% 100%	+++	-	++
TR_3	KC139432 <i>Bacillus aryabhattai</i> KC189946 <i>Bacillus megaterium</i> JF901375 <i>Endophytic bacterium</i> JN411389 <i>Bacillus cereus</i>	100% 100% 100% 100%	100% 100% 100% 100%	-	-	+
TR_4	KC434963 <i>Bacillus pumilus</i> KC434960 <i>Bacillus safensis</i> KC414720 <i>Bacillus aerophilus</i> KC414719 <i>Bacillus altitudinis</i>	100% 100% 100% 100%	100% 100% 100% 100%	+++	+	++
TR_5	KC460410 <i>Bacillus subtilis</i> KC441739 <i>Bacillus tequilensis</i> KC424493 <i>Bacillus methylophilus</i> HQ694078 <i>Bacillus licheniformis</i>	100% 100% 100% 100%	100% 100% 100% 100%	+++	+	+++
TR_6	KC441794 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KC166138 <i>Bacillus subtilis</i> JX993749 <i>Pseudomonas fluorescens</i> KC172012 <i>Bacillus methylophilus</i> HQ844455 <i>Bacillus tequilensis</i> JF496492 <i>Bacillus vallismortis</i>	100% 100% 100% 100%	100% 100% 100% 100%	-	+	-
TR_7	KC441761 <i>Bacillus vallismortis</i> KC441751 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KC128897 <i>Bacillus subtilis</i> KC310834 <i>Bacillus sp</i> JX315308 <i>Bacillus methylophilus</i> JX065213 <i>Bacillus siamensis</i> JQ740641 <i>Swine manure</i>	100% 100% 100% 100% 100% 100%	100% 100% 100% 100% 100% 100%	++	+	++
TR_8	JX228332 <i>Bacterium 67-L049658-</i>	100%	100%	-	+	-

	122-015-C09 KC139432 <i>Bacillus aryabhatai</i> KC189946 <i>Bacillus megaterium</i> JF901375 Endophytic bacterium JN411389 <i>Bacillus cereus</i>	100% 100% 100% 100%	100% 100% 100% 100%			
TR_9	KC441794 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KC213791 <i>Bacillus subtilis</i> JX993749 <i>Pseudomonas fluorescens</i> JQ647880 <i>Bacillus vallismortis</i> HQ662596 <i>Bacillus methylophilus</i> GQ475508 <i>Brevibacillus brevis</i>	100% 100% 100% 100% 100%	100% 100% 100% 100% 100%	+++	+	++
TR_10	JX994100 <i>Bacillus subtilis</i> JX282525 <i>Bacillus methylophilus</i> JQ765432 <i>Bacillus vallismortis</i> JN366747 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100% 100% 100% 100%	100% 100% 100% 100%	+	+	++
TR_11	KC405251 <i>Bacillus megaterium</i> KC315897 <i>Bacillus aryabhatai</i>	100% 100%	100% 100%	-	+	-

Už tieto testy, ktoré sme vykonali môžu naznačovať schopnosti depolymerizácie látok, po ktorých je v súčasnosti „dopyt“ ako napríklad PLA alebo PHB depolymerázy. Tieto baktérie v blízkej budúcnosti podrobíme ďalším degradačným testom ako sú napríklad degradácia PHB.

Pozoruhodným zistením však bolo objavenie 3 termofilných izolátov v oblasti Chorvátskeho ramena Dunaja, kde bola v tom čase teplota vody 4°C, schopných rásť ihneď na druhý deň po vysiatí na LB médiu pri teplote 60 °C a 70 °C. Analýzou na základe sekvencií (ozn. TF_2, TF_4, TF_5) v oblasti 16S rDNA sme identifikovali endosporulujúce baktérie druhu *Geobacillus thermoglucosidans*, zrejme ide o rozdielne kmene, pretože po vysiatí rástli na rozdielnych degradačných médiách a pri rozdielnej teplote **Tab. 2**, teda za rozdielnych podmienok. Avšak žiadna z týchto vzoriek nevykazovala degradačnú aktivitu.

Tab. 2 Identifikácia termofilných baktérií na základe sekvencií 16S rDNA v program BLAST a schopnosť rastu v rozdielnych médiách a pri rozdielnej teplote

Kmeň	Podobnosť	Dĺžka pokrytia sekvencie	Identita sekv.	Teplota			
				Médium	4°C	37°C	60°C
TF_2	CP002835 <i>Geobacillus thermoglucosidans</i>	100%	100%	Milk agar	-	-	+
	AJ564613 <i>Geobacillus caldxylosilyticus</i>	100%	99%	Trib. médium	-	-	+
	FR749958 <i>Bacillus thermantarcticus</i>	100%	98%	Tween 80 médium	-	-	-
TF_4	KC551264 <i>Geobacillus sp.</i> CP002835 <i>Geobacillus</i>	100%	100%	Milk agar	-	-	+

	<i>thermoglucoasidarius</i> AJ564613 <i>Geobacillus</i> <i>caldoxylosilyticus</i>	99%	100%	Trib. médium	-	-	+
		99%	99%	Tween 80 m	-	+	+
TF_5	AB682662 <i>Geobacillus</i> <i>thermoglucoasidarius</i> AJ564613 <i>Geobacillus</i> <i>caldoxylosilyticus</i>	100%	99%	Milk agar	-	+	+
		100%	99%	Trib. médium	-	-	+
				Tween 80 médium	-	+	-

Z hľadiska aplikovaného výskumu je druh *Geobacillus thermoglucoasidans* veľmi zaujímavý, pretože okrem toho že sa mu darí rásť pri vysokej teplote, je schopný tolerovať vysoký objemu etanolu až 10% w/v. Zároveň je schopný degradácie celulólickej biomasy, a preto má veľký potenciál využitia, napríklad pri produkcii bioetanolu. [9].

Záver

V tejto práci sa nám podarilo z Dunaja v oblasti Chorvátskeho ramena zachytiť 11 termotoleraných izolátov rodu *Bacillus* a 3 izoláty rodu *Geobacillus*. Zároveň sme využili novú metódu izolácie baktérií z environmentálnych vzoriek, a to rastom baktérií v ich čiastočne pôvodnom prostredí. Všetky izolované vzorky boli podrobené degradačným testom tvorbou zón okolo baktérií a na tomto princípe sa nám podarilo stanoviť proteázové, lipázové a esterázové aktivity týchto izolátov. Výsledky práce nie sú úplné, a preto budeme s týmto výskumom pokračovať a postupne rozširovať zdroje mikroorganizmov, metódy kultivácie a degradačné a depolymerizačné testy jednotlivých izolátov z environmentálneho prostredia.

PodĎakovanie

PodĎakovanie patrí ľuďom, ktorý sa či už priamo alebo nepriamo zaslúžili o túto prácu.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Daniel R. (2005) Nat. Rev. Microbiol. 3(6), p. 470
- [2] Lewis K., Epstein S., D'Onofrio A., Ling L. L. (2010) J. Antibiot. (Tokyo). 63(8), p. 468
- [3] Nichols D., Cahoon N., Trakhtenberg E. M., Pham L., Mehta A., Belanger A., Kanigan T., Lewis K., Epstein S. S. (2010) Appl. Environ. Microbiol. 76(8), p. 2445
- [4] Kenneth Todar. [Citované: 6. marec 2013]
<http://www.textbookofbacteriology.net/nutgro_5.html>

- [5] Sakai K., Kawano H., Iwami A., Nakamura M., Moriguchi M. (2001) *J. Biosci. Bioeng.* 92(3), p. 298
- [6] Mayumi D., Akutsu-Shigeno Y., Uchiyama H., Nomura N., Nakajima-Kambe T. (2008) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79(5), p. 743
- [7] InTech — Open Access Company. [Citované: 5. marec 2013]
<http://cdn.intechopen.com/pdfs/17259/InTech-New_insight_into_biodegradation_of_poly_l_lactide_enzyme_production_and_characterization.pdf>
- [8] Formatex Research Center. [Citované: 5. marec 2013]
<<http://www.formatex.org/microbio/pdf/contents.pdf>>
- [9] Cripps R. E., Eley K., Leak D. J., Rudd B., Taylor M., Todd M., Boakes S., Martin S., Atkinson T. (2009) *Metab. Eng.* 11(6), p. 398

Influence of NGF on Ca_v1.2 and Ca_v1.3 voltage-dependent calcium channels in rat pheochromocytoma cells

Jana Hlinková¹, Katarína Jašková², Lucia Lapínová¹, Lucia Lichvárová², Ľubica Lacinová²

¹ *Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Animal Physiology and Ethology, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovak Republic; selenuska@gmail.com*

² *Slovak Academy of Sciences, Institute of Molecular Physiology and Genetics, Department of Transport Proteins, Vlárská 5, 833 34 Bratislava, Slovak Republic*

Abstract

It is well established that calcium plays an indispensable role in a proper neuronal function. Neuronal growth factor (NGF) as a secreted protein has a significant importance in a regulation of growth of neurones. Rat pheochromocytoma cells (PC12 cells) influenced by NGF exhibit neuronal differentiation into neurone-like cells, what proves a certain role of Ca²⁺ ions in this process. For monitoring changes in a gene expression of plasma membrane Ca_v1.2 and Ca_v1.3 transporters in PC12 cells cultivated with NGF. In this study we show time dependent changes of Ca_v1.2 and Ca_v1.3 expression in PC12 cell influenced with NGF.

Keywords: *PC12; NGF; neural differentiation; Cav1.2; Cav1.3; L-type calcium channels.*

Introduction

Intracellular Ca²⁺ plays an important role in Ca²⁺-regulated neuronal functions including membrane excitability, neurotransmitter release and synaptic plasticity [1, 2]. Intracellular Ca²⁺ concentration is controlled by both influx of Ca²⁺ ions into the cell through voltage-dependent Ca²⁺ channels (VDCCs) and release of Ca²⁺ ions from intracellular stores [3].

PC12 cell line was established almost 50 years ago by Green and Tischler from rat pheochromocytoma [4]. In response to neuronal growth factor (NGF) PC12 cells undergo partial growth arrest and differentiate to a phenotype of sympathetic neurons [5]. An initial step in signalling cascade which mediates NGF-dependent neural differentiation is binding of NGF to tyrosine kinase receptor type 1 or type A (TrkA). This signal pathway encompasses number of protein kinases including protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC) and inositol (1,4,5) trisphosphate 3-kinase (IP₃K) which eventually regulate activity of extracellular signal regulated kinase (ERK) phosphorylation [6]. Activation of both PKA and PKC supports NGF driven neurite outgrowth [7, 8]. In this study we analysed the expression of Ca_v1.2 and Ca_v1.3 VDCC in NGF-dependent neurite outgrowth in PC12 cells.

Materials and methods

PC12 cell line was purchased from DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany) and grown in DMEM with L-glutamine, 20% fetal bovine serum and 100 U/ml penicillin-streptomycin in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% air at 37°C. After plating out into 35 mm Petri dishes (day 0) cell differentiation was initiated by supplementing the culture medium with 50 ng/ml of NGF. Transcription and expression of Ca_v1.2 and Ca_v1.3 was evaluated on day 4, 9, 12 and 15 of the NGF treatment.

Expression of the *CACNA1C* gene encoding the α_1 subunit of the Ca_v1.2 was evaluated by RT-PCR analysis from total cell lysates of PC12 cells harvested on indicated days. Total RNA was isolated by TRI Reagent (Sigma-Aldrich, Germany), samples were homogenized in TRI Reagent (Sigma, Germany), and after 5 min. incubation at room temperature, the homogenate was extracted by chloroform (SERVA, Germany). RNAs in the aqueous phase were precipitated by isopropanol (SERVA, Germany). RNA pellet was washed with 75% ethanol (SERVA, Germany) and stored under 96% ethanol (SERVA, Germany) at -20°C overnight. Samples were stored at -70°C. The purity and integrity of isolated RNAs was checked on nanophotometer (Implen, Germany). The A₂₆₀/A₂₈₀ ratio to assess RNA purity was used. An A₂₆₀/A₂₈₀ ratio of 1.8–2.1 were used. The RNA integrity number (RIN) served as RNA integrity parameter. RIN 1500 ng/ μ l was used. Reverse transcription was performed using 1.5 μ g of total RNAs and Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare, Germany) with pd(N6) primer. For evaluation of the expression of *CACNA1D* gene encoding Ca_v1.3 we used Nested gPCR. GAPDH primers were used to amplify a housekeeper gene for semi-quantitative evaluation of PCR products. Master mix for PCR consisted of 12.5 μ l of DreamTaq Green (Thermo Scientific, Germany), 10.2 μ l of nuclease-free water and 0.5 μ l of 5 pM primers per sample (Jena Bioscience GmbH, Germany) (Tab. 1). Temperature conditions of different PCR programs are shown in Tab. 2.

Tab. 1 Primers used for subsequent PCR amplification

	Forward primer	Reverse primer
<i>CACNA1C</i>	5'-GAC CGG GGA GGA CTG GAA TT-3'	5'-GGC CAG CTT CTT CCT CTG CTT-3'
<i>CACNA1D 1</i>	5'-ACC AAG CCA ATT CTC CTT TGC-3'	5'-GAG CTG TTC GGC TGA AGA AGT-3'
<i>CACNA1D 2</i>	5'-AGG GGA CCA AGC CAA TTC TC-3'	5'-GAG TCT GGT GCC TCT TGC AT-3'
<i>GAPDH</i>	5'-AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3'	5'-TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3'

Tab. 2 PCR Programs used for subsequent PCR amplification (30 cycles for *CACNA1C*, 40 cycles for *CACNA1D* and 33 cycles for *GAPDH*)

	Number of cycles	<i>CACNA1C</i>	<i>CACNA1D</i>	<i>GAPDH</i>	T [min]
		t [°C]			
<i>Initialization</i>	1	95	95	95	5
<i>Denaturation</i>	30 - 40	95	95	95	1
<i>Annealing</i>		58	58	60	1
<i>Polymerisation</i>		72	72	72	1
<i>Polymerisation</i>	1	72	72	72	7

PCR products were analyzed in 2% agarose gel and signals were evaluated by PCBAS 2.0 software (Düsseldorf, Germany).

Results are shown as a mean \pm S.E.M. from at least five cell preparations. Values measured at individual days were compared by one-way ANOVA with Tukey post-test and $p < 0.05$ was considered significant.

Results and Discussion

In this study we had compared gene expression of VDCC $Ca_v1.2$ and $Ca_v1.3$ in PC12 cells cultivated with NGF. We observed increased gene expression of *CACNA1C* gene encoding $Ca_v1.2$ channel. Sigmoidal time course reached plateau after the day 9 (Fig. 1). Values varied from 7.0 ± 0.5 (for day 0), 7.6 ± 0.8 (day 4), 10.2 ± 0.9 (day 9), 10.1 ± 0.8 (day12) to 10.3 ± 0.9 (day 15).

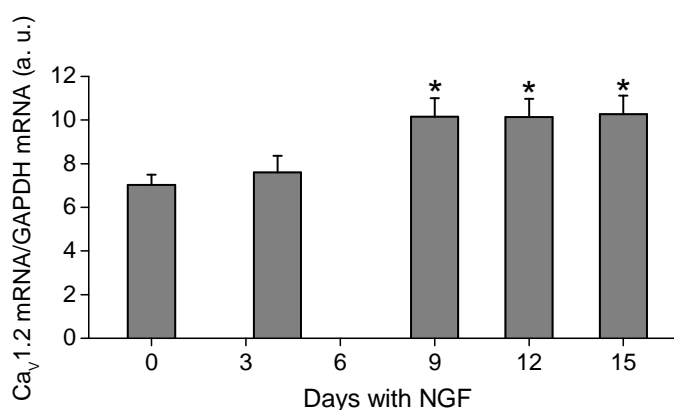


Fig. 1 Time dependency of mRNA levels of the *CACNA1C* gene ($Ca_v1.2$) at different days (4, 9, 12, 15) of NGF treatment. Day 0 represents PC12 cells not treated with NGF, since day 1 PC12 were treated by 50ng/ml NGF. mRNA levels were evaluated relative to the concentration of mRNA levels for housekeeper *GAPDH* gene. Expression of $Ca_v1.2$ channel increased with a sigmoidal time course and reached plateau after day 9. Each column represents a mean \pm SEM (standard error of the mean) n (number of samples) = from 5 independent experiments. * significantly different from the day 0, $p < 0.05$. Results are expressed in arbitrary units

Further, examined mRNA levels of CACNA1D gene encoding the Ca_v1.3 channel. We observed lower mRNA levels in PC12 cells treated with 50 ng/ml NGF compare to not treated cells (Fig. 2), however due to high variance of experimental data this effect was not statistically significant. Values varied from 2.2 ± 0.9 (for day 0), 0.7 ± 0.3 (day 4), 0.04 ± 0.02 (day 9), 0.2 ± 0.1 (day 12) to 0.015 ± 0.006 (day 15).

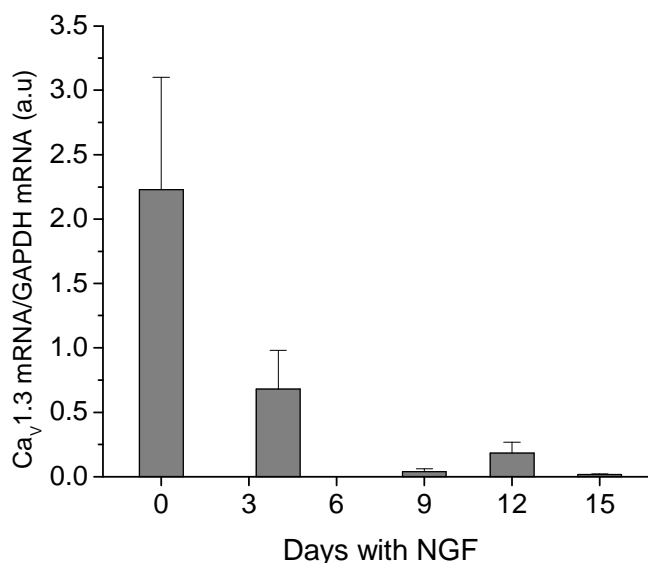


Fig. 2 Concentration of mRNA for CACNA1D gene encoding Ca_v1.3 channel expressed in PC12 cell under NGF treatment. Day 0 represents PC12 cells not treated with NGF, since day 1 PC12 were treated by 50ng/ml NGF. mRNA was evaluated relative to the concentration of mRNA for housekeeper GAPDH gene. Expression of Ca_v1.3 channel decreased by hyperbolic time course reaching minimum by day 3. Each column represents a mean ± SEM (standard error of the mean) n (number of samples) = from day 0, 4, 9, 12, 15 from 5 independent series. Results are shown as a mean ± SEM from at least five cell preparations. Results are expressed in arbitrary units

Conclusion

In our experiments we found out that treatment of PC12 cells with NGF boosts expression of Ca_v1.2 channels while expression of Ca_v1.3 channels was restrained.

Acknowledgements

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-0212-10.

References

- [1] Clapham, D. E. (1995) *Cell* 80, p. 259
- [2] Miller, R. J. (1987) *Science* 235(4784), p. 46
- [3] Hess, P. (1990) *Annu. Rev. Neurosci.* 13, p. 337
- [4] Green L. A. , Tischler A. S. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, p. 2424
- [5] Johnson, G. L. and Vaillancourt, R. R. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* 6,p. 230
- [6] Vaudry D., Stork P. J., Lazarovici P., et al (2002) *Science* 296, p. 1648
- [7] Kolkova K., Novitskaya V., Pedersen N., et al (2000) *J. Neurosci.* 20, p. 2238
- [8] Hansen T. O., Rehfeld J. F., Nielsen F. C. (2003) *Neurosci Lett.* 347, p. 57

Hostiteľská špecificita bakteriofágov infikujúcich kmene *Cronobacter* spp.

Viera Holíková, Michal Kajsik, Lucia Oslanecová, Hana Drahovská

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie,
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika; vholikova@gmail.com

Abstract

Cronobacter spp. is an opportunistic pathogen causing rare infections affecting mainly newborns and young children. Main source of infection is reconstituted dried-infant formula and tools used for its production. In presented work we isolated three bacteriophages specific to *Cronobacter* from waste water. Microbiological analysis was used to determine host specificity of bacteriophages on panel of 50 *Cronobacter* strains. We have found that the Pet-CM3-4 phage possessed the broadest host spectrum. PCR serotyping of the host strains was also applied in the study. However, no direct correlation between serotype and phage resistance was observed.

Keywords: bacteriophage; host specificity; *Cronobacter* spp.; serotype; O- antigen

Úvod a formulácia cieľa

Cronobacter spp. je skupina oportunistických patogénov, ktoré zapríčiňujú závažné ochorenia novorodencov ako sú meningitída, sepsa a enterokolitída [1]. Sú to gramnegatívne baktérie patriace do čeľade *Enterobacteriaceae*, ktoré boli spočiatku známe ako žlté pigmentované *Enterobacter cloacae*, neskôr ako druh *E. sakazakii* a v súčasnosti boli preklasifikované do samostatného rodu [2]. *Cronobacter* spp. je veľmi odolný pri prežívaní v prostredí, dokáže rásť v rozmedzí teplôt od 6°C do 46°C [3], a dlhodobo prežíva v sušených potravinách. Tento patogén kontaminuje potraviny buď priamo zo surovín alebo sekundárne po spracovaní [4]. Za hlavný zdroj infekcií u novorodencov je považovaná kontaminovaná detská sušená mliečna výživa, resp. nástroje používané na jej prípravu [5].

Pri liečbe bakteriálnych infekcií sa v súčasnosti využíva štandardná antibiotická liečba. Stúpajúca rezistencia baktérií na antibiotickú liečbu vyžaduje hľadanie nových liečebných postupov. Na liečbu infekcií a ochranu detskej sušenej mliečnej výživy pred kontamináciou baktériou *Cronobacter* spp. môže byť vhodnou alternatívou využitie bakteriofágov [6].

Cieľom našej práce bolo stanoviť hostiteľskú špecificitu fágov izolovaných z odpadovej vody a porovnať citlivosť kmeňov k bakteriofágom s typom O- antigénu LPS na povrchu baktérií.

Materiál a metódy

V práci sme používali bakteriálne kmene zo zbierky Katedry molekulárnej biológie PriF UK: *C. condimenti* (kmeň 040407/32), *C. dublinensis* (kmene LMG 23823, 260808/01, 140807/04, 088/09/P, NTU 582), 9 druhov *C. malonaticus* (kmene LMG 23826, 121206/29, 201206/21, 150507/70, 290108/11, 161007/35, 150507/66, 161007/29, NTU 507), 5 druhov *C. muytjensii* (kmene LMG 2787, 260808/07, ATCC 51329, NTU 530, NTU 895), 20 druhov *C. sakazakii* (kmene 121206/24, 210807/15, 140807/15, 240107/09, 201206/22, 061107/08, 110907/09, 040407/76, 150507/78, 170407/07, 130808/31, CCM 1902, BAA- 894, ATCC 29004, LMG 5740, NTU 1465, NTU 680, NTU 695, NTU 696, NTU 701), 9 druhov *C. turicensis* (kmene 290708/07, NTU 9, NTU 92, NTU 1313, NTU 111, 260808/05, LMG 23827, NTU 564, NTU 57), jeden druh *C. universalis* (kmeň NTU 581), kmeň *Enterobacter cloacae* CCM 1903 a *E. coli* DH5 α .

Bakteriofágy:

V práci sme používali fágy Dev-CS-11, Dev-CM-15, Dev-CT-26, Pet-CM-3-1 a Pet-CM-3-3, ktoré boli izolované z čističiek odpadových vôd ČOV Devínska Nová Ves a ČOV Petržalka (Tab. 2).

Metódy:

Zachytávanie bakteriofágov z prostredia: vzorky vody z čističiek odpadových vôd (ČOV) z Devínskej Novej Vsi a Petržalky sme kultivovali na indikátorových kmeňoch *Cronobacter* spp. uvedených v Tab. 2. Pomocou bakteriologického filtra sme prefiltrovali 10 ml vody, následne sme k filtrátu pridali 10 ml 2 x koncentrovanej LB pôdy, 2 ml bakteriálneho kmeňa. Túto kultúru sme kultivovali pri 37°C v termostate cez noc 12-18 hodín, potom sme pripravili fágový lyzát pridaním chloroformu a odstránením buniek centrifugáciou. Bakteriofágy sme purifikovali ultracentrifugáciou v gradiente CsCl.

Stanovenie okruhu hostiteľov metódou nanášania fágových suspenzií na vrchný agar: k 200 μ l bakteriálneho kmeňa (ktorého citlivosť sme testovali) sme pridali 5 ml vrchného agaru (TOP agar), 5 μ l 1 mol/l CaCl₂ a vyliali na vopred vysušenú Petriho misku s LB médiom. Po stuhnutí sme na povrch misky nanášali 10 μ l desiatkových riedení fágového lyzátu. Kvapky sme nechali zaschnúť a následne sme misky inkubovali pri 37 °C cez noc. Po inkubácii sme si odčítali lyzované zóny alebo plaky.

PCR: Pri stanovení sérotypov CS-0:1, CS-0:2, CT-0:1 a CT-0:2 amplifikáciou krátkych fragmentov o veľkosti 323- 438 bp sme použili primery podľa literatúry [7, 8, 9] uvedené v Tab. 1. Použili sme program: počiatočná denaturácia 94 °C 2 minúty, 30 cyklov

(denaturácia 94 °C 30s, anelácia 58 °C 30s, polymerizácia 72 °C 45s), záverečná polymerizácia 72 °C 8 minút. PCR produkty sme analyzovali elektroforézou v 1% géli.

Pri metóde PCR-RFLP 25 µl reakčná zmes pozostávala z 1x koncentrovaného reakčného La Pufu, príslušného dNTP mixu, 10 pmol primerov, 5U TaKaRa La Taq HS polymerázy, 2 µl templátovej DNA a vody. Použitý teplotný profil: počiatočná denaturácia 94 °C 1 minúta, 30 cyklov (denaturácia 98 °C 10s, anelácia 68 °C 1 minúta, polymerizácia 68 °C 15 minút), záverečná polymerizácia 72 °C 10 minút. PCR produkty sme analyzovali elektroforézou v 1% géli.

Získané produkty sme štiepili **enzýmom MboII**: k 10 µl prečisteného PCR produktu sme pridali 2 µl 10x koncentrovaného Fast Digest tlmivého roztoku, 1 µl enzýmu a doplnili vodou do objemu 20 µl. Zmes sme inkubovali 10 minút pri teplote 37 °C a následne inaktivovali enzým pri teplote 65 °C po dobu 10 minút. Výsledok štiepenia sme analyzovali elektroforézou v 1,5 % géli.

Tab. 1 Primery použité v práci

pCS-O1F	CAC GTT CGC CCT GCA AAA AT	341 bp
pCS-O1R	GCA AGC GGC CAG ACT GGA TA	
pCS-O2F	TCC TGC ATT TGT GGA TTT TGC	329 bp
pCS-O2R	AAC GCA TTG CGC TTG AGA AA	
pCT-O1F	AGGGGCACGGCTTAGTTCTGGG	323 bp
pCT-O1R	CCCGCTTGCCCTTCACCTAAC	
pCT-O2F	TTTCTTGTTATTGCCTGTGT	438 bp
pCT-O2R	AACAAAATCAGCGAGACTAA	
wl-10324	GCACTGGTAGCTATTGAGCCAGGGCGGTAGCAT	12 000-15 000 bp
wl-2211	ACTGCCATACCGACGACCCGATCTGTTGCTTGG	12 000-15 000 bp

Výsledky a diskusia:

Izolácia bakteriofágov a stanovenie ich hostiteľskej špecificity

Cieľom práce bolo charakterizovať nové bakteriofágy špecifické pre kmene *Cronobacter* spp. Z odpadovej vody sme kultiváciou na indikátorových kmeňoch zaradených k rôznym druhom *Cronobacter* izolovali tri nové bakteriofágy: Dev-CS-11, Dev-CM-15 a Dev-CT-26 (Tab. 2). Súbor sme doplnili dvomi fágmi Dev-CM-3-1 a Dev-CM-3-4 izolovanými v predchádzajúcom období [10].

Tab. 2 Charakteristika fágov použitých v práci

Fág	Indikátorový kmeň	Zdroj
Dev-CS-11	<i>C. sakazakii</i> 110907/09	ČOV Devínska Nová Ves
Dev-CM-15	<i>C. malonaticus</i> 150507/70	ČOV Devínska Nová Ves
Dev-CT-26	<i>C. turicensis</i> 260808/05	ČOV Devínska Nová Ves
Pet-CM-3-1	<i>C. malonaticus</i> 161007/29	ČOV Petržalka
Pet-CM-3-4	<i>C. malonaticus</i> 121206/29	ČOV Petržalka

Hostiteľskú špecificitu týchto fágov sme stanovili na paneli 50 kmeňov *Cronobacter*, 17 kmeňov iných enterobaktérií. Zistili sme, že uvedené bakteriofágy sú schopné infikovať 6 - 39 kmeňov *Cronobacter*. Fágy neinfikovali žiadny z 15 testovaných kmeňov *Salmonella*, ale fág Pet-CM-3-4 lyzoval použitý kmeň *E. coli* a tri fágy lyzovali kmeň *E. cloacae* (Obr. 1). Najširšiu hostiteľskú špecificitu mal bakteriofág Pet-CM-3-4. Naproti tomu fág Pet-CM-3-1, ktorý bol izolovaný z rovnakého zásobného roztoku ako fág Pet-CM-3-4, bol schopný infikovať podstatne menšie množstvo kmeňov. Bakteriofágy Dev-CS-11, Dev-CM-15 a Dev-CT-26 boli izolované z rovnakej vzorky odpadovej vody. Tieto fágy infikovali 15, 25 a 17 testovaných kmeňov. Zistili sme, že k týmto fágom boli citlivé prevažne kmene zaradené k druhom *C. dublinensis*, *C. malonaticus* a *C. turicensis*. Kmene *C. sakazakii*, ktoré majú najčastejší výskyt v prostredí, boli z väčšej časti k fágom Dev-CS-11, Dev-CM-15 a Dev-CT-26 rezistentné (Obr. 1).

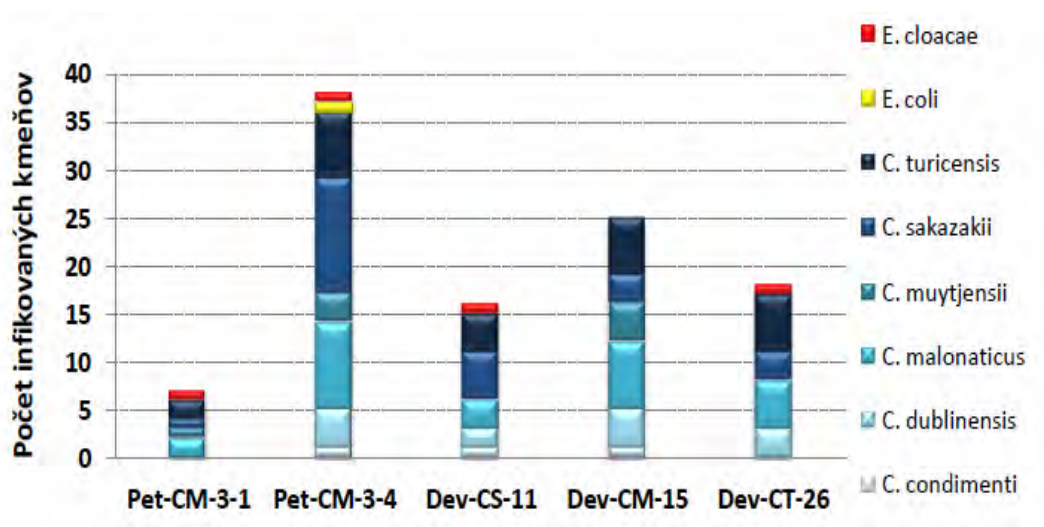
V práci sme izolovali a charakterizovali fágovú DNA. Metódou PCR sa nám podarilo získať pozitívny signál pre konzervovanú oblasť kapsidového génu T4-podobných fágov u Pet-CM-3-1 a Pet-CM-3-4. DNA sekvencia PCR produktu mala najvyššiu podobnosť s enterofágom CC31. DNA bakteriofágov Dev-CS-11, Dev-CM-15 a Dev-CT-26 sme štiepili restričnou endonukleázou a klonovali do plazmidového vektora. Na základe sekvencie náhodných úsekov fágovej DNA sme zistili, že fágy Dev-CS-11 a Dev-CM-15 sú blízko príbuzné ku kronobakterovým fágom ENT47670 a ES2, sekvenované fragmenty fága Dev-CT-26 mali len nízku príbuznosť k známym fágovým sekvenciám.

PCR sérotypizácia kmeňov *Cronobacter*

V práci sme stanovili typ O-antigénu LPS hostiteľských kmeňov *Cronobacter* na základe detekcie génov kódujúcich syntézu O-antigénu podľa práce Jarvis a kol. [8]. Pomocou génovo špecifických primerov sme určili prítomnosť štyroch sérotypov. Najčastejší výskyt mal sérotyp CS:O1, ktorý bol prítomný u 12 kmeňov zaradeným k druhom *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. univerzalis* a *C. condimentii*. Sérotyp CS:O2 bol prítomný

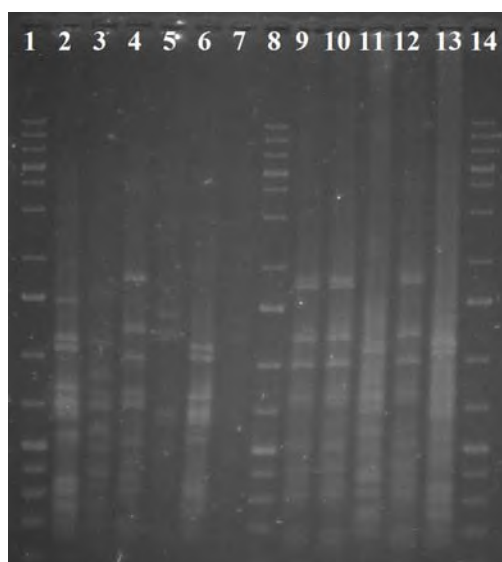
u ôsmich kmeňov *C. sakazakii*, sérotyp CT:O1 sme zistili u dvoch kmeňov druhu *C. turicensis* a sérotyp CT:O2 nebol v našom súbore kmeňov prítomný.

V prípade 28 kmeňov sme nezískali pozitívny signál so žiadnymi testovanými sérotyp špecifickými primermi. Preto sme kmene analyzovali metódou PCR-RFLP sérotypizácie [9]. Využili sme primery komplementárne k okrajom O-antigénového klastra génov, získali produkt sme s veľkosťou 12-15 kbp. Variabilitu fragmentov sme testovali štiepením enzýmom MboII (Obr. 2). Zistili sme, že získané výsledky zaradenia kmeňov k sérotypom sa zhodovali s výsledkami PCR serotypizácie.



Obr. 1 Hostiteľská špecificita bakteriofágov

Bolo použitých 50 kmeňov rodu *Cronobacter* a po jednom kmeni *E. coli* a *E. cloacae*



Obr. 2 PCR-RFLP sérotypizácia kmeňov *C. sakazakii*

Dráhy: 1.Ladder, 2. 040407/76 (CS:O1), 3. 061107/08 (-), 4. 110907/09 (CS:O2), 5. 121206/24 (-), 6. 130808/31 (CS:O1), 7. 140807/15 (-), 8. Ladder, 9. 150507/78 (CS:O2), 10. 170407/07 (CS:O2), 11. 201206/22 (-), 12. 210807/15 (CS:O2), 13. 240107/09 (CS:O1), 14. Ladder

Pri porovnaní hostiteľskej špecificity bakteriofágov so sérotypom kmeňov, sme zistili, že bakteriofág Dev2, ktorý bol izolovaný na našom pracovisku v predchádzajúcom období, bo špecifický pre dva kmene *C. turicensis* zaradené k sérotypu CT:O2, a je možné predpokladať, že O-antigén je receptorom tohto fága. U ostatných testovaných fágov sme nezistili žiadnu preferenciu v hostiteľskej špecificite pre niektorý sérotyp.

Záver

V práci sa nám podarilo izolovať nové bakteriofágy: Dev-CS-11, Dev-CM-15 a Dev-CT-26, špecifické pre kmene *Cronobacter*. Zistili sme, že najširšiu hostiteľskú špecificitu má bakteriofág Pet-CM-3-3 izolovaný v predchádzajúcom období. Nepozorovali sme závislosť hostiteľskej špecificity bakteriofágov od sérotypu kmeňov.

Pod'akovanie

Práca bola financovaná z grantu APVV-0098-10.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Caubilla - Barron J., Hurrell E., Townsend S., et al. (2007) J. Clin. Microbiol. 45, p. 3979
- [2] Kim J. B., Kang S. H., Park Y. B., et al. (2011) J. Microbiol. Biotechnol. 21 (5), p. 509
- [3] Iversen C., Forsythe S. (2003) Trends Food Sci. Technol. 14, p. 443
- [4] Nazarowec - White M., Ferber J. M. (1997) Int. J. Food Microbiol. 34, p. 103
- [5] Forsythe S. J. (2005) Matern Child Nutr. 1(1), p. 44
- [6] Lee Y. D., Chang H. I., Park H. J. (2011) Arch. Virol. 156(11), p. 461
- [7] Mullane N., Gaora P. O., Nally J. E., et al. (2008) Appl. Environ. Microbiol. 74(12), p. 3783
- [8] Jarvis K. G., Grim C. J., Franco A. A., et al. (2011) Appl. Environ. Microbiol. 77(12), p. 4017
- [9] Sun Y., Arbatsky N. P., Wang M., et al. (2012) FEMS Immunol. Med. Microbiol., p. 1
- [10] Chovanová R. (2012) Izolácia a charakterizácia bakteriofágov vhodných na elimináciu kmeňov *Cronobacter spp.* (Diplomová práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p.1

Vybrané populačné charakteristiky *Microtus oeconomus mehelyi* (Éhik, 1928) a jeho postavenie v synúziách

Katarína Hollá, Veronika Hulejová Sládkovičová, Peter Miklós, Dávid Žiak

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra zoológie, Mlynská dolina B2, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika; kholla56@gmail.com

Abstrakt

The aim of this study was to investigate specific demographic characteristics of root vole's populations (*Microtus oeconomus mehelyi*, Éhik 1928) and to explore abundance of root voles in communities of small mammals. In 2012 we studied population of root vole in two different locations. Trapping sequences last for 4 nights, three times a year. We captured 677 individuals (316 ♀♀, 361 ♂♂) of root vole together with other 11 species of small mammals. We have detected a possible influence of expanding species *Apodemus agrarius* on population of root vole.

Kľúčové slová: *Microtus oeconomus mehelyi*; Žitný ostrov; denzita; synúzie; kvadrátová metóda

Úvod

Microtus oeconomus (Pallas, 1776) je jediný holarkticky rozšírený druh z rodu *Microtus* [1]. Jeho hlavné rozšírenie v Európe prebieha severnou Fenoškandináviou, a od severovýchodného Nemecka na západe cez Poľsko, Bielorusko do centrálneho európskeho Ruska, pričom izolované reliktné populácie sa vyskytujú v Holandsku, južnom Nórsku, v centrálnom Švédsku, na baltickom pobreží Fínska a Rakúsku, Slovensku aj v Maďarsku [2]. Napriek jeho rozsiahlemu výskytu je považovaný za monofyletický druh [1]. V rámci jeho areálu sa vyskytuje 30 platných poddruhov [3] (Shenbrot & Krasnov 2005).

Hraboš severský panónsky (*Microtus oeconomus mehelyi*) predstavuje na území Panónskej nížiny reliktný glaciálnej fauny. Súčasný areál tohto endemického poddruhu v Európe je obmedzený na reliktné populácie v okolí Blatenského a Neziderského jazera, na oblasť Szigetköz a juhozápadného Slovenska [4] [5]. Keďže preferuje nížinné mokradné biotopy so špecifickou flórou, jeho populácie v sú vplyvom poľnohospodárskej činnosti výrazne izolované [6] [7] [8]. V súčasnosti patrí hraboš severský panónsky medzi prísne chránené taxóny, je zahrnutý v Bernskej konvencii, príloha III a v Smernici o biotopoch 92/43/EHS, prílohy 2 a 4.

Naším cieľom bolo zistiť vybrané charakteristiky populačnej dynamiky a postavenie druhu v synúziách drobných zemných cicavcov na lokalitách kde sa v súčasnosti *M. o. mehelyi* vyskytuje.

Materiál a metódy

Výskum prebiehal v roku 2012 na 2 lokalitách Čiližská Radvaň a Veľké Kosihy. Na každej boli umiestnené 2 výskumné plochy, na ktorých prebiehal odchyt kvadrátovou metódou. Každá výskumná plocha mala rozmer 50 x 50 m, počet pascí na kvadráte bol 11 x 11, spolu 121 pascí vo vzájomnej vzdialenosti 5 m. Na odchyt boli použité živolovné pasce typu Chmela. Ako návnada slúžili ovsené vločky a mrkva. Pasce boli na odchytočných plochách exponované 4 noci. Kontrola pascí prebiehala ráno a večer, počas letnej série prebiehajúcej aj napoludnie. Aby sme zachytili celoročný trend série boli robené v troch sériách.

Tab. 1 Dátumy odchytočných sérií v roku 2012

Lokalita/séria	Jarná séria	Letná séria	Jesenná séria
Čiližská Radvaň	20. – 24. 4. 2012	10. – 14. 7. 2012	25. – 29. 9. 2012
Veľké Kosihy	8. – 12. 5. 2012	25. – 29. 7. 2012	9. – 13. 10. 2012

U odchytených jedincov sme zisťovali základné charakteristiky: druh, číslo jedinca v prípade spätného odchyty, pohlavie, pohlavnú aktivitu, dĺžku tela (LC), dĺžku chodidla zadnej nohy (Ltp), dĺžka chvosta (LcD) a hmotnosť. Počas všetkých sérií bola využitá metóda CMR (capture – mark – recapture), tj. metóda umožňujúca zistenie veľkosti populácie. Pri každom odchyte sme zapisovali aj „číslo pasce“, teda súradnice odchytočného bodu v mriežke odchytočných bodov 11 x 11.

Výsledky a diskusia

Počas roku 2012 sme odchytili celkovo 677 jedincov *M. o. mehelyi*, (316 ♀♀, 361 ♂♂). Spolu s *M. o. mehelyi* sme odchytovali aj iné druhy drobných zemných cicavcov: *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771), *Apodemus flavicolis* (Melchior, 1834), *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758), *Crocidura suaveolens* (Pallas, 1811), *Crocidura leucodon* (Hermann, 1780), *Micromys minutus* (Pallas, 1771), *Myodes glareolus* (Schreber, 1780), *Microtus arvalis* (Pallas, 1778), *Sorex minutus* Linnaeus, 1766, *Sorex araneus* Linnaeus, 1758 a *Mus domesticus* Linnaeus, 1758. Okrem drobných zemných cicavcov sme odchytili aj *Mustela nivalis* Linnaeus, 1766 na oboch lokalitách, Veľké Kosihy kvadrát A a Čiližská Radvaň kvadrát A. Počty odchytočných jednotlivých druhov zobrazuje **Tab. 2**.

Tab. 2. Počet odchytoz jednotlivých druhov na lokalitách počas jasnej, letnej a jesennej sezóny roku 2012

Séria	jarná				letná				Jesenná			
Lokalita	Čiližská Radvaň		Veľké Kosihy		Čiližská Radvaň		Veľké Kosihy		Čiližská Radvaň		Veľké Kosihy	
Kvadrát	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
<i>M. o. mehelyi</i>	115	22	49	28	50	105	28	45	31	84	60	67
<i>A. flavicolis</i>	3	-	-	-	1	-	-	-	6	-	-	-
<i>A. agrarius</i>	30	-	6	15	7	2	4	3	63	14	12	25
<i>A. sylvaticus</i>	2	-	-	-	2	1	-	1	21	-	3	1
<i>C. leucodon</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	1	1	-	-
<i>C. suaveolens</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>M. arvalis</i>	-	-	-	-	3	-	1	-	7	3	-	-
<i>M. glareolus</i>	8	-	-	-	5	-	-	-	12	-	-	-
<i>M. minutus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	6	1	4	-
<i>S. araneus</i>	3	4	8	20	25	11	28	36	21	16	28	40
<i>S. minutus</i>	1	1	-	-	1	3	-	1	5	4	5	10
<i>M. domesticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-

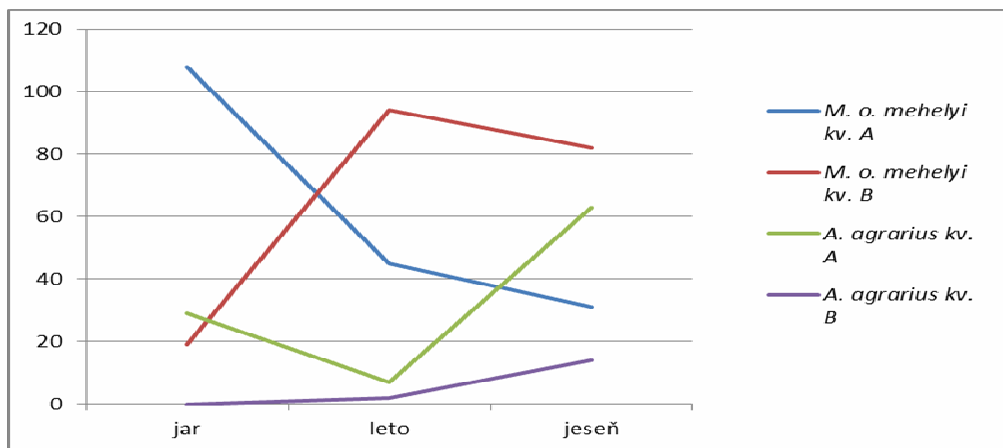
Najvyšší počet jedincov *M. o. mehelyi* bol odchytený počas jarnej série na kvadráte A v Čiližskej Radvani (115 ks). Počas letnej a jesennej série sme zaznamenali značný pokles odchytených jedincov. Na kvadráte B mal počet odchytených jedincov rastúcu tendenciu. Rastúcu tendenciu mala aj populácia na lokalite Veľké Kosihy na kvadráte B. Na kvadráte A sme zaznamenali pokles odchytených jedincov počas letnej série a zvýšenie počtu odchytených počas jesennej série.

Na oboch skúmaných lokalitách sa *M. o. mehelyi* vyskytoval počas celého roka. Najvyššiu druhovú diverzitu sme zaznamenali v Čiližskej Radvani, kvadrát A, kde počas jesennej série bolo celkovo zastúpených 11 druhov drobných zemných cicavcov. Nižšiu druhovú diverzitu sme zaznamenali na kvadráte B počas jarnej série (len 3 druhy, z toho dva z čeľade *Soricidae*).

Vo Veľkých Kosihách sme zaznamenali nižšiu druhovú diverzitu, ktorá sa však tiež zvyšovala v letnej a jesennej sérii. *Microtus oeconomus mehelyi* výrazne dominoval len na jar (lokalita Veľké Kosihy, kvadrát A), kde tvoril 77 % všetkých druhov, v lete jeho dominancia klesala a na jeseň mierne stúpala.

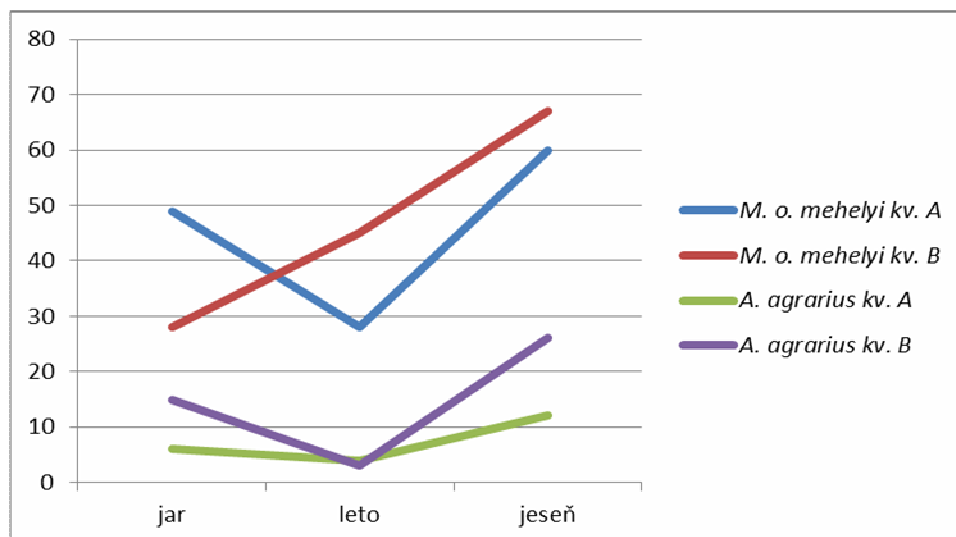
Na oboch lokalitách sme pozorovali pokles percentuálneho zastúpenia *M. o. mehelyi* v synúziách. Najmarkantnejší bol v Čiližskej Radvani na kvadráte A, kde počas jarnej a letnej

série na lokalite dominoval *M. o. mehelyi*. Počas jarnej série tvoril až 71,5 % všetkých druhov. Počas letnej série jeho percentuálne zastúpenie kleslo na 43,7% a na jeseň tvoril len 21,9 %. Presne opačný trend však vykazoval *A. agrarius*. Z pôvodne 19,2 % zastúpenia na jar sa zvýšilo jeho percentuálne zastúpenie na jeseň na 44,681 %. **Obr. 1.**



Obr. 1. Počty odchytovej *M. o. mehelyi* a *A. agrarius* na lokalite Čiližská Radvaň

Zvyšujúce sa percentuálne zastúpenie *A. agrarius* sme pozorovali aj na lokalite Veľké Kosihy na kvadráte A, aj keď pokles percentuálneho zastúpenia *M. o. mehelyi* (z 77,7% na 55,5%) a nárast percentuálneho zastúpenia *A. agrarius* (z 9,5% na 11,1%) nebol tak výrazný **Obr. 2.**



Obr. 2. Počty odchytovej *M. o. mehelyi* a *A. agrarius* na lokalite Veľké Kosihy

Odchyty z roku 2012 môžu naznačovať, že *M. o. mehelyi* môže byť vytláčaný

z vhodných biotopov rozširujúcimi sa druhmi.

Pomer pohlaví sa na väčšine lokalít nepribližoval teoretickému pomeru 1:1. Najvyrovnanjší pomer pohlaví bol na lokalite Čiližská Radvaň počas jesennej série. Najvyrovnanjší pomer pohlavne aktívnych jedincov bol 0,98, ktorý sme zaznamenalo v Čiližskej Radvani na kvadráte A počas jarnej série.

Populácie jednotlivých druhov *Muridae* sa vyznačujú približne rovnakým pomerom samcov a samíc [9]. Avšak zastúpenie samcov a samíc v odchytoch sa počas roka mení [9]. Počas jarnej série v Čiližskej Radvani bol pomer pohlaví posunutý mierne v prospech samíc, počas letnej série klesol v prospech samcov a na jeseň sa opäť zvýšil. Na lokalite Veľké Kosihy v odchytoch prevládali poväčšine samce. V odchytoch prevažovali samice len na kvadráte B počas letnej série. Rovnaký trend - zvýšené zastúpenie samíc v odchytoch - zaznamenal vo svojej práci aj Kratochvíl & Rosický [9]. Na základe odchytoch uvádzajú, že v prezimujúcej populácii *M. o. mehelyi* je prevaha samcov v pomere 3 : 1, v lete sa pomer samcov a samíc vyrovná a naopak na jeseň dôjde k úhynu najskôr starých samíc, čo zdvihne pomer pohlaví s prospech samcov a následný masívny úhyn samcov zmení pomer na 2 : 1 v prospech samíc [9].

Tab. 3 Počet jedincov a sexilita *M. o. mehelyi* na dvoch lokalitách

séria	Lokalita	kvadrát	Počet jedincov			Pomer ♀♀/♂♂
			♀♀	♂♂	spolu	
Jarná	Čiližská Radvaň	A	58	52	115	1,12
		B	15	7	22	2,14
	Veľké Kosihy	A	20	29	49	0,69
		B	10	18	28	0,56
Letná	Čiližská Radvaň	A	22	28	50	0,79
		B	50	55	105	0,91
	Veľké Kosihy	A	10	18	18	0,56
		B	24	21	45	1,14
Jesenná	Čiližská Radvaň	A	15	15	31	1
		B	47	37	84	1,27
	Veľké Kosihy	A	19	41	60	0,46
		B	26	40	67	0,65

Záver

V roku 2012 sme na dvoch výskumných lokalitách odchytili 677 jedincov *M. o. mehelyi*. Naším cieľom bolo zistiť vybrané populačné parametre a postavenie *M. o. mehelyi* v rámci cenóz.

V skúmané populáciách *M. o. mehelyi* sme počas roka 2012 pozorovali výrazne zmeny abundancie poddruhu, zmeny pomeru odchytávaných samcov a samíc a na lokalite Čiližská Radvaň kvadrát A výrazný pokles percentuálneho zastúpenia *M. o. mehelyi* v synúzii drobných zemných cicavcov.

Pod'akovanie

Táto práca vznikla v rámci projektom: LIFE 08/NAT/SK/000239 a UK/606/2012.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Brunhoff C., Galbreath K .E., Fedorov V. B., et al. (2003) Molecular ecology 12, p. 957
- [2] The atlas of European mammals (1999) Academic press, London
- [3] An atlas of distribution of the Arvicoline Rodents of the world (Rodentia, Muridae: Arvicolinae) (2005) Pensoft, Moscow
- [4] Bauer K. (1953) Zoollogische Jahrbücher 82, p. 70
- [5] Rácz G. R., Gubányi A., Vozár Á. (2005) Acta Zoologica Scientiarum Hungaricae 51, p. 39
- [6] Pachinger K. (1994) Výskum a ochrana cicavcov na Slovensku 37, p. 37
- [7] Krištofík J. (1999) Folia zoologica 48, p. 173
- [8] Ambros M. (2010) Hodnotenie krajiny na príklade prítomnosti hraboša severského panónskeho (*Microtus oeconomus méhelyi*). (Dizertačná práca) Ústav krajinnej ekológie SAV, Nitra, p. 107
- [9] Kratochvíl J., Rosický B. (1955) Práce brněnské základny Československé akademie věd 27, p. 33

Príprava klonov *Pichia pastoris* schopných produkovať ľudský rastový hormón

Diana Hopková, Kristína Jiríčková, Lucia Bocánová, Zuzana Zvadová, Ján Krahulec,
Stanislav Stuchlík, Ján Turňa

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie,
Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; hopkova@fns.uniba.sk

Abstrakt

Methylotrophic yeast *Pichia pastoris* is a popular host for heterologous expression, because of its ability to grow to high cell densities and its strong promoters capable of production of high amounts of recombinant protein. We have decided to use both of them, in order to analyze their differences in the recombinant human growth hormone (hGH) production yields. The result of our work is a strain of *P. pastoris* with integration of hGH gene into its genome under both inducible and constitutive promoter along with plain vectors integration for further expression analyses.

Kľúčové slová: ľudský rastový hormón; *Pichia pastoris*; PCR, integrácia do genómu

Úvod a formulácia cieľa

Ľudský rastový hormón (hGH) je polypeptid vylučovaný ľudskou hypofýzou, v ktorej sa tento proteín tvorí aj skladuje. Jeho uvoľňovanie do ľudského organizmu sa počas dňa deje pulzatívne a to obvykle v dávke 0,5 – 0,875 mg [1]. Sekrécia hormónu je regulovaná komplexným neuroendokrinným kontrolným systémom. hGH zohráva úlohu v raste a metabolizme a taktiež zvyšuje absorpciu aminokyselín a syntézu proteínov vo svaloch a iných tkanivách [2]. S rastovým hormónom súvisia viaceré ochorenia. Tie sa dajú rozdeliť do dvoch skupín: okruh ochorení charakteristický nedostatočnou produkciou hGH v tele a skupina ochorení vyznačujúcich sa neadekvátnou odozvou na dávku hypofyzárneho hGH, ktorá je rovnaká s tou u zdravých ľudí. V oboch prípadoch je pacientom na dennej báze injekčne podávaná dávka hGH. Posledným medicínskym využitím rastového hormónu je jeho podávanie pacientom trpiacim syndrómom krátkeho čreva a pacientom so závažným úbytkom telesnej hmotnosti spôsobeným ochorením AIDS [3]. hGH sa skladá zo 191 aminokyselín a jeho terciálna štruktúra je tvorená 4 α -hélixami. Výsledná molekula je stabilizovaná dvoma disulfidickými väzbami [4]. Proteín bol produkovaný vo viacerých hostiteľoch ako *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* či v rekombinantných kmeňoch *Pseudomonas sp.* [5-8]. V roku 2000 bola publikovaná práca od Ecamilla-Treviño *et al.*, kde bola ako hostiteľ prvýkrát zvolená metylotrofná kvasinka *Pichia pastoris* [9]. Nasledovali aj ďalšie publikácie od rôznych výskumných tímov [10-13], na prácu ktorých by sme radi nadviazali aj my nespúšťajúc zo zreteľa prínos nových vylepšení produkčných procesov.

Ako už bolo skôr publikované na Biochemickom zjazde v Brne [14], navrhli a pripravili sme si konštrukt DNA vhodný pre produkčné prostredie *P. pastoris*. Ako cieľ predkladanej práce sme si stanovili úspešne vnieť gén pre rastový hormón do genómu metylotrofnej kvasinky a to pod dva rozdielne promótoary, promótor konštitutívny pre glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (P_{GAP}) a pod promótor indukibilný pre alkohol oxidázu 1 (P_{AOX1}).

Materiál a metódy

Použité kvasinkové kmene: Kvasinkové kmene *Pichie pastoris* použité v práci sú uvedené v Tab. 1.

Tab. 1 V tabuľke sú uvedené použité hostiteľské kmene *P. pastoris*.

hostiteľský kmeň <i>P. pastoris</i>	genotyp	zdroj
MC 100-3 HIS4	<i>aox1Δ::SARG4 aox2Δ::Phis4 arg4</i>	[15]

Plazmidy: Vektory použité na integráciu do genómu *P. pastoris* je uvedený v Tab. 2.

Tab. 2 V tabuľke sú uvedené použité plazmidy.

plazmid	genotyp	zdroj
pPICZαC	pUC ori, <i>Sh ble</i> (Zeo ^R), P_{AOX1} , α-faktor	Invitrogen
pGAPZαC	pUC ori, <i>Sh ble</i> (Zeo ^R), P_{GAP} , α-faktor	Invitrogen
pPICZαC-hGH	pPICZαC, ľudský rastový hormón	[14]
pGAPZαC-hGH	pGAPZαC, ľudský rastový hormón	[14]

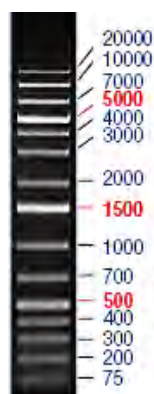
Linearizácia plazmidov: Na linearizáciu plazmidov pPICZαC a pPICZαC-hGH bol použitý enzým Sac I (Fermentas) a na pGAPZαC a pGAPZαC-hGH enzým BspHI (NewEngland Biolabs®).

Elektroporácia: Pri elektroporácii sme použili 5-10 μg linearizovaného plazmidu. Použité parametre elektroporácie na prístroji Bio-Rad Gene Pulser™ boli: rezistencia 600Ω; napätie 1,5 kV; kapacitancia 125 μFD a 25 μFD. Po porácii sme k bunkám pridali 500 μl 1 mol/l sorbitolu a bunky boli ďalej kultivované 1,5 hod pri 28°C. Následne sme bunky vysiali na misky s tuhou YPD pôdou, kde pri teplote 28°C rástli 3 – 5 dní.

Kultivácia: kultivácia bola uskutočňovaná pri teplote 28°C, 18 hod v YPD médiu (1% (w/V) kvasničný enzymatický hydrolyzát, 2% (w/V) peptón, 2% (w/V) glukóza).

Izolácia chromozomálnej DNA z *P. pastoris*: Chromozomálnu DNA sme izolovali pomocou enzýmu zymolyáza (Seikagaku Biobusiness) podľa protokolu uvedenom v Invitrogen User Manual [16].

Elektroforetická separácia molekúl: 1% (w/V) agarózový gél, pri napätí 5V/cm, používali sme „ladder“ SM1331 od firmy Fermentas.



Obr. 1 Obrázok „ladder-u“ použitého vo výsledkoch. GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas).

Polymerázová reťazová reakcia: PCR reakciu sme vykonávali na prístroji Peqlab Cyclone 25. Použitý cyklus je uvedený v Tab. 3.

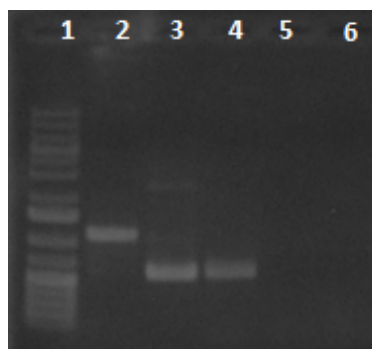
Tab. 3 Teplotný program pre PCR na chromozomálnu DNA.

	teplota	čas	počet cyklov
počiatočná denaturácia	95°C	2 min	1x
denaturácia	95°C	20 sek	35x
anelácia	52°C	30 sek	
polymerizácia	72°C	1min	
finálna polymerizácia	72°C	7min	1x

Výsledky a diskusia

Integrácia vektoru pPICZ α C:

V prípade integrácie vektoru pPICZ α C do genómu sa po PCR reakcii objaví band o veľkosti 593 bp.

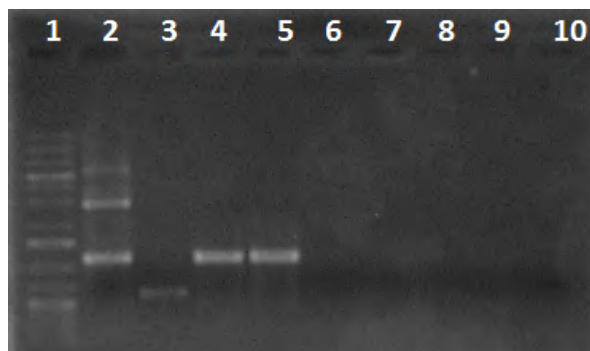


Obr. 2 Elektroforéza v agarózovom géli. 1 – „ladder“; 2 – pozitívna kontrola na konštrukt pPICZ α C-hGH; 3 – pozitívna kontrola na vektor pPICZ α C; 4 – 6 PCR na genómovú DNA troch rôznych klonov.

Z Obr. 2 vyplýva, že z troch sledovaných klonov sa nám podarilo pripraviť jedného integranta (dráha 4).

Integrácia konštrukt pPICZ α C-hGH:

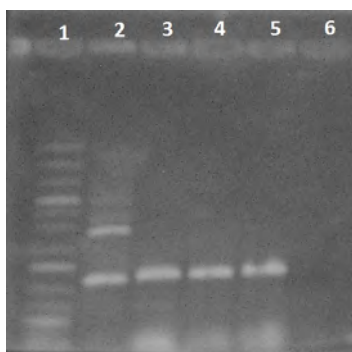
V prípade integrácie konštrukt pPICZ α C-hGH do genómu sa po PCR reakcii objaví band o veľkosti 1 219 bp.



Obr. 3 Elektroforéza v agarózovom géli po PCR reakcii. 1 – „ladder“; 2 – pozitívna kontrola na plazmid pPIZCaC-hGH; 3 – negatívna kontrola bez prítomnosti DNA; 4 – 10 vzorky chromozomálnej DNA rôznych klonov po amplifikácii DNA.



Obr. 4 Elektroforéza v agarózovom géli po PCR reakcii. 1 – „ladder“; 2 - pozitívna kontrola na plazmid pPIZCaC-hGH; 3 – 14 vzorky chromozomálnej DNA rôznych klonov po PCR reakcii.



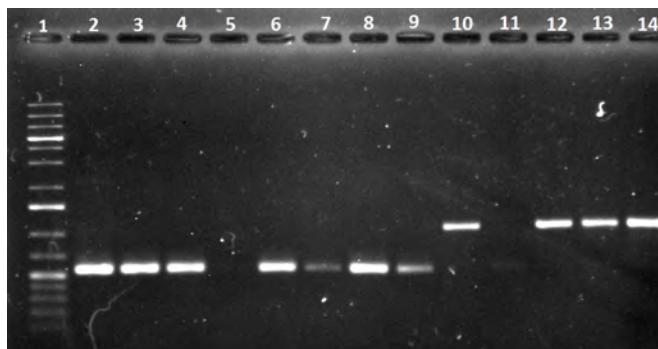
Obr. 5 Elektroforéza v agarózovom géli po PCR reakcii. 1 – „ladder“; 2 - pozitívna kontrola na plazmid pPIZCaC-hGH; 3 – 6 vzorky chromozomálnej DNA rôznych klonov po PCR amplifikácii.

Na Obr. 3, Obr. 4 a Obr. 5 v dráhe 2, ktorá zodpovedá pozitívnej kontrole vidieť nielen band DNA naamplifikovanej počas PCR, ale aj bandy prislúchajúce rôznym formám plazmidu, ktorý sa na pozitívnu kontrolu používal. Z výsledku usudzujeme, že sme do reakcie pridali veľké množstvo templátovej DNA. V tretej dráhe na Obr. 3 je viditeľný band aj napriek tomu, že sme do negatívnej kontroly nepridali žiadnu DNA. Je teda vysoko pravdepodobné, že sme si do tejto reakcie zanesli kontamináciu. Zo sledovaných 23 klonov osem obsahovalo požadovanú integráciu.

Integrácia vektoru pGAPZαC a konštruktu pGAPZαC-hGH:

V prípade integrácie vektoru pGAPZαC do genómu sa po PCR reakcii objaví band

o veľkosti 560 bp. Vo fúzii s naším génom bude výsledná DNA po PCR veľkosti 1 166bp.



Obr. 6 Elektroforéza v agarózovom géli po PCR reakcii. 1 – „ladder“; 2 - pozitívna kontrola na plazmid pGAPZ α C; 3 – 9 – PCR na genómovú DNA, kde sa očakáva integrácia čisto vektoru pGAPZ α C; 10 – 14 – PCR na genómovú DNA, kde sa očakáva integrácia konštruktú pGAPZ α C-hGH.

Pri hľadaní klonov *P. pastoris* s integrovaným vektorom sme oskrínovali sedem klonov, z ktorých, ako je vidieť na Obr. 6, šesť je pozitívnych (dráhy 2,3 a 6 – 9). Na integráciu konštruktú pGAPZ α C-hGH bolo skrínovaných päť klonov, z ktorých štyri sú pozitívne na prítomnosť integrovaného hGH pod P_{GAP} (dráhy 10, 12 – 14).

Záver

Pomocou polymerázovej reťazovej reakcie sme hľadali klony s integráciou nami sledovaných plazmidov. V prípade vektoru pPICZ α C bol pozitívny jeden klon, u pGAPZ α C klonov šesť. Získali sme osem klonov s hGH integrovaným do genómu pod inducibilným promótorom a štyri klony s hGH pod promótorom konštitutívnym.

Pri ďalšej práci na projekte budeme pracovať s jedným integrantom s vektorom pPICZ α C a s jedným s pGAPZ α C. Zatiaľ čo v prípade integrantov s konštruktami pPICZ α C-hGH a pGAPZ α C-hGH budú tieto všetky podrobené ďalším analýzám, aby sme určili klony s najvyšším potenciálom vysokej produkcie hGH.

Pod'akovanie

Príspevok je výsledkom realizácie projektu: “Príprava biologicky aktívnych látok na báze rekombinantných proteínov (BIOREKPROT, ITMS 26240220048)” na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Surya S., Symons K., Rothman E., et al. (2006) *Pituitary*. 9, p. 121
- [2] Ogle T.F. a Costoff A. (2007) *Endocrinology*, In: Nosek T.M. (eds.) *Essentials of Human Physiology*, Medical College of Georgia, Georgia, USA.
- [3] Cázares-Delgado J., Ganem-Rondero A., Kalia Y.N. (2011) *Eur J Pharm Biopharm.* 78, p. 278
- [4] De Vos A.M., Ultsh M., Kossiakoff A.A. (1992) *Science*. 255, p. 306
- [5] Goeddel D.V., Heyneker H.L., Hozumi T., et al. (1979) *Nature*. 281(5732), p. 544
- [6] Gray G.L., McKeown K.S., Jones A.J.S., et al. (1984) *Biotechnol.* 2, p. 161
- [7] Tokunaga T., Iwai S., Gomi H., et al. (1985) *Gene*. 39(1), p. 117
- [8] Franchi E., Maisano F., Testori S.A., et al. (1991) *J Biotechnol.* 18(1-2), p. 41
- [9] Ecamilla-Treviño L.L., Viader-Salvadó J.M., Barrera-Saldaña H.A., et al. (2000) *Biotechnol Lett.* 22, p. 109
- [10] Eurwilaichitr L., Roytrakul S., Suprasongsin C., et al. (2002) *World J Microbiol Biotechnol.* 18, p. 493
- [11] Calik P., Orman M.A., Celik E., et al. (2008) *Biotechnol Prog.* 24, p. 221
- [12] Calik P., Inankur B., Soyaslan E.S., et al. (2009) *J Chem Technol Biotechnol.* 85, p. 226
- [13] Calik P., Bayraktar E., Inankur B., et al. (2010) *J Chem Technol Biotechnol.* 85(12), p. 1628
- [14] Dianovská, D., Levarski, Z., Krahulec, J., et al. (2012) XXIII. Biochemický zjazd, Sborník Přednášek a posterů, Brno, CZ, p. 119
- [15] Pepeliaev S., Krahulec J., Cerny Z., et al. (2011) *J Biotech.* 156(1), p. 67
- [16] Invitrogen™. (2010) EasySelect™ Pichia Expression Kit.

Hypotéza alternatívnych ontogenéz a invázneho potenciálu na príklade býčka čiernoústeho *Neogobius melanostomus* (Pallas 1814)

Kristína Hôrková

*Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra ekológie, Mlynská dolina, 842 15,
Bratislava, Slovensko; horkova@fns.uniba.sk*

Abstrakt

Previous studies focused on invasive fishes have revealed that these species have the capability to generate forms with different life-history traits in native and non-native populations. As a contribution to explain their invasion success, the theory of alternative ontogenies and invasive potential has been developed. The main aim of the present study was to test predictions derived from the hypothesis of alternative ontogenies, i.e. that females of the non-native population of round goby (from Slovakia) will have significantly higher fecundity than those of the native population (from Bulgaria). Two of the three quantitative parameters of fecundity examined in this study were found to be consistent with the predictions tested, one was biased by an environmental disturbance. Variations in reproductive parameters observed in non-native round goby demonstrate the species' phenotypic plasticity, which is an attribute that helps potential invaders to establish new populations in unknown environments.

Kľúčové slová: *invázie; reprodukčné stratégie; nedeterminovaná plodnosť*

Úvod a formulácia cieľa

Dlhodobá existencia života si vyžaduje, aby sa organizmy neprestajne prispôbovali zmenám prostredia. Jedným z riešení sú rozličné stratégie v reprodukcii [1, 2]. Vysokou mierou adaptability sa vyznačujú najmä úspešné invázne druhy, medzi ktoré patrí aj býček čiernoústý. Ten sa za niekoľko desaťročí expanzívne rozšíril z pontokaspickej oblasti pôvodného výskytu do Severnej Ameriky a 16 štátov Európy. Jeho najnovší výskyt v novej oblasti bol zaznamenaný vo Švajčiarsku v rieke Rýn [3]. Schopnosť prispôbiť sa novým podmienkam prostredia umožňuje býčkovi jeho potenciál vytvárať odlišné stratégie v pôvodných a nepôvodných populáciách [4-6]. V nestabilných a nepredvídateľných podmienkach vytvárajú druhy spravidla generalizované fenotypy, pričom produkujú veľké množstvo potomkov (nepôvodné populácie v novom prostredí). Naopak, v stabilných a priaznivých podmienkach, vrátane pôvodných populácií v natívnom prostredí bez častých disturbancií, vytvárajú druhy skôr špecializované fenotypy, ktoré sú charakteristické výrazne nižšou plodnosťou ako generalizované formy [7-10].

Jedným zo základných prvkov pri vyhodnocovaní reprodukčných stratégií populácií z pôvodných a nepôvodných oblastí je plodnosť. Metódy určovania plodnosti sa od seba výrazne líšia najmä v závislosti od typu plodnosti, ktorý je charakteristický pre každý druh. Pre býčka čiernoústeho je charakteristický nedeterminovaný typ plodnosti [11]. U rýb s

nedeterminovaným typom plodnosti nie je možné ešte pred začatím reprodukčnej sezóny stanoviť presný počet oocytov predurčených na neres. Je to preto, lebo nie je možné rozlíšiť medzi rezervnými, nezrelými oocytmi, ktoré zostanú v ováriu a budú súčasťou neresovej dávky v ďalšom roku a medzi tými, ktoré budú vyneresené v danom reprodukčnom období. Kedykoľvek v priebehu neresovej sezóny môže totiž určitá časť zo zásoby nezrelých oocytov dozrieť (vitelogenéza de novo) [12, 13].

Nedeterminovaný typ plodnosti vytvára priestor pre odlišné spôsoby vyhodnocovania. Napríklad, absolútna plodnosť môže byť vyhodnocovaná ako celkový počet oocytov nachádzajúcich sa v ováriách samíc [14, 15] alebo ako celkový počet vitelogénnych (zrelých) oocytov nachádzajúcich sa v ováriách samíc ešte pred prvým neresom [13, 16]. Zatiaľ najpresnejším spôsobom vyhodnocovania absolútnej plodnosti je rozdelenie absolútnej plodnosti na dve samostatné časti a vyhodnotenie každej časti osobitne (pozri materiál a metódy). Keďže viacerí autori používajú pre výpočet plodnosti rozdielne spôsoby (často bližšie nešpecifikované), môžu byť interpretácie výsledkov založené na porovnávaní s literárnymi údajmi zavádzajúce.

Preto prvým cieľom práce bolo vyhodnotiť plodnosť pôvodnej a nepôvodnej populácie býčka čiernoústeho rovnakou metódou. Druhým cieľom bolo vykonať čiastkový test hypotézy alternatívnych ontogénz a invázneho potenciálu sladkovodných rýb. Táto hypotéza vysvetľuje súvislosť medzi schopnosťou druhov vytvárať alternatívne ontogény (a modifikovať tak svoje reprodukčné stratégie) a ich invázny potenciálom [17]. Z testovanej hypotézy vyplýva predikcia, že nepôvodná populácia býčka čiernoústeho sa bude vyznačovať štatisticky preukázateľne vyššími hodnotami plodnosti ako pôvodná populácia.

Materiál a metódy

Jedince býčka čiernoústeho boli zbierané v Dunaji udicami a elektrickým agregátom. Materiál z natívnej populácie ($n = 166$ samíc) pochádzal z Bulharska (lokality Tutrakan, r. km 429 a Košava, r. km 810) a materiál z nepôvodnej populácie ($n = 415$ samíc) zo Slovenska (lokality Čunovská zdrž, r. km 1852 a Karloveské rameno, r. km 1872). Jedince býčka čiernoústeho boli zbierané od marca do októbra 2010, aby sa zachytili všetky obdobia reprodukčného cyklu. Materiál bol fixovaný 4% roztokom formaldehydu. Dĺžka tela samíc bola zmeraná posuvným meradlom. Hmotnosť tela pred a po pitve, ako aj hmotnosť gonád bola zistená pomocou váh KERN ABJ. Absolútna a relatívna plodnosť samíc bola vyhodnocovaná gravimetricky [18]. Absolútna plodnosť samíc bola vyhodnocovaná dvoma spôsobmi – ako celková absolútna plodnosť (CAP) a reálna absolútna plodnosť (RAP). CAP

bola vyhodnocovaná ako celkový počet oocytov prítomných v ováriách samíc v predneresovom a poneresovom období. RAP bola definovaná ako reálny počet oocytov vyneresených počas neresovej sezóny t.j. predneresového a neresového obdobia [11]. Ovária samíc z pôvodnej populácie neobsahovali oocyty väčšie ako 0,49 mm a ovária samíc z nepôvodnej populácie neobsahovali oocyty väčšie ako 0,59 mm počas poneresového obdobia. Z tohto dôvodu bola u pôvodnej populácie RAP definovaná ako počet oocytov väčších ako 0,49 mm, kým u nepôvodnej populácie ako počet oocytov väčších ako 0,59 mm prítomných v ováriách samíc počas predneresového a neresového obdobia. Analýzou veľkostnej distribúcie oocytov boli u každej samice zistené dve až tri neresové dávky za sezónu. RAP bola potom vypočítaná ako počet vyneresených ikier v jednotlivých mesiacoch pri predpokladaných dvoch a troch dávkach za sezónu:

$$RAP = p_o \times p_d \quad [I.]$$

kde p_o = počet oocytov väčších ako 0,49 mm alebo 0,59 mm a p_d = počet neresových dávok za sezónu. Relatívna plodnosť bola vypočítaná ako počet oocytov na 1 g hmotnosti tela samice bez vnútorností. Rozdiely v plodnosti medzi oboma populáciami boli vyhodnotené pomocou štatistických testov (F-test, Kolmogorov-Smirnov test, Mann-Whitneyho U-test, t-test).

Výsledky a diskusia

Samice z pôvodnej populácie (BG) mali dĺžku tela v rozpätí od 38 do 87 mm (priem. 64,08 mm) a samice z nepôvodnej populácie (SR) v rozpätí od 23 do 113 mm (priem. 63,88 mm). Hmotnosť tela samíc BG pred pitvou spadala do intervalu od 1,29 do 19,89 g (priem. 7,58 g) a samíc SR do intervalu od 0,75 to 45,18 g (priem. 8,35 g). Hmotnosť tela samíc BG po pitve bola v rozpätí od 1,10 do 15,51 g (priem. 6,44 g) a samíc SR v rozpätí od 0,66 do 40,13 g (priem. 7,11 g). Hmotnosť ovárií samíc BG bola v intervale od 0,003 do 2,402 g (priem. 0,39 g) a samíc SR v intervale od 0,001 do 3,194 g (priem. 0,33 g). V uvedených parametroch neboli medzi oboma populáciami žiadne štatisticky preukazné rozdiely (podľa poradia Mann-Whitney U-test: $U = 32729,50$ $Z = -0.915$ $P = 0.360$; $U = 33395,50$ $Z = 0,373$ $P = 0.709$; $U = 33365$ $Z = 0,390$ $P = 0,696$; $U = 31415$ $Z = -1.445$ $P = 0,148$).

Podľa hypotézy alternatívnych ontogenéz a invázneho potenciálu sladkovodných rýb mali mať samice SK štatisticky preukázateľne vyššie hodnoty plodnosti ako samice BG. Hodnoty RAP boli u samíc BG v rozpätí od 758 do 8818 oocytov (priem. 4792 oocytov) a u samíc SR v rozpätí od 860 do 13122 oocytov (priem. 4724 oocytov) (t-test: $t = 0.415$ d.f. = 283 $P = 0.678$). Výsledky RAP teda neboli v súlade s danou predikciou. Teória

alternatívnych ontogenéz predpokladá, že jedince z populácie vystavenej častým disturbanciam sa vyvíjajú ako generalizované formy, ktoré majú tendenciu k vyššej produkcii potomkov, a to nielen alokovaním dostupných zdrojov v reprodukcii namiesto somatického rastu [19], ale aj ich rozdelením medzi väčšie množstvo potomkov [9]. Preto sú v rámci hypotézy dôležitejšie hodnoty CAP a relatívnej plodnosti ako RAP, keďže výsledné hodnoty RAP závisia na konkrétnych miestnych podmienkach počas neresového obdobia. To, že medzi SR a BG samicami nebol v RAP štatisticky preukazný rozdiel bolo pravdepodobne spôsobené náhlou disturbanciou v júni 2010 v Dunaji (náhly extrémny nárast vodnej hladiny a zvýšenie rýchlosti prúdenia spojený s teplotným poklesom vody) [20]. Náhla disturbancia tak pravdepodobne prerušila neresovú sezónu býčka, čo malo za následok vyneresenie menšieho počtu oocytov a tak zníženie hodnôt RAP.

U samíc BG spadali hodnoty CAP do intervalu od 419 do 7865 oocytov (priem. 3512 oocytov) a u samíc SR do intervalu od 1578 do 10605 oocytov (priem. 4413 oocytov) (t-test: $t = 3.264$ d.f. = 175 $P < 0.01$). Hodnoty relatívnej plodnosti boli u samíc BG od 101,5 do 3158,5 oocytov. g^{-1} (priem. 652,7 oocytov. g^{-1}) a u samíc SR od 224,7 do 3568,9 oocytov. g^{-1} (priem. 748.3 oocytov. g^{-1}) (Mann-Whitney U-test: $U = 21249$ $Z = 2.981$ $P < 0.01$). Výsledky z CAP a relatívnej plodnosti teda boli v súlade s predikciou. Vysoká plodnosť, t.j. produkcia veľkého množstva potomkov SR mala zabezpečiť, aby sa populácia udržala v novom prostredí. Veľké množstvo potomkov totiž zvyšuje pravdepodobnosť, že aspoň časť jedincov prežije aj v nestabilných či nepredvídateľných podmienkach. Distribúcia zdrojov do vyššieho počtu menej zdatných jedincov je v súlade s typickými vlastnosťami generalizovaných foriem [8, 21,22]. Samice BG produkovali na rozdiel od samíc SR menší počet potomkov. Umožnila im to ich väčšia špecializácia na stabilné prostredie, ktoré im poskytuje selektívnu výhodu a zvyšuje ich šance na prežitie. Samice BG preto alokovali získané zdroje do menšieho počtu zdatnejších potomkov.

Záver

Analýza plodnosti odhalila, že populácia BG mala preukázateľne nižšiu plodnosť ako populácia SR. Dva z troch testovaných parametrov boli v súlade s predikciou a podporili testovanú hypotézu alternatívnych ontogenéz a invázneho potenciálu, jeden parameter bol ovplyvnený disturbanciou. Zmeny v reprodukčných parametroch nepôvodnej populácie býčka čiernoústeho preukázali jeho vysokú fenotypovú plasticitu, ktorá pomáha potenciálnym invázorom v založení nových populácií v neznámych prostrediach.

Pod'akovanie

Za vedenie pri práci ďakujem svojmu školiteľovi Prof. RNDr. V. Kováčovi, CSc. Za nazbieranie materiálu a pomoc v teréne alebo laboratóriu ďakujem D. Grul'ovi, PhD., Mgr. T. Stefanovovi, B. Števo, PhD. a Mgr. M. Georgie. Výskum bol podporený agentúrou VEGA, projekt 1/0641/11 a grantom UK/179/2011 a UK/211/2012.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Balon E. K. (1984) Patterns in the evolution of reproductive styles in fishes. In: Potts G. W., Wootton R. J. (eds.) Fish reproduction: strategies and tactics. Academic Press, New York, p. 35
- [2] Ware D. M. (1984) Fitness of different reproductive strategies in teleost fishes. In: Potts G. W., Wootton R. J. (eds.) Fish reproduction: strategies and tactics. Academic Press, New York, p. 349
- [3] Kalchhauser I., Mutzner P., Hirsch P. E., et al. (2013) BioInvasions Rec. 2(1), p. 79
- [4] MacInnis J. A., Corkum L. D. (2000) Trans. Am. Fish. Soc. 129, p. 136
- [5] Ľavrinčíková M., Kováč V. (2007) J. Appl. Ichthyol. 23(3), p. 276
- [6] Kováč V., Copp G. H., Sousa R. P. (2009) J. Appl. Ichthyol. 25(1), p. 33
- [7] Geist V. (1978) How genes communicate with the environment—The biology of inequality. In: Geist V. (ed.) Life strategies, human evolution, environmental design. Toward a biological theory of health. Springer-Verlag, Berlin, p. 116
- [8] Flegler-Balon C. (1989) Direct and indirect development in fishes—examples of alternative life-history styles. In: Bruton M. N. (ed.) Alternative Life-History Styles of Animals, Perspectives in Vertebrate Science. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 71
- [9] Balon E. K. (2004) Alternative ontogenies and evolution: a farewell to gradualism. In: Hall B. K., Pearson R. D., Muller G. B. (eds.) Environment, development and evolution, toward a synthesis. MIT Press, Cambridge, p. 37
- [10] Kováč V. (2011) Genes and Development. In: Hutchins M. (ed.) Grzimek's Animal Life Encyclopedia. Evolution. Gale, Farmington Hills, p. 141
- [11] Hôrková K. (2010) Analýza reprodukčných parametrov býčka čiernousteho *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) zo slovenského úseku Dunaja. (Diplomová práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p. 58

- [12] Hunter J. R., Goldberg S. R. (1980) Fish. Bull. 77, p. 641
- [13] Hunter J. R., Macewicz B. J., Lo N. C., et al. (1992) Fish. Bull. 90, p. 101
- [14] Grabowska J. (2005) J. Appl. Ichthyol. 21, p. 296
- [15] Valladolid M., Przybylski M. (2008) Folia Zool. 57(1–2), p. 147
- [16] Soriguer M. C., Vallespin C., Gomez-Cama C., et al. (2000) Hydrobiologia 436, p. 51
- [17] Kováč V. (2010) Proceedings of 17th International Conference on Aquatic Invasive Species, Collection of Abstracts, San Diego, CA, p. 159
- [18] Holčík J., Hensel K. (1972) Metódy stanovenia plodnosti. In: Holčík J., Hensel K. (eds.) Ichtyologická príručka. Obzor, Bratislava, p. 159
- [19] Copp G. H., Fox M. G. (2007) Growth and life history traits of introduced pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*) in Europe, and the relevance to its potential invasiveness. In: Gherardi F. (ed.) Biological invaders in inland waters: profiles, distribution and threats. British Crown, p. 289
- [20] SHMÚ (2010) Slovenský hydrometeorologický ústav, stavy vodnej hladiny a teplota vody v Karloveskom ramene a Čunovskej zdrži, dáta poskytnuté 26.1.2012
- [21] Wootton R. J. (1984) Introduction: tactics and strategies in fish reproduction. In: Potts G. W., Wootton R. J. (eds.) Fish reproduction: strategies and tactics. Academic Press, New York, p. 1
- [22] Balon E. K. (1989) The epigenetic mechanism of bifurcation and alternative life-history styles. In: Bruton M. N. (ed) Alternative Life-History Styles of Animals, Perspectives in Vertebrate Science. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 467

Využitie vírusu šarky slivky na tranzientnú expresiu cudzorodých génov v *Nicotiana bethamiana*

Júlia Hunková¹, Mária Kamencayová², Zdeno Šubr²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; juliahunkova@gmail.com

²Slovenská akadémia vied, Virologický ústav, Oddelenie rastlinnej virológie, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika

Abstrakt

Plum pox virus (PPV) is a pathogenic agent causing the Sharka disease of stone fruit trees what leads to premature fruit dropping and reduces their quality. Sharka currently belongs to the most devastating stone fruit diseases and that is why PPV is intensively studied. PPV may infect artificial herbaceous hosts like *Nicotiana* spp. under experimental conditions. The viral genome can be used as expression system for transient gene expression. Using different strategies of insertion and fusion of heterologous sequences to viral proteins, either expression of full matured heterologous proteins, or presentation of foreign epitopes on the surface of pseudoviral particles may be performed. In our work we cloned several genes including *influenza virus* PB1-F2 replicase, *Cronobacter sakazakii* small heat-shock protein and *Alfalfa mosaic virus* capsid protein in the previously prepared PPV-based vector and proved their expression in *Nicotiana bethamiana* plants after biolistic transfection. One of the genes (PB1-F2) was detected in infected plants by immunoblotting analysis.

Kľúčové slová: *Plum pox virus*; *Alfalfa mosaic virus*; tranzientná expresia; heat-shock proteín

Úvod a formulácia cieľa

Vírus šarky slivky (*Plum pox virus*, PPV) je (+)ssRNA vírus patriaci do rodu *Potyvirus*, čeľaď *Potyviridae*. Je to ekonomicky najvýznamnejšia skupina rastlinných vírusov a zahŕňa aj rody *Rymovirus*, *Macluravirus*, *Ipomovirus*, *Bymovirus* a *Tritimovirus* [1]. PPV napáda kôstkoviny (hlavne slivky, marhule a broskyne) a spôsobuje ochorenie zvané šarka (z bulharského názvu pre kiahne). Dochádza k predčasnému opadávaniu plodov a znižovaniu ich kvality. Šarka patrí z ekonomického hľadiska k najdevastujúcejším ochoreniam kôstkovín [2].

Virióny PPV sú flexibilné filamenty, genóm obsahuje cca 9800 nukleotidov. Na 5'-konci RNA sa nachádza VPg proteín a 3'-koniec je polyadenylovaný. Genóm vírusu kóduje jeden otvorený čítací rámeč (ORF) kódujúci polyproteín, z ktorého vzniká 10 produktov vrátane kapsidového proteínu (CP), obaľujúceho virióny. Väčšina z nich je multifunkčná, ale funkcie niektorých proteínov dosiaľ nie sú úplne objasnené [3, 4]. V súčasnosti poznáme 7 kmeňov PPV, pričom najrozšírenejšie a preto aj ekonomicky najvýznamnejšie sú PPV-D, PPV-M a PPV-Rec [5, 6].

Na oddelení rastlinnej virológie VÚ SAV bol nedávno adaptovaný genóm kmeňa PPV-Rec ako vírusový vektor pre expresiu intaktných proteínov aj pre prezentáciu epitopov

[7]. Naším cieľom bolo otestovať využiteľnosť týchto vektorov pre heterológnu produkciu viacerých modelových polypeptidov.

Materiál a metódy

Pre heterológnu expresiu sme použili vektor pBOR-VT pripravený na báze infekčného cDNA klonu izolátu PPV-Rec BOR-3 [7,8]. Ako modelové sme použili nasledujúce cudzorodé gény: malý proteín tepelného šoku (small heat-shock protein, sHsp) *Cronobacter sakazakii* [9], PB1-F2 replikáza vírusu chrípky [10] a časť kapsidového proteínu vírusu mozaiky lucerny izolátu T6 (AMV CP) [11]. Do vírusových vektorov sme ich klonovali restriktčno-ligačným spôsobom s využitím linkera *EagI/KpnI*, pričom tieto restriktčné miesta boli zahrnuté v primeroch pre amplifikáciu jednotlivých génov (Tab. 1).

Tab. 1 Primery použité v práci. Podčiarknuté sú pridané sekvencie štiepných miest *EagI* a *KpnI*, dvojito podčiarknuté sú pridané sekvencie kódujúce His-tag

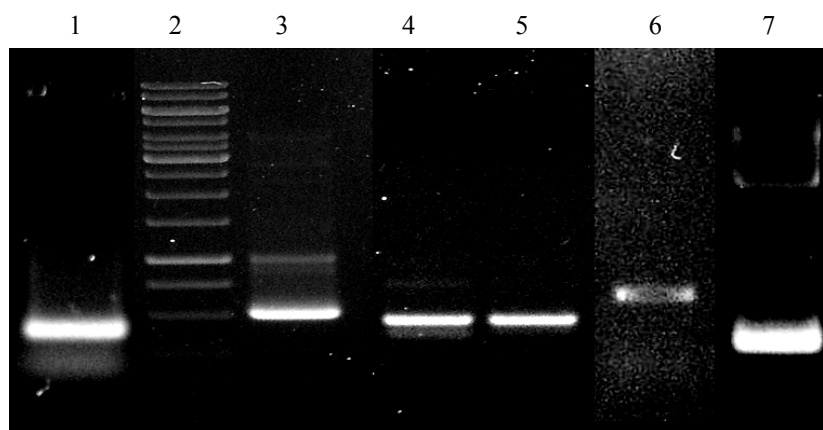
gén	názov primeru	sekvencia
AMV CP	AMVepFor	AAAC <u>CGGCCCG</u> GAAACGTTCTCAGAACTATGCTGCCTTACGCAA
	AMVrev	AAAGGT <u>ACC</u> ATGACGATCAAGATCGTCAG
PB1-F2	PRXfw2	AAC <u>CGGCCG</u> GATGGGACAGGAACAGGATAC
	PRXrev	AAGGT <u>ACC</u> CTCGAGTTTGCTGAACAACC
sHsp	HSPfor	AG <u>CCCGCCG</u> GATGTCTGCATTGACTCCGTG
	HSPrev	GTTGGT <u>ACC</u> GTTGACTGAGATTTCATCTG
	HSPforHis	<u>TCGGCCGG</u> CATCATCATCATCATATGTCTGCATTGACTCCGTG
	HSPrevHis	<u>TGGTACC</u> ATGATGATGATGATGATGGTTGACTGAGATTTCATCTG

Za účelom detekcie produktu bola k sHsp počas PCR pripojená aj hexahistidínová značka (tag), a to buď na N, alebo na C koniec, prípadne na oba konce súčasne [12]. Na amplifikáciu génov sme využívali GO Taq DNA polymerázu (Promega), PCR prebiehala pri anelačnej teplote 58°C a dĺžke elongačného času 1 min. Ako templát sme použili pri AMV CP cDNA pripravenú reverznou transkripciou z RNA purifikovanej z infikovaných rastlín [13], pri sHsp a PB1-F2 klonované gény poskytnuté z iných pracovísk (Dr. Drahovská, Dr. Košík). Vzorky sme po elektroforéze v 0,8% agarózovom géle vyrezali, prečistili kitom Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), ligovali do plazmidu pGEM-T Easy (Promega) a transformovali bunky *Escherichia coli* XL1. Plazmidovú DNA sme izolovali pomocou kitu Pure Yield Plasmid Miniprep System (Promega), analyzovali restriktčným štiepením a príslušné inzerty sme vyštípili *EagI/KpnI* a reklovali do rovnako štiepeného pBOR-VT. Získané klony sme analyzovali sekvenáciou a vnášali do rastlín *N. benthamiana* pomocou biolistickej metódy [14]. Vzorky z rastlín sme dva týždne po transfekcii analyzovali

imunoblotom po SDS-PAGE s využitím špecifických protilátok proti PPV, PB1-F2, AMV, resp. His-tag [15], prípadne pomocou RT-PCR s príslušnými špecifickými primermi.

Výsledky a diskusia

Pre expresiu proteínov v bylinách aj drevinách boli už v minulosti na iných pracoviskách aplikované vírusové vektory na báze PPV [16]. V našom prípade sa všetky vybrané gény podarilo úspešne amplifikovať (Obr. 1) a klonovať. Rastliny *N. benthamiana* transfekované konštruktami s PB1-F2 a sHsp vykazovali príznaky typické pre infekciu PPV, ktorá bola potvrdená aj imunoblotom.



Obr. 1 Analýza PCR jednotlivých génov.

1 – sHsp, 2 – DNA ladder, 3 – 6His/sHsp/6His, 4 – 6His/sHsp, 5 – sHsp/6His, 6 – AMV CP, 7 – PB1-F2

Konštrukt AMV CP nevyvolával infekciu. Sekvenácia totiž ukázala bodovú nonsense (TAA) transverziu blízko 5'-konca klonovaného inzertu, ktorá viedla k predčasnej terminácii translácie (Obr. 2). Zrejme išlo o náhodnú mutáciu zavedenú počas PCR, preto tento experiment bude potrebné zopakovať.

```
ArgProLysArgSerGlnAsnTyrAlaAla***ArgLysAlaGlnLeuProLysProProAlaLeuLys
CGGCCGAAACGTTCTCAGAACTATGCTGCCTAACGCAAAGCTCAACTGCCGAAGCCTCCGGCGTTGAAA
```

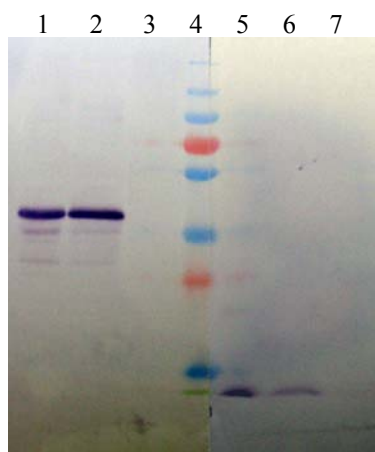
Obr. 2 Sekvenca začiatku klonovaného génu AMV CP.

Štiepne miesto *EagI* je podčiarknuté, bodová mutácia (T-A) vedúca k *Ochre* stop kodónu je zvýraznená.

V prípade sHsp predchádzajúce výsledky RT-PCR ukázali, že tento gén bol v pBOR-VT stabilný počas infekcie, aj v rámci niekoľkých mechanických pasáží vírusového vektora v rastlinách (M. Kamencayová, nepublikované). Keďže však nebol k dispozícii vhodný detekčný systém pre sHsp na úrovni proteínu (absencia špecifických protilátok), rozhodli sme

sa v našej práci využiť fúziu sHsp s hexahistidínovou značkou a následne detekciu komerčnou protilátkou. Po zavedení His-tag na obidva konce sHsp sme získali infekčný konštrukt stabilne sa množiaci v rastlinách, avšak signál s Anti-His-tag protilátkou v imunoblote sme nezískali, alebo len veľmi slabý a zodpovedajúci menšej než očakávanej veľkosti. Je možné, že dochádzalo k posttranslačnej degradácii produktu. Stabilita inzertov v PPV vektoroch závisí na ich dĺžke aj sekvencii [16]. Konštrukty s jednostrannou His-tag fúziou na N-, resp. C-konci sHsp boli pripravené a sekvenácia potvrdila ich správnosť. Rastliny transfekované týmito konštruktami zatiaľ neboli analyzované.

Replikáza PB1-F2 bola v rastlinách dokázaná pomocou imunoblotu sedem dní po transfekcii, po ďalšom týždni jej koncentrácia mierne klesla (Obr. 3). Bol to zatiaľ jediný prípad, keď sme expresiu cudzorodého génu pomocou vírusového vektora dokázali aj na úrovni proteínu. V ďalšej práci sa zameriame aj na optimalizáciu produkcie a následnej purifikácie z rastlinných pletív.



Obr. 3 Imunoblot vzoriek z rastlín infikovaných konštruktom pre produkciu PB1-F2. 1-3 – Anti-PPV protilátka, 5-7 – Anti PB1-F2 protilátka, 4 – marker molekulových hmotností. 1 a 5 – vzorky 7 dní po infekcii, 2 a 6 – vzorky 14 dní po infekcii, 3 a 7 – zdravé rastliny (negatívna kontrola)

Záver

Do pripraveného vektora pBOR-VT na báze vírusu šarky slivky sa nám podarilo naklonovať niekoľko génov za účelom overenia možnosti tranzientnej expresie pomocou tohto vektora v rastlinách *N. benthamiana*. Jeden z konštruktov sa v transfekovaných rastlinách nemnožil, z ďalších dvoch sme jeden cudzorodý gén dokázali iba na úrovni RNA, druhý aj na úrovni exprimovaného proteínu.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporovaná grantom VEGA 2/0008/12. Autori sú vďační Doc. RNDr. H. Drahovskej, PhD. (PriF UK, Bratislava) a RNDr. I. Košíkovi, PhD. (VÚ SAV, Bratislava) za poskytnutie klonovaných génov sHsp, resp. PB1-F2 vrátane sekvenčnej dokumentácie.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Salvador B., García J.A., Simón-Mateo C. (2006) EPPO Bulletin 36(2), p. 229
- [2] López-Moya J.J., Fernández-Fernández M.R., Cambra M., et al. (2000) J Biotechnol. 76(2-3), p. 121
- [3] Laín S., Riechmann J.L., Méndez E., García J.A. (1988) Virus Res. 10(4), p. 325
- [4] Riechmann J.L., Laín S., García J.A. (1989) J. Gen. Virol. 70(Pt 10), p. 2785
- [5] Candresse T., Cambra M. (2006) EPPO Bulletin, 36(2), p. 239
- [6] Serçe C.U., Candresse T., Svanella-Dumas L., et al. (2009) Virus Res. 142(1-2), p. 121
- [7] Kamencayová M., Šubr Z. (2012) Acta Fytotech et Zootech. 15(special number), p. 24
- [8] Predajňa L., Nagyová A., Glasa M., et al. (2012) Acta Virol. 56(2), p. 135
- [9] Gajdosova J., Benedikovicova K., Kamodyova N., et al. (2011) Antonie van Leeuwenhoek. 100 (2), p. 279
- [10] Košík I., Krejnosová I., Bystrická M., et al. (2011) Acta Virol. 55(1), p. 45
- [11] Kúdela O., Gallo J. (1995) Acta Virol. 39(3), p. 131
- [12] Lindner P., Bauer K., Krebber A., et al. (1997) Biotechniques. 22(1), p. 140
- [13] Glasa M., Palkovics L., Kominek P., et al. (2004) J Gen Virol. 85(Pt 9), p. 2671
- [14] Predajňa L., Nagyová A., Šubr Z. (2010) Acta Virol. 54(4), p. 303
- [15] Nováková S., Klauďiny J., Kollerová E., et al. (2006) J Virol Methods. 137, p. 229
- [16] García J.A., Lucini C., García B., et al. (2006) EPPO Bulletin 36(2), p. 341

Štúdium genotoxického a antimutagénneho účinku hyperforínu

Petronela Imreová¹, Eva Miadoková¹, Stephka Chanková², Michala Gáfriková¹, Ivan Chalupa³

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; petra.imreova@gmail.com

²Bulgarian Academy of Science, Institute of Biodiversity and Ecosystem Researches, Sofia, Bulgaria

³Slovenská akadémia vied, Ústav experimentálnej onkológie, Vlárská 7, 833 91 Bratislava, Slovenská republika

Abstrakt

Hyperforin is a prenylated phloroglucinol derivative occurring in plant St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). Hyperforin has several important characteristics, such as antidepressant, antibacterial, anti-inflammatory and proapoptotic effects. For introduction of hyperforin as a drug into the practice, it is necessary to test its potential mutagenic effect on human cells. This article is aimed at investigation of the hyperforin potential mutagenic effect as well as its potential anti-mutagenic effect. We used tumor cell line HepG2, employing the *in vitro* mammalian chromosome aberration test. In the experimental conditions used, hyperforin did not act as mutagen to cell line HepG2. The second part of our results implies that hyperforin had antimutagenic effect against indirect mutagenic benzo(a)pyrene.

Kľúčové slová: hyperforín; chromozómové aberácie; genotoxicita; antimutagenita

Úvod a formulácia cieľa

Rastliny sprevádzajú ľudí už po stáročia. Mnohé sa vyznačujú rôznymi účinkami prospešnými pre zdravie. Jednou z nich je ľubovník bodkovaný (*Hypericum perforatum*). Je to trváca rastlina, so žltými kvetmi, ktoré sú aj s listami pokryté drobnými žliazkami, v ktorých sa akumuluje hyperforín a ďalšie sekundárne metabolity. Vyznačuje sa širokospektrálnym využitím, pretože pôsobí antibakteriálne, antivírusovo, protizápalovo, antidepressívne. Nedávno bolo zistené, že má protirakovinový účinok, čo má veľkú perspektívu pri využívaní na liečbu rakoviny [1, 2, 3].

Veľký rozmach priemyselných techník, ktoré znečisťujú životné prostredie a rôzne potravinárske konzervačné látky, majú za následok vysoký výskyt karcinogénov, s ktorými sme v každodennom kontakte. Jednou z najrozšírejších jedovatých látok a karcinogénov je benzo(a)pyrén, ktorý patrí medzi polycyklické aromatické uhľovodíky [4]. Napríklad pri fajčení alebo konzumovaní spáleného mäsa sme exponovaní tomuto nepriamemu mutagénu [5, 6]. Neustále pôsobenie agensov ohrozujúcich zdravie na ľudský organizmus spôsobuje vznik mutácií v genetickej informácii. Poškodenia DNA môžu viesť k vzniku rôznych

ochorení. Hromadením mutácií v somatických bunkách dochádza k vzniku nádorového ochorenia, rakoviny.

Prírodné zlúčeniny majú často menej vedľajších účinkov ako liečebné preparáty konvenčnej medicíny. Aby sa ľubovník bodkovaný mohol používať na liečbu v klinickej praxi, prípadne ako prevencia proti rakovine, je potrebné zistiť, respektíve vylúčiť, či zlúčeniny vyskytujúce sa v rastline majú mutagénny účinok na človeka. V našej práci sme sa zaoberali zisťovaním potenciálneho mutagénneho účinku hyperforínu, ktorý je sekundárnym metabolitom *Hypericum perforatum*. Je to prenylový floriglucínový derivát. Zároveň sme sa v práci zamerali na sledovanie jeho potenciálneho antimutagénneho účinku voči nepriamemu mutagénu – benzo(a)pyrénu na bunkovej línii HepG2.

Materiál a metódy

Kultivácia bunkovej línie HepG2

Bunková línia HepG2 pochádza z buniek ľudského hepatokarcinómu a bola založená Knowlesom (Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia, PA, U.S.A.) [7]. Bunkovú líniu sme dostali od A. Collinsa (The Rowett Research Institute, Aberdeen, Škótsko). Bunky sme kultivovali v médiu, ktoré bolo pripravené kombináciou Wiliamsovoho média (PAN-Biotech GmbH, Nemecko), bovinneho fetálneho séra (10 % objemu) (PAN-Biotech GmbH, Nemecko) a antibiotika gentamycínu (50 µg/ml) (gentamycin Sandoz, SANDOZ, Slovinsko). Pri subkultivácii buniek sme použili 0,25 % roztok trypsínu (Trypsín 1:250, Difco, USA) v 0,3 % roztoku Tris-HCl (Tris(hydroxymetyl)aminometán hydrochlorid) (SIGMA). Bunky sme kultivovali v termostate pri 37°C v špecifickej atmosfére, ktorá bola tvorená zmesou 5 % CO₂ a 95 % vzduchu.

Zisťovanie potenciálneho mutagénneho účinku hyperforínu a overovanie mutagénneho účinku benzo(a)pyrénu

Mutagénny účinok hyperforínu a benzo(a)pyrénu sme sledovali *in vitro* testom na detekciu chromozómových aberácií u cicavcov. Do Petriho misiek sme nasadili 1.10⁶ buniek HepG2 pre každý z experimentov. Bunkovú líniu HepG2 sme ovplyvnili rôznymi koncentraciami hyperforínu v médiu: od 0,015 do 75,0 µM. V prípade ovplyvňovania buniek HepG2 benzo(a)pyrénom sme použili nasledovné koncentrácie v médiu: 0,3125; 0,625; 1,25; 1,7; 2,5; 3,3; 5,0; 10,0 µM. Bunky sme ovplyvňovali 46 hodín, čo predstavuje 1,5 násobok bunkového cyklu HepG2 buniek. Následne sme spracovali karyologické preparáty.

Detekcia antimutagénneho účinku hyperforínu voči benzo(a)pyrénu

Bunkovú kultúru HepG2 sme 24 hodín predovplyvňovali nasledovnými koncentráciami hyperforínu: 0,15; 0,75; 1,5 μM . Bunky sme potom ovplyvnili 1,25 a 1,7 μM benzo(a)pyrénom.

Spracovanie karyologických preparátov

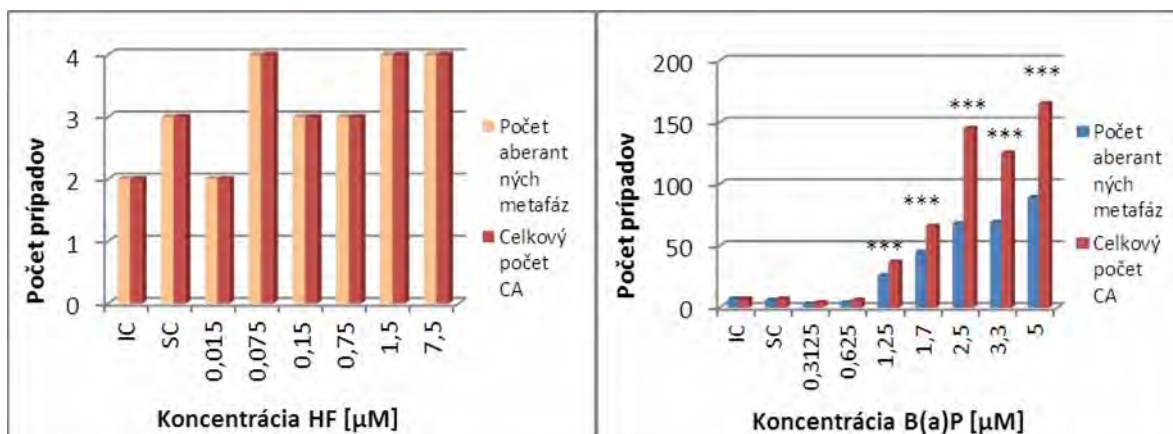
Tri hodiny pred spracovaním karyologických preparátov konvenčnou metódou sme pridali kolchicín. Podložné sklíčka sme farbili 2 % roztokom Giemsa-Romanowski po dobu 10 minút. Preparáty sme sušili na vzduchu.

Cytogenetická analýza preparátov

Chromozómové aberácie sme hodnotili mikroskopicky. Analyzovali sme vždy 100 mitóz z každej koncentrácie aj z kontrol. Pri hodnotení mitóz sme sa zameriavali na zlomy - chromozómové a chromatídové a výmeny, medzi ktoré sa zaraďujú: dicenterické chromozómy, chromozómy v tvare kruhu, triradiálne a kvadriradiálne chromozómy. Výsledky sme hodnotili štatisticky na základe testu dvoch relatívnych hodnôt. Percentá aberácií sme porovnávali s negatívnymi kontrolami.

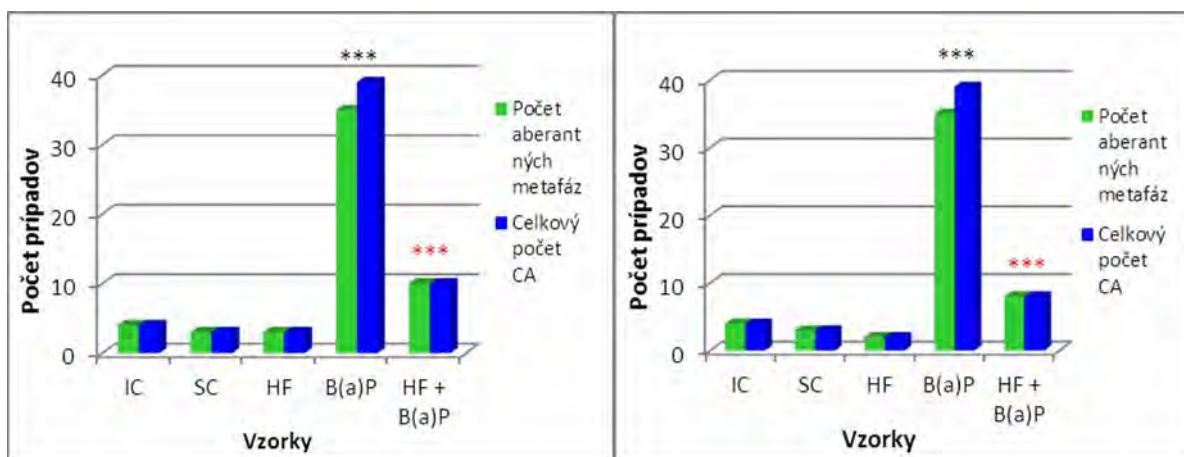
Výsledky a diskusia

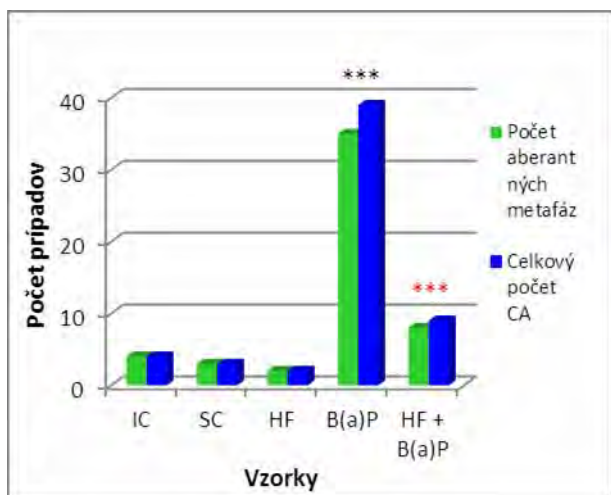
V prvej časti experimentov sme zisťovali potenciálny genotoxický účinok hyperforínu a overovali mutagénny účinok benzo(a)pyrénu, ktorý vyžaduje metabolickú aktiváciu. Bunková línia HepG2 ovplyvnená rôznymi koncentráciami hyperforínu disponovala približne rovnakým počtom aberantných metafáz a chromozómových aberácií v porovnaní s kontrolou rozpúšťadla – SC (solvent control). Pri dvoch najvyšších použitých koncentráciách (75 μM a 15 μM) vykazoval hyperforín cytotoxicitu na bunky HepG2. V prípade overovania mutagénneho účinku benzo(a)pyrénu bunky HepG2 disponovali rôznym počtom chromozómových aberácií a aberantných metafáz. So zvyšujúcou sa koncentráciou mutagénu sa zvyšovali hodnoty oboch cytogenetických parametrov. Štatisticky významný rozdiel v sledovaných cytogenetických parametroch v porovnaní s kontrolou rozpúšťadla - SC sme zaznamenali pri väčšine koncentrácií benzo(a)pyrénu s výnimkou dvoch najnižších koncentrácií 0,3125 a 0,625 μM . Pri najvyššej použitej koncentrácii 10 μM , mal benzo(a)pyrén cytotoxický účinok.



Obr. 1 a 2 Výskyt štruktúrnych chromozómových aberácií (CA) a celkového počtu aberantných metafáz u bunkovej línie HepG2 ovplyvnenej rôznymi koncentraciami hyperforínu (vľavo) a benzo(a)pyrénu (vpravo). V prípade hyperforínu sme štatisticky významný rozdiel od kontroly rozpúšťadla (SC) v počte aberantných metafáz a v celkovom počte CA nezistili (test rozdielu dvoch relatívnych hodnôt). V prípade benzo(a)pyrénu je štatisticky významný rozdiel od kontroly rozpúšťadla (SC) označený hviezdičkami (test rozdielu dvoch relatívnych hodnôt) ***p<0,001.

V ďalšej časti našich experimentov sme zisťovali potenciálny antimutagénny účinok hyperforínu voči benzo(a)pyrénu. U buniek HepG2 predovplyvnených koncentraciami hyperforínu: 0,15; 0,75; 1,5 μM a následne ovplyvnených 1,7 μM benzo(a)pyrénom sme zaznamenali v prípade všetkých vzoriek štatisticky významný pokles v sledovaných cytogenetických parametroch.





Obr. 3, 4 a 5 Výskyt štruktúrnych chromozómových aberácií a celkového počtu aberantných metafáz u bunkovej línie HepG2 ovplyvnenej 1,7 μM benzo(a)pyrénom po predovplyvnení 0,15 μM hyperforínom (vľavo), 0,75 μM hyperforínom (vpravo) a 1,5 μM hyperforínom (dolu). Štatisticky významný rozdiel od kontroly rozpúšťadla (SC) je označený čiernymi hviezdikami (test rozdielu dvoch relatívnych hodnôt). Štatisticky významné zníženie hodnôt medzi vzorkou ovplyvnenou iba s B(a)P a vzorkou ovplyvnenou B(a)P po predovplyvnení HF, je označené červenými hviezdikami: *** $p < 0,001$.

V prípade všetkých experimentov sme pri porovnaní kontrol IC (*intact control*) a SC (*solvent control*) zistili, že aplikácia rozpúšťadla DMSO (dimethyl sulfoxide) na bunky HepG2 nemala cytotoxický ani mutagénny účinok.

Záver

V uvedených experimentoch sme zistili, že hyperforín v našich experimentálnych podmienkach nepôsobil genotoxicky na bunkovú líniu HepG2 a dokázali sme, že bunky HepG2 disponujú enzymatickou výbavou potrebnou pre metabolickú aktiváciu nepriameho mutagénu - benzo(a)pyrénu. Hyperforín mal v našich podmienkach antimutagénny účinok voči benzo(a)pyrénu. Predpokladáme, že bol spôsobený inhibíciou enzýmov potrebných na aktiváciu benzo(a)pyrénu na diol-epoxydy ako sú CYP1A1 a CYP2C9, ktoré sa vyskytujú v pečeni [8, 9] a pôsobil ako dezmutagén.

Pod'akovanie

Táto práca bola finančne podporená grantmi VEGA 1/0025/11, SK/BG-0006-10, BG/SK/206, APVV-0040-10.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Wolfender J. L., Verotta L., Belvisi L., et al. (2003) *Phytochem. Anal.* 14(5), p. 290
- [2] Verotta L., Lovaglio E., Sterner O., et al. (2004) *J. Org. Chem.* 69(23), p. 7869

- [3] Medina M. A., Martínez-Poveda B., Amores-Sánchez M. I., Quesada, A. R. (2006) *Life Sci.* 79(2), p. 105
- [4] Fang C., Zhang Q. Y. (2010) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 334(1), p. 156
- [5] Herbstman J. B., Tang D., Zhu D., et al. (2012) *Environ Health Perspect.* 120(5), p. 733
- [6] Phillips D. H. (1999) *Mutat. Res.* 443(1-2), p. 139
- [7] Havekes L., Van Hinsbergh V., Kempen H. J., Emeis J. (1983) *Biochem. J.* 214(3), p. 951
- [8] Schwarz D., Kisselev P., Roots I. (2003) *Cancer Res.* 63(22), p. 8062
- [9] Barnes J., Anderson L. A., Phillipson J. D. (2001) *J. Pharm. Pharmacol.* 53(5), p. 583

Testovanie vplyvu Isoprinosinu na replikáciu myšacieho lymfotropného gamaherpesvírusu (MHV-68) a na proliferáciu myšacích nádorových buniek.

¹ Oľga Janíčková, ¹ Janka Jarčušková, ¹ Magdaléna Wágnerová, ¹ Anna Chalupková, ¹ Zuzana Hrabovská, ^{1,2} Jela Mistríková

¹ *Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, ol.janickova@gmail.com*

² *Virologický ústav Slovenskej akadémie vied, Dúbravská cesta 9, 845 05, Bratislava, Slovenská republika*

Abstrakt

Isoprinosine is a drug, known for antiviral, antitumor and immunomodulating activity. Antiviral effect of Isoprinosine was tested using murine herpesvirus 68 (MHV-68), which is accepted worldwide as a model for the study of human oncogenic gammaherpesviruses. The aim of this study was to investigate the effect of the different Isoprinosine concentrations on replication of MHV-68 and proliferation of tumor cell line NB-78 and NS0 cell line. We found, that virus titer was significantly reduced using higher concentrations of Isoprinosine (500 and 1000 mg / ml). The inhibitory effect of all Isoprinosine concentrations on the proliferation of NB-78 and NS0 cell lines was confirmed.

Kľúčové slová: *Isoprinosin ; MHV-68; tumour cells NB-78 ; NS0 cell line; inhibition*

Úvod a formulácia cieľa

Isoprinosin (komplex N,Ndimetylamino-2-propanolovej soli kyseliny p-acetamidobenzoovej a β-inozínu v molárnom pomere 3:1) je liek, ktorý je známy svojim antivírusovým, protinádorovým, ale najmä imunomodulačným potenciálom. Jeho liečebný efekt bol potvrdený pri vybraných RNA a DNA vírusoch, ako aj pri rôznych druhoch nádorových ochorení [1].

MHV-68, Myšací herpetický vírus bol izolovaný v roku 1976 z drobných myšovitých hlodavcov na území Slovenska [2]. Je výrazne lymfotropný, pričom je však schopný navodiť infekciu aj epitelových a fibroblastových buniek. Vyvoláva akútne ochorenia, ktoré „vd’aka“ jeho schopnosti perzistovať v bunkách prechádzajú často do chronicity a môžu viesť až k malígnej transformácii. Fylogeneticky je príbuzný vírusu Epstein a Barrovej (EBV) preto sa používa na jeho štúdia ako model [3].

Cieľom predloženej práce bolo študovať účinok Isoprinosinu v podmienkach *in vitro* a to vplyv na replikáciu MHV-68 na VERO bunkách, ako aj jeho vplyv na proliferáciu dvoch bunkových nádorových línií NB-78 (adherentná bunková línia derivovaná zo solídneho tumoru myši) a NS0 (suspenná bunková línia derivovaná z myelómových buniek myši).

Materiál a metódy

Isoprinosin- liek na perorálnu aplikáciu (firma Lusomedicamenta – Sociedade Técnica Farmaceutica, S.A., Quelez de Baixo, Barcarena, Portugalsko).

VERO- fibroblastoidná stabilizovaná bunková línia derivovaná z obličiek *Cercophithecus aethiops* [4].

NS0- myšacia myelómová línia (získaná z Neuroimunologického ústavu SAV v Bratislave).

NB-78- nádorové bunky derivované z nádoru BALB/c myši infikovaných MHV-78 [5].

MHV-68- prototypový kmeň myšacieho herpetického vírusu izolovaného z hlodavca *Myodes glareolus* [6].

Príprava Isoprinosinu na aplikáciu- 1 tableta = 500 mg = 500 000 µg. Rozpustili v 5 ml destilovanej vody. Pripravili sme si zásobný roztok 100 000 µg/ml Isoprinosinu.

Test toxicity Isoprinosinu- Najskôr sme si založili 24 jamkovú platničku VERO buniek (100 000/ml) a pridali rôzne koncentrácie isoprinosinu: 10 000, 1000, 500 a 100 µg/ml. Platničku sme vložili do termostatu pri 37° C a kultivovali. V priebehu niekoľkých dní sme odčítali optimálne riedenie, ktoré nespôsobilo toxicitu na bunkách.

Titrácia vírusu MHV-68 - Založili sme si 24 jamkovú platničku VERO buniek. Vírus sme 10 násobne nariedili. Na vyrastenie jednovrstvu buniek, po odstránení kultivačného média, sme pridali nariedený vírus MHV-68 (100µl vírusu/jamka) a nechali adsorbovať 90 min. v termostate pri 37 ° C. Po uplynutí tohto času sme vírus odsali a pridali nové médium (1ml/jamka). Súčasne sme pridali aj rôzne koncentrácie Isoprinosinu 100-10 000 µg/ml. Vírusom infikované bunky spolu s Isoprinosinom sme inkubovali v termostate počas 10 dní.

Testovanie antivírusového účinku Isoprinosinu: Použili sme dve modifikácie metódy, kokultiváciu a aplikáciu látky na vyrastený monolayer.

Výsledky a diskusia

Experiment č.1: Test toxicity Isoprinosinu na VERO a NB-78.

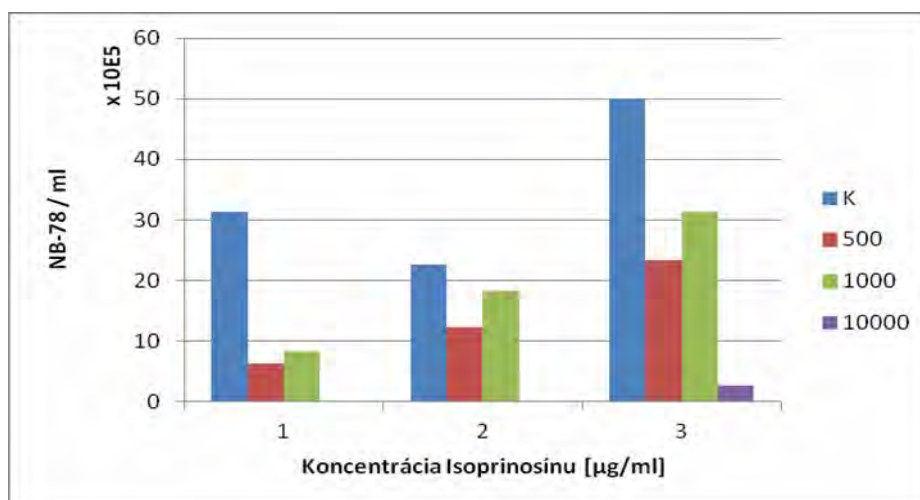
Tab.1 Testovanie toxicity vyhodnotené mierou cytotoxického poškodenia VERO a NB-78 buniek.

VERO	1. deň	2.deň	3. deň	4. deň	5.deň	...	10. deň
10000 µg/ml	+++	+++	+++	++++	++++	...	++++
1000 µg/ml	+	+	++	++	++	...	-
500 µg/ml	-	-	+	+	+	...	-
100 µg/ml	-	-	-	-	-	...	-
PL	-	-	-	-	-	...	-
K	-	-	-	-	-	...	-
NB - 78							
10000 µg/ml	+++	+++	+++	++++	++++	...	++++
1000 µg/ml	++	++	++	+++	+++	...	
500 µg/ml	+/-	+/-	+/-	++	++	...	
100 µg/ml	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	...	
PL	-	-	-	-	-	...	
K	-	-	-	-	-	...	

(+++ 75% cytotoxicity, ++ 50% cytotoxicity, + 10% cytotoxicity)

Výsledok č.1 - zo všetkých testovaných koncentrácií Isoprinosínu bola najmenej toxická koncentrácia 100 µg/ml. Túto koncentráciu sme následne použili na zábranu množenia vírusu metódou titrácie.

Experiment č.2: Kokultivácia NB-78 s Isoprinosinom (500 µg/ml, 1000 µg/ml, 10000 µg/ml).



Obr. 1 Závislosť počtu NB-78 od koncentrácie Isoprinosínu .

Výsledok č.2 – Isoprinosin vo všetkých testovaných koncentráciách má inhibičný efekt na proliferáciu myšacích adherentných nádorových buniek NB-78, počítané 1.,2.a 3.deň kultivácie. Paradoxne nižšia koncentrácia 500 ug/ml má výraznejší inhibičný efekt na rast nádorových buniek, ako koncentrácia vyššia 1000 ug/ml.

Experiment č.3: Vplyv 100 µg Isoprinosinu na replikáciu vírusu, ktorý má titer 10^5 TCID₅₀/ml

Výsledok č.3 - 100 µg Isoprinosinu/ml kultivačného média nemá žiadny efekt na rozmnožovanie MHV-68 počas 10 dní.

Experiment č.4: Vplyv rôznych koncentrácií Isoprinosinu (od 100 - 1000 µg/ml) na titráciu MHV-68

Tab. 2 Titrácia MHV-68 s Isoprinosinom.

Retitr. v. bez isop.	6. deň	7. deň	8. deň	9. deň	...	13. deň
Konc. MHV - 68	++++	+++++	+++++	+++++	...	+++++
10¹	+++	+++	+++	+++	...	++++
10²	-	-	-	-	...	+++
10³	-	-	-	-	...	++
10⁴	-	-	-	-	...	+
K	-	-	-	-	...	-
Isop. 100 µg/ml						
Konc. MHV - 68	++++	++++	++++	++++	...	++++
10¹	-	+	++	++	...	+++
10²	-	-	-	+	...	+++
10³	-	-	-	-	...	+
10⁴	-	-	-	-	...	+
K	-	-	-	-	...	-
Isop. 500 µg/ml						
Konc. MHV - 68	+	+	+	+	...	+
10¹	-	-	-	-	...	+
10²	-	-	-	-	...	-
10³	-	-	-	-	...	-
10⁴	-	-	-	-	...	-
K	-	-	-	-	...	-
Isop. 1000 µg/ml						
Konc. MHV - 68	+	+	+	+	...	+
10¹	-	-	-	-	...	+
10²	-	-	-	-	...	+
10³	-	-	-	-	...	-
10⁴	-	-	-	-	...	-
K	-	-	-	-	...	-

(+++ CPE 75%, ++ CPE 50%, + CPE 10% (CPE-cytopatický efekt))

Výsledok č.4 - 500 a 1000 µg/ml Isoprinosinu v kultivačnom médiu spôsobila redukciu titra vírusu o viac ako 99% na 9. deň po infekcii.

Experiment č.5: Sledovať vplyv vyššej koncentrácie (1000 µg/ml) Isoprinosinu na replikáciu vírusu.

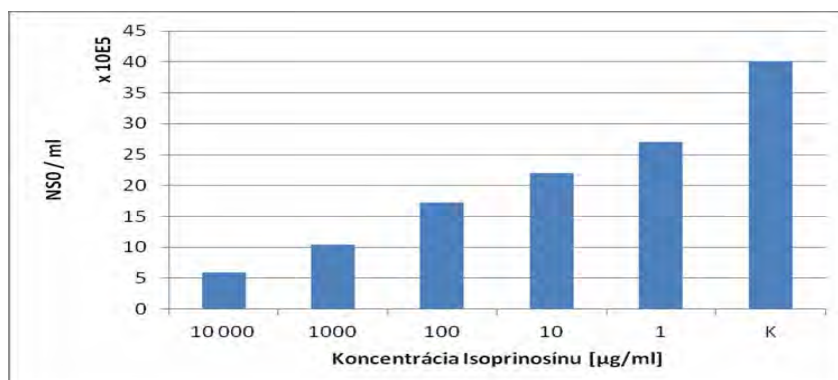
Tab. 3 Vplyv Isoprinosinu 1000 µg/ml na replikáciu vírusu MHV-68.

VERO	3. deň	6. deň	7. deň	8. deň
Konc. MHV - 68			++++	++++
10¹			+++	+++
10²			+	+
10³			-	+
10⁴			-	+
10⁵			-	-
K			-	-
Isop. 1000 µg/ml			-	-
Konc. MHV - 68				
10¹			+++	+++
10²			+	++
10³			-	-
10⁴			-	-
10⁵			-	-
K			-	-

(+++ CPE 75%, ++ CPE 50%, + CPE 10% (CPE-cytopatický efekt))

Výsledok č.5 - Koncentrácia 1000 µg/ml Isoprinosinu inhibuje hladinu vírusu o 2 log na 8. deň po infekcii VERO buniek vírusom MHV-68.

Experiment č.6: Vplyv Isoprinosinu (1- 10 000 µg/ml) na proliferáciu myšacích myelómových buniek NS0, počítané v priebehu 7 dní kultivácie.



Obr. 2 Vplyv Isoprinosinu na rast buniek NS0.

Výsledok č.6 – Z testovania účinku Isoprinosinu na proliferáciu myšacích myelómových buniek vyplynulo, že Isoprinosin vo všetkých testovaných koncentráciách má inhibičný efekt na proliferáciu nádorových buniek.

Záver

Najmenej toxická koncentrácia Isoprinosinu na bunkových kultúrach je 100 µg/ml, táto koncentrácia však nemala žiadny efekt na replikáciu vírusu.

Koncentrácia 500 a 1000 µg/ml Isoprinosinu viditeľne znížila titer vírusu.

Koncentrácia 1000 µg/ml Isoprinosinu inhibovala hladinu vírusu o 2 log.

Isoprinosin vo všetkých testovaných koncentráciách mal inhibičný efekt na proliferáciu nádorových buniek NB-78 a myelómových buniek NS0.

Vzhľadom na skutočnosť, že Isoprinosin má okrem antivírusového a antiproliferačného účinku aj imunomodulačný efekt, predložené výsledky získané *in vitro*, predstavujú len prvú časť štúdie, ktorá bude pokračovať na BALB/c myšiach.

PodĎakovanie

Táto práca bola realizovaná vďaka finančnej podpory grantov MŠ: VEGA 1/01 85/11 a VEGA 1/1340/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Deborah M. Campoli- Richards, Eugene M. et al (1986) Inosine Pranobex. A preliminary Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Efficacy Drugs 32, Adis Press Limited, p. 383
- [2] Blaškovič, D., Stančeková, M., Svobodová, J., et al. (1980) Acta Virol. 24, p. 468
- [3] Hrabovská, Z., Chalupková, A., Čipková, J., et al. (2010) Acta Virol. 54 (4), p. 287
- [4] Yamasura, U., Kawakita, Y. (1963) Studies on SV40 in relationship with tissue culture. In Nippon Rinsko , Vol. 21, p. 1201
- [5] Hrabovská, Z., Chalupková, A., Mistríková, J. (2010) Acta Virol. 54 (1), p. 55
- [6] Blaškovič, D., Stančeková, M., Svobodová, J., et al. (1980) Acta Virol. 24, p. 468

Analýza markerov oxidačného stresu a mikroflóry v slinách pacientov s periodontitídou

Katarína Janšáková¹, Natália Kamodyová², Peter Celec^{1,2,3}

¹*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;*

jansakova.katarina@gmail.com

²*Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Ústav molekulárnej biomedicíny, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovenská republika*

³*Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Ústav patologickej fyziológie, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovenská republika*

Abstrakt

Periodontitis is oral disease affecting supporting tissues of the tooth. The specific cause of disease progression is not known. It can be assumed that pathogenic bacteria and oxidative stress play an important role in the initiation of periodontitis. Useful tool for the analysis of oral microflora and markers of oxidative stress is saliva. We have analyzed the concentrations of markers of oxidative and carbonyl stress and antioxidant status in saliva of periodontitis and control patients. At the same time we have analyzed the bacterial profile in saliva using terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) method. The concentrations of lipid peroxidation markers (TBARS) were by 126% higher in patients with periodontitis. Antioxidant status measured using TAC and FRAP methods was significantly lower in patients with periodontitis by 33.5% and 28.6%, respectively. Using the TRFLP method we could not clearly separate healthy subjects and patients with periodontitis.

KLúčové slová: *orálna mikroflóra; oxidačný stres; periodontitída; slina*

Úvod a formulácia cieľa

Periodontitída predstavuje ústne ochorenie, ktoré postihuje približne 13-57% obyvateľstva [1]. Periodontitída je ochorenie zubného lôžka s pomalou progresiou, ktorého konečná fáza je charakteristická vypadnutím zuba [2]. Do patogenézy periodontitídy zasahuje mnoho exogénnych a endogénnych faktorov, medzi ktoré patria ústna hygiena, oxidačný stres, životný štýl a iné [3]. Jeden z hlavných iniciátorov ochorenia predstavuje prítomnosť vyššieho množstva špecifických gramnegatívnych, periodontitídu spôsobujúcich baktérií [4].

Oxidačný stres predstavuje v bunkách stav, pri ktorom dochádza k zvýšenej tvorbe voľných radikálov a neradikálových častíc naberaajúcich postupne radikálový charakter za zníženej tvorby obranných antioxidantov. Voľné radikály svojím zvýšeným množstvom podporujú poškodenie bunkových štruktúr narúšaním lipidov, proteínov a DNA. Takýmto spôsobom prispievajú k narúšaniu signálnych dráh bunky a tvorbe mutácií [5, 6].

Ideálny prostriedok na sledovanie markerov oxidačného stresu a orálnej mikroflóry predstavuje slina. Výhodou je, že prichádza priamo do kontaktu s poškodeným tkanivom a dá sa jednoducho odobrať v ľubovoľnom množstve. Sledovanie orálnej mikroflóry u pacientov s periodontitídou v porovnaní s kontrolnými jedincami umožňuje analýza polymorfizmu terminálnych restričných fragmentov (TRFLP). Táto metóda umožňuje analýzu 16S rRNA génu baktérií. Metóda TRFLP umožňuje porovnávanie jednotlivých vzoriek na základe ich mikrobiálnej diverzity [7, 8]. Cieľom našej práce bola analýza markerov oxidačného stresu, karbonylového stresu, antioxidantného statusu a mikroflóry v slinách pacientov s periodontitídou v porovnaní so zdravými jedincami.

Materiál a metódy

Celkový počet 60 probandov bol rozdelený do dvoch skupín. Prvú skupinu s počtom 33 probandov predstavovali pacienti s periodontitídou (18 žien a 15 mužov) vo veku 22- 69 rokov. Druhú skupinu v počte 27 probandov vytvárali kontrolní pacienti (13 žien a 14 mužov) vo veku 22- 62 rokov. Probandom boli odobraté 2 ml nestimulovaných slín v doobedných hodinách. Sliny boli centrifugované pri 1000 g pri 4 °C po dobu 5 minút.

Analýza markerov oxidačného stresu, karbonylového stresu a antioxidantného statusu v slinách pacientov s periodontitídou

Vo vzorkách slín oboch skupín sme merali produkty pokročilej oxidácie proteínov (AOPP), markery oxidačného poškodenia proteínov; látky reagujúce s kyselinou tiobarbiturovou (TBARS), markery peroxidácie lipidov; koncové produkty pokročilej glykácie (AGEs), markery karbonylového stresu a markery antioxidantného statusu TAC (celková antioxidantná kapacita) a FRAP (antioxidantná schopnosť redukovať železitý kation). Meranie bolo uskutočnené v mikrotitračných platničkách prostredníctvom spektrofotometrických a spektrofluorometrických metód [9]. Analýza markerov zo vzoriek slín pacientov s periodontitídou a kontrolnej skupiny bola vykonávaná prostredníctvom nepárového t-testu.

Analýza mikroflóry v slinách pacientov s periodontitídou

Izolovanú DNA z každej vzorky sme amplifikovali prostredníctvom PCR reakcie pre 16S rRNA oblasť [10]. PCR produkty sme následne poštípili a fragmenty DNA sme analyzovali kapilárnou elektroforézou. Výsledné dáta sme analyzovali v programe

GeneMapper 3.0, pričom konštrukcia dendrogramov bola uskutočnená v programe BioNumerics 4.5 prostredníctvom metódy UPGMA a Diceho koeficientu.

Výsledky a diskusia

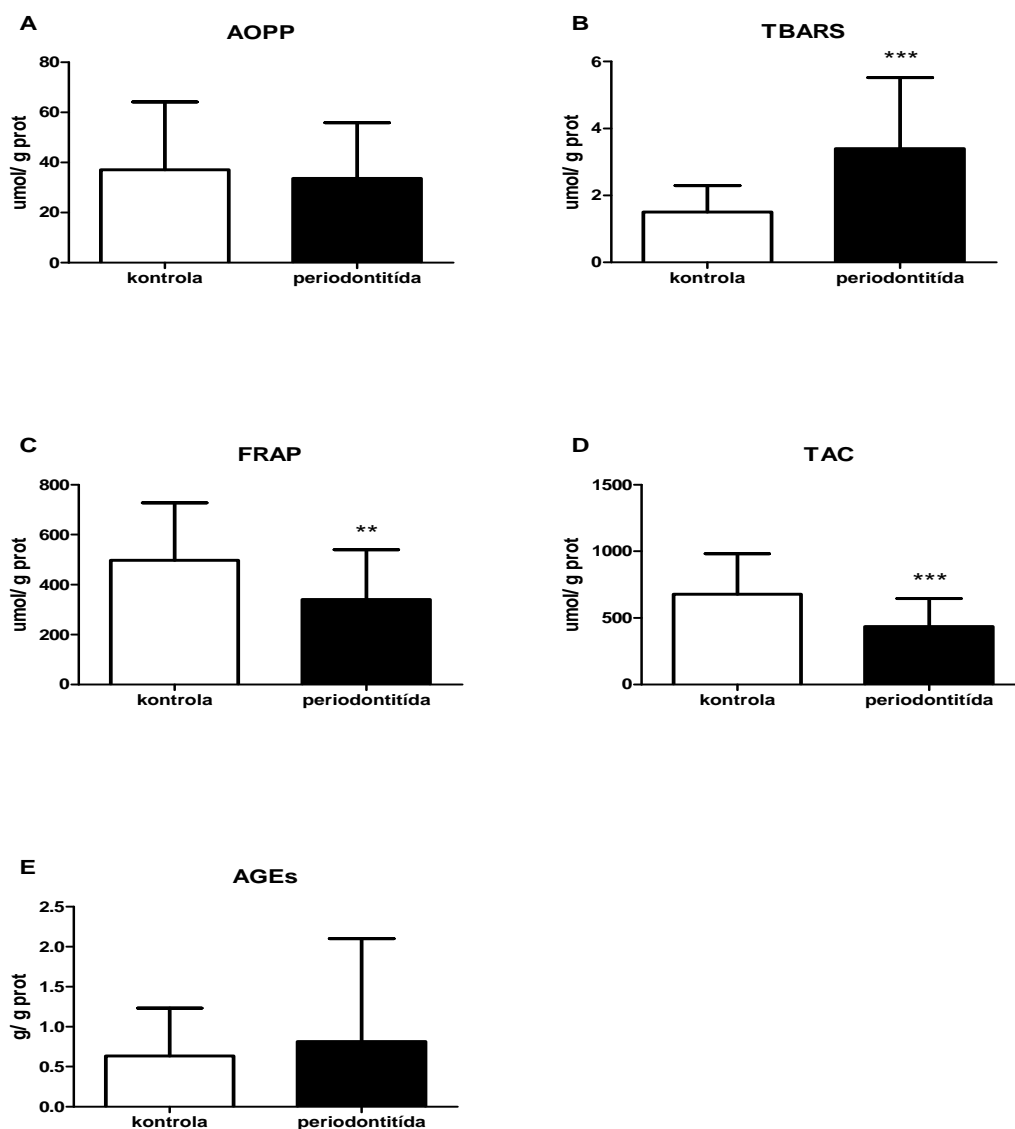
Analýza markerov oxidačného a karbonylového stresu a antioxidačného statusu v slinách pacientov s periodontitídou

Meranie markerov oxidačného poškodenia proteínov AOPP nepreukázalo signifikantné rozdiely medzi skupinami kontrola a periodontitída (Obr. 1A). Koncentrácie TBARS, markerov lipoperoxidácie, boli o 126% vyššie u pacientov s periodontitídou v porovnaní s kontrolnými pacientmi ($p < 0,001$) (Obr. 1B). Naše výsledky sú v súlade s predchádzajúcimi štúdiami, ktoré poukázali na zvýšené množstvo markerov TBARS u jedincov s periodontitídou [11, 12]. Koncentrácie FRAP, markerov antioxidačného statusu, boli o 33,5% vyššie u kontrolných pacientov v porovnaní s pacientmi s periodontitídou ($p < 0,01$, Obr. 1C). Koncentrácie TAC (Obr. 1D) vykazovali signifikantné rozdiely medzi skupinami kontrola a periodontitída ($p < 0,001$). Hladiny TAC boli o 28,6% vyššie u kontrolných pacientov v porovnaní s pacientmi s periodontitídou. Nižšie koncentrácie antioxidačného statusu u pacientov s periodontitídou nepriamo naznačujú zvýšenú tvorbu reaktívnych metabolitov a posun v smere oxidačného stresu. V predchádzajúcich štúdiách salivárneho antioxidačného statusu boli zistené kontroverzné výsledky. V niektorých prácach bol pozorovaný znížený [13, 14] a v iných prácach naopak zvýšený salivárny antioxidačný status [15] u pacientov s periodontitídou. Meranie markerov karbonylového stresu AGEs (Obr. 1E) nepreukázalo signifikantné rozdiely medzi skupinami kontrola a periodontitída.

Analýza mikrofóry v slinách pacientov s periodontitídou

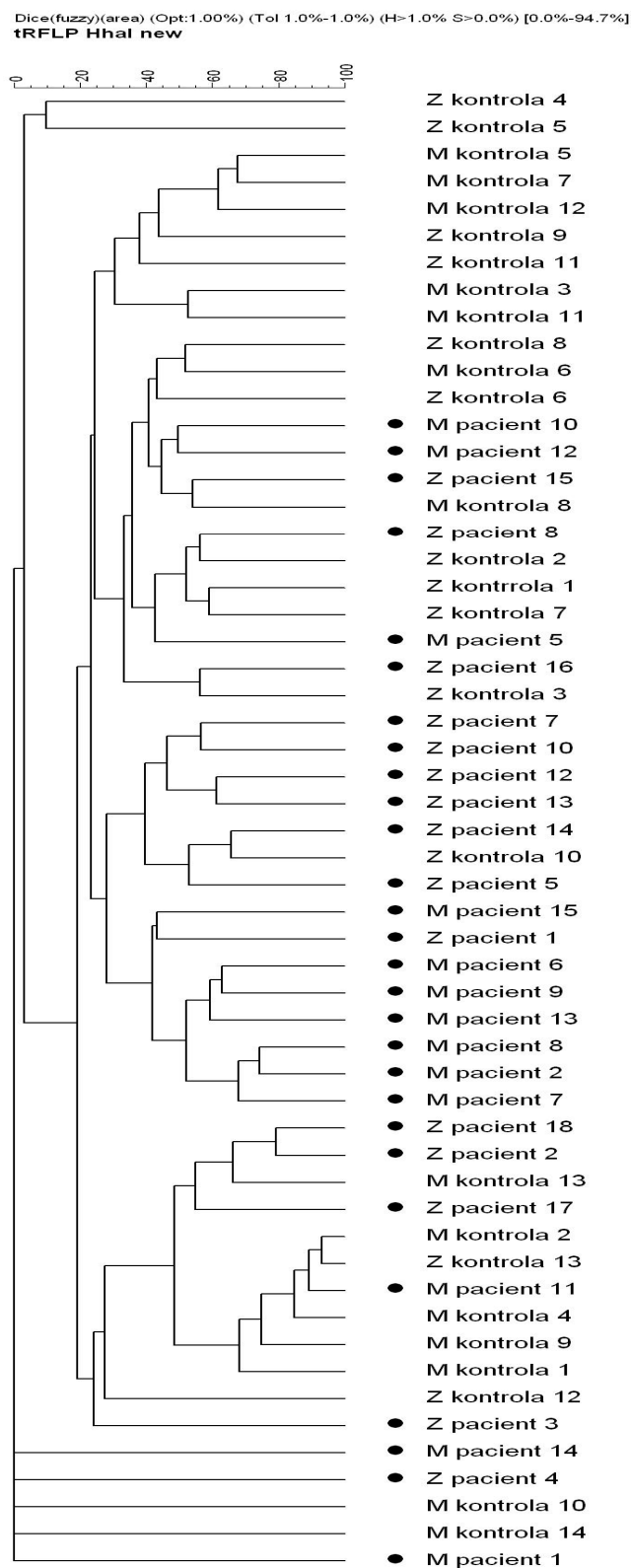
Na základe aplikácie metódy TRFLP sa nám nepodarilo zaradiť zdravých pacientov a pacientov s periodontitídou do dvoch samostatných klastrov. Analýza TRFLP profilov pomocou metódy UPGMA a Diceho koeficientu umožnila zhluknutie 14 z 33 pacientov s periodontitídou do jedného klastra, pričom ženy s periodontitídou tvorili jednu skupinu a muži s periodontitídou tvorili druhú skupinu (Obr. 2). Do TRFLP skupiny žien s periodontitídou bola začlenená aj 1 zdravá pacientka (Z kontrola 10). Ostatní pacienti s periodontitídou boli náhodne zaradení do klastrov spolu so zdravými pacientmi. Aby bolo možné priradiť jednotlivé píky zo získaných TRFLP profilov ku konkrétnym druhom baktérií vyžaduje aplikácia metódy TRFLP ďalšiu optimalizáciu a vytvorenie vlastnej bakteriálnej

TRFLP knižnice. Metóda TRFLP umožňuje analýzu veľkého množstva vzoriek a klastrovanie získaných profilov. Na základe získaných profilov je však problematické sledovať zmeny konkrétnych bakteriálnych druhov. Zároveň nie je možné medzi sebou porovnávať dáta z rôznych štúdií a rôznych laboratórií [16]. V súčasnosti väčšina pracovísk začína využívať high-throughput sekvenovanie, ktorého hlavnou výhodou oproti fingerprintovým technikám je možnosť taxonomickej klasifikácie bakteriálnych sekvencií a možnosť porovnania výsledkov z rôznych štúdií. V budúcnosti by sme preto chceli orálny mikrobióm v týchto vzorkách analyzovať pomocou high-throughput sekvenovania.



Obr. 1: Markery oxidačného stresu, karbonylového stresu a antioxidačného statusu merané v slinách pacientov s periodontitídou a slinách kontrolných pacientov. A) Produkty pokročilej oxidácie proteínov (AOPP), markery oxidácie proteínov. (B) Látky reagujúce s kyselinou tiobarbiturovou (TBARS), markery peroxidácie lipidov. (C) Antioxidačná schopnosť redukovať železitý kation (FRAP), marker antioxidačného statusu. (D) Celková

antioxidačná kapacita (TAC), marker antioxidačného statusu. (E) Koncové produkty pokročilej glykácie (AGEs), markery karbonylového stresu. Dáta sú prezentované ako priemer ± SD. Signifikantné rozdiely medzi skupinami sú označené ** pre $p \sim 0,01$ a *** pre $p \sim 0,001$.



Obr. 2: Dendrogram zobrazujúci výsledok analýzy TRFLP metódou Dice skupín kontrola a periodontitída.
 • = zobrazenie pacientov s periodontitídou.

Záver

Markery peroxidácie lipidov TBARS boli vyššie vo vzorkách slín pacientov s periodontitídou oproti kontrolnej skupine. Antioxidačný status vyjadrený metódami TAC a FRAP vykazoval signifikantne nižšie hodnoty u pacientov s periodontitídou. Analýza bakteriálneho profilu pomocou TRFLP použitím metódy Dice nevykazovala jednoznačné zaradenie pacientov s periodontitídou a jedincov z kontrolnej skupiny do samostatnej im prislúchajúcej skupiny.

Pod'akovanie

Táto práca vznikla za podpory grantu APVV VMSP-II-0027-09.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Rylev M., Kilian M. (2008) *J. Clin. Periodontol.* 35(8 Suppl), p. 346
- [2] Persson G. R., Berglund J., Persson R. E., et al (2011) *Bone* 48(3), p. 552
- [3] Arbes S. J. J., Matsui E. C. (2011) *J. Allergy Clin. Immunol.* 127(5), p. 1119
- [4] Hardham J., Reed M., Wong J., et al (2005) *Vaccine* 23(24), p. 3148
- [5] Pepe H., Balci S. S., Revan S., et al (2009) *Gend Med* 6(4), p. 587
- [6] Baltacioglu E., Akalin F. A., Alver A., et al (2008) *Arch. Oral Biol.* 53(8), p. 716
- [7] Sakamoto M., Huang Y., Umeda M., et al (2002) *FEMS Microbiol Lett* 217(1), p. 65
- [8] Chen L., Teasdale M. T., Kaczmarczyk M. M., et al (2012) *J Microbiol Methods* 91(2), p. 262
- [9] Celec P., Hodossy J., Behuliak M., et al (2012) *Sleep Breath* 16(2), p. 393
- [10] Lane D. J. (1991) In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley and Sons, New York, USA, p. 115
- [11] Baltacioglu E., Akalin F. A., Topaloglu E., et al (2007) *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 104(6), p. 803
- [12] Su H., Gornitsky M., Velly A. M., et al (2009) *Free Radic Biol Med* 46(7), p. 914
- [13] Chapple I. L. C., Mason G. I., Garner I., et al (1997) *Annals of Clinical Biochemistry* 34(4)12
- [14] Sculley D. V., Langley-Evans S. C. (2003) *Clin Sci* 105(2), p. 167
- [15] Su H., Gornitsky M., Velly A. M., et al (2009) *Free Radic. Biol. Med.* 46(7), p. 914
- [16] Hamady M., Knight R. (2009) *Genome Res* 19(7), p. 1141

Antivírusový účinok kynurenových kyselín (KYNA) na *in vitro* replikáciu myšacieho herpetického vírusu MuHV-4

Jana Jarčušková¹, Kristína Plevová³, Zuzana Hrabovská¹, Anna Chalupková¹, Magdaléna Wágnerová¹, Jela Mistríková^{1,2}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská Republika; cipkovaj@fns.uniba.sk

²Slovenská akadémia vied, Virologický ústav, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská Republika

³Slovenská technická univerzita, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Ústav organickej chémie, katalýzy a petrochémie, Oddelenie organickej chémie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská Republika

Abstrakt

Kynurenic acids (KYNA), a tryptofan metabolites identified in mammalian urines at the beginning of the past century, are usually considered as a glutamate receptor antagonists able to reduce the neurotoxic effects of NMDA. In the past twenty years it has been shown, that KYNA are present in the mammalian central nervous system, and that an increase of brain KYNA content is associated with sedation, analgesia and reduction of post-ischemic and post-inflammatory damage. In this report we were study potential KYNA antiviral activity, using murid gammaherpesvirus (MuHV-4) model, by *in vitro* conditions. Our results demonstrated i. decreasing of virus infectious titer and fluorescence signal of infected cells using both (0,05 mg/ml, 0,025 mg/ml) KYNA-1 concentrations, and 0,05 mg/ml of KYNA-3, ii. tested KYNA concentrations had no effect to progress of viral infection.

Kľúčové slová: Murine gammaherpesvirus; antiviral activity; growth curves; plaque titration

Úvod a formulácia cieľa

Herpetické vírusy sú kozmopolitne rozšírené patogény, ktorými je infikovaná majoritná časť ľudskej populácie. V súčasnosti sa do pozornosti dostáva najmä podčľaď *Gammaherpesvirinae*, vďaka onkogénnemu a transformačnému potenciálu mnohých jej členov. Za najvýznamnejších sa považujú vírus Epstein a Barrovej (HHV-4) a vírus asociovaný s Kaposiho sarkómom (HHV-8) – dôležité ľudské patogény. Obidva tieto vírusy sú však druhovo špecifické, čo značne komplikuje ich štúdium. Preto sa záujem sústredil na hľadanie vhodného zvieracieho modelového systému, ktorý by umožnil štúdium patogenézy, imunológie a molekulárnej biológie gamaherpesvírusov v ich prirodzenom hostiteľovi. Jeden takýto systém predstavuje infekcia laboratórnych myší myšacím herpetickým vírusom, ktorý je *in vivo* schopný navodiť produktívnu infekciu v epiteliálnych a fibroblastových bunkách, a *in vitro* sa množí na bunkových líniách derivovaných z rôznych živočíšnych druhov vrátane človeka. V súčasnosti MuHV-4 považujeme za celosvetovo uznávaný model, ktorý slúži na štúdium gamaherpesvírusovej infekcie s prioritným cieľom - vyvinúť účinnú vakcínu a najsť

nové možnosti chemoterapie [1,2]. Z toho hľadiska je nevyhnutné neustále rozširovať počet doposiaľ existujúcich látok s antivírusovým účinkom, ktoré sú syntetizované na mnohých pracoviskách. Jedným z nich je aj ústav organickej chémie, katalýzy a petrochémie na Slovenskej technickej univerzite, odkiaľ nám boli poskytnuté testované látky, tzv. kynurénové kyseliny (KYNA).

KYNA a ich deriváty sú častokrát označované aj ako endogénne neuroprotektanty, pretože vykazujú významnú aktivitu pri blokácii glutamátových receptorov [3, 4], ktorých zvýšená aktivácia bola zaznamenaná v prípade neurodegeneratívnych ochorení ako napr. Alzheimerova, Parkinsonova a Huntingtonova choroba [5]. Keďže štrukturálne sa jedná o látky veľmi podobné chinolónom, u ktorých už bola potvrdená antibakteriálna, antituberkulózná, antiparazitická, antifungálna, antikarcinogénna, ale aj antivírusová aktivita [6] predpokladali sme, že by sa mohla prejaviť aj v ich prípade.

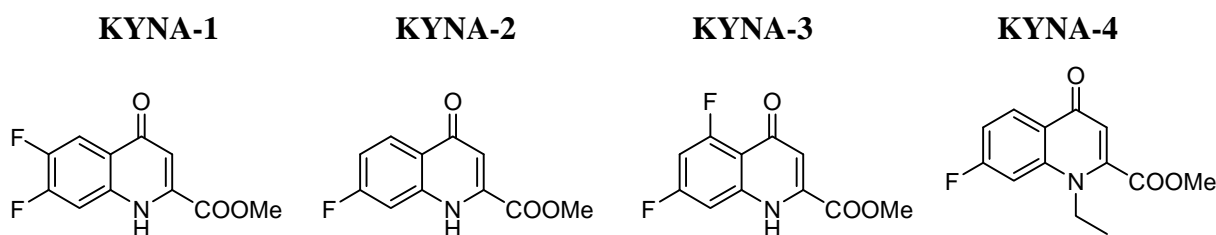
Materiál a metódy

- **Bunková línia VERO** je to stabilizovaná bunková línia, ktorá bola derivovaná v roku 1960 Y. Yasumurom a Y. Kawakitom na Univerzite v Chibe v Japonsku, z tkaniva obličky mačička zeleného (*Cercopithecus aethiops*). Používa sa na produkciu vakcín, transfekciu a detekciu verotoxínov [7].
- **MuHV-4** - myšací herpetický vírus 68 - prototypový kmeň, ktorý bol izolovaný v roku 1976 z myšovitého hlodavca druhu *Clethrionomys glareolus* [8,9]. Pre uľahčenie štúdia bol osekvenovaný jeho genóm, ktorého ľavá časť sa vo väčšej či menšej miere odlišuje od ostatných MHV izolátov [10]. *In vivo* je schopný navodiť latentnú infekciu v slezine ako aj v iných lymfoidných orgánoch infikovaných myší. *In vitro* sa efektívne replikuje v rozličných bežných kontinuálnych bunkových líniiach.
- **Plaková titrácia vírusu** – slúži na kvantifikáciu infekčného vírusu v materiáli, na stanovenie vírusového titra, ktorý udáva počet vírusových častíc na 1 ml vírusovej suspenzie. Bunkovú kultúru sme po infikovaní desiatkovými riedeniami MuHV-4 a jeho 90 min. adsorpcii zaliali karboxymetylcelulózou (CMC) zohriatou na 37°C v prípade retitrácie vírusu. Pri testovaní látok sme použili CMC, v ktorej bola prítomná príslušná koncentrácia KYNA. Po 6. dňoch inkubácie sme takto infikovanú bunkovú líniu zafarbili kryštálovou violetou, pričom miesta, v ktorých sa vírus množil sa javili ako biele ložiská – plaky. Podľa počtu plakov v súvislosti s riedením vírusu sme matematickým postupom stanovili titer vírusu v PFU/ml.

- **Nepriama imunofluorescencia** – je metóda, ktorá sa používa na detekciu a lokalizáciu antigénu v infikovaných bunkách. Vírusový antigén je fluorescenčne vizualizovaný po reakcii so špecifickou primárnou protilátkou, na ktorú sa následne viaže fluorescenčne značená sekundárna protilátka (fluorescenčne značený IgG namierený proti primárnej protilátke).

Výsledky a diskusia

Na testovanie antivírusovej aktivity nám boli Mgr. Plevovou poskytnuté štyri látky tzv. kynurénové kyseliny (KYNA-1, KYNA-2, KYNA-3, KYNA-4) (Obr.1), ktoré sme pred použitím, podľa potreby, rozpustili v rôznych objemoch DMSO. Následne sme sledovali cytotoxický účinok rozdielnych koncentrácií týchto látok na vyrastenú bunkovú jednovrstvu. Dve najvyššie koncentrácie, pri ktorých sa neprejavil žiadny negatívny vplyv na bunky, boli použité v ďalších analýzach. V prípade KYNA-1, 2, 3 sa jednalo o koncentrácie 0,05 mg/ml a 0,025 mg/ml, u KYNA-4 to bola iba jedna koncentrácia 0,0025 mg/ml.



Obr. 1 Chemické vzorce a názvy testovaných kynurénových kyselín. **KYNA-1**: 6,7-difluór-4-oxo-1,4-dihydrochinolín-2-karboxylát metylový, **KYNA-2**: 7-fluór-4-oxo-1,4-dihydrochinolín-2-karboxylát metylový, **KYNA-3**: 5,7-difluór-4-oxo-1,4-dihydrochinolín-2-karboxylát metylový, **KYNA-4**: 1-etyl-7-fluór-4-oxo-1,4-dihydrochinolín-2-karboxylát metylový.

Vplyv kynurénových kyselín na replikáciu MuHV-4 sme najskôr sledovali prostredníctvom plakovej titrácie. Ako kontrola nám slúžila retitrácia vírusu, na základe ktorej sme stanovili titer prototypového kmeňa. Ten sme následne porovnávali s titrami, ktoré dosiahol po pôsobení stanovených koncentrácií jednotlivých antivírusových látok (Tab.1).

Tab. 1 Titer MuHV-4 (PFU/ml) zaznamenaný v retitrácii a po pôsobení rôznych koncentrácií testovaných látok

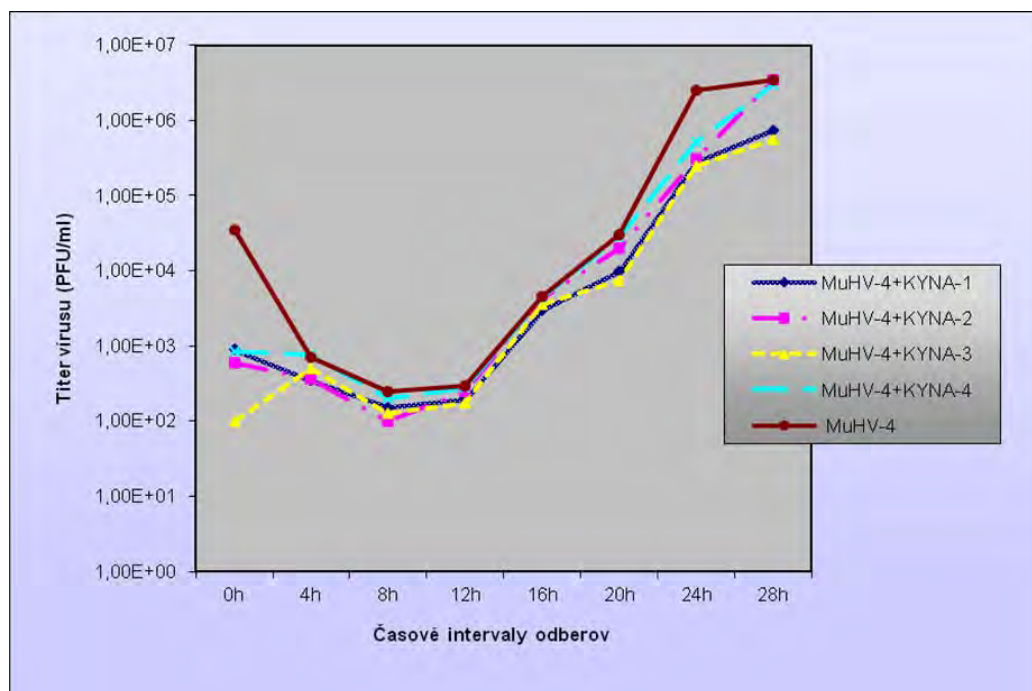
	MuHV-4 + KYNA-1	MuHV-4 + KYNA-2	MuHV-4 + KYNA-3	MuHV-4 + KYNA-4	Retitrácia MuHV-4
--	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	----------------------

0,05 mg/ml	$4,9 \times 10^5$	2×10^6	$5,3 \times 10^5$	ND	$2,75 \times 10^6$
0,025 mg/ml	$7,5 \times 10^5$	$2,25 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	ND	$2,75 \times 10^6$
0,0025 mg/ml	ND	ND	ND	$1,5 \times 10^6$	$2,75 \times 10^6$

ND – not done

Zistili sme, že použité koncentrácie KYNA-2, KYNA-4 a koncentrácia 0,025 mg/ml KYNA-3 neovplyvnili výšku titra MuHV-4, ktorý bol vo všetkých prípadoch porovnateľný s titrom zaznamenaným v retitrácii vírusu. V prípade obidvoch koncentrácií KYNA-1 a koncentrácie 0,05 mg/ml KYNA-3 sme však detegovali pokles vo výške infekčného titra vírusu o jeden logaritmus.

Porovnaním jednostupňových rastových kriviek MuHV-4 sme sledovali vplyv kynurénových kyselín na celkový priebeh vírusovej infekcie (Obr. 2).



Obr. 2 Porovnanie rastovej krivky prototypového kmeňa MuHV-4 s krivkami, zhotovenými po pôsobení rôznych koncentrácií kynurénových kyselín. V prípade KYNA-1, 2 a 3 sa jednalo o koncentráciu 0,05 mg/ml, v prípade KYNA-4 to bola koncentrácia 0,025 mg/ml.

V priebehu 28 hodín sme každé štyri hodiny po infekcii VERO bunkovej línie odobrali intracelulárny (ICV) a extracelulárny (ECV) vírus bez KYNA ako aj s ich obsahom, pričom požadované koncentrácie látok boli k infikovaným bunkám pridané spolu s médiom po adsorpii vírusu. Jednotlivé ICV a ECV odbery sme následne plakovo otirovali a po

odčítaní výsledkov stanovili závislosť výšky infekčného titra vírusu od času odberu jednotlivých vzoriek. Zistili sme, že vyšetrované látky nemali vplyv na celkový priebeh MHV infekcie, čo sa prejavilo podobným priebehom jednotlivých rastových kriviek.

Vírusový antigén v bunkách infikovaných MuHV-4 bez KYNA a v ich prítomnosti sme detegovali prostredníctvom nepriamej imunofluorescencie. Porovnaním intenzity fluorescenčného signálu sme zaznamenali rozdiely, ktoré nám korelovali s vyššie uvedenými výsledkami a síce, že vo väčšine prípadov bol pozorovaný signál porovnateľnej intenzity. Výnimku však tvorili vzorky obsahujúce obidve koncentrácie KYNA-1 a koncentráciu 0,05 mg/ml KYNA-3, pri ktorých sme zaznamenali slabší fluorescenčný signál.

Záver

Napriek tomu, že nami zvolené vyšetrovacie metódy preukázali pokles vo výške infekčného titra o jeden logaritmus a menej intenzívny fluorescenčný signál v infikovaných bunkách pri použití oboch testovaných koncentrácií KYNA-1 a koncentrácie 0,05 mg/ml KYNA-3, nemôžeme ho považovať za signifikantný.

Pod'akovanie

Moje pod'akovanie patrí grantom VEGA 1/1340/12, VEGA 1/0185/11, ktoré prispeli k finančnej podpore tejto práce a Mgr. Plevovej za poskytnutie testovaných látok.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Olivadoti, M., Toth, L.A., Weinberg, J., et al. (2007) *Comparative Medicine* 57(1), p. 44
- [2] Nash, A.A., Dutia, B.M., Stewart, J.P., et al. (2001) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 356(1408), p. 569
- [3] Borza, I., Kolok, S., Galgóczy, K. et al. (2007) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17, p. 406
- [4] Hartai, Z., Juhász, A., Rimanóczy, Á. et al. (2007) *Neurochemistry International* 50, p. 308
- [5] Chen, Y., Guillemin, G.J. (2009) *International Journal of Tryptophan Research* 2, p. 1
- [6] Plevová, K. (2010) Diplomová práca, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Ústav organickej chémie, katalýzy a petrochémie, Oddelenie organickej chémie, p. 89

- [7] Confocal microscopy image gallery [Citované: 6. marec 2013]
<<http://www.olympusfluoview.com/gallery/cells/vero/verocells.html>>
- [8] Blaškovič D., Stančeková M., Svobodová J., Mistríková J. (1980) *Acta Virol.* 24, p. 468
- [9] Mistríková J., Blaškovič D. (1985) *Acta Virol.* 29, p. 312
- [10] Virgin IV H.W., Latreille P., Wamsley P. et al. (1997) *J. Virol.* 71(8), p. 5894

Role of calcium transporters in the process of neurodegeneration

Katarína Jašková^{1,2}, Michal Cagalinec³, Ľubica Lacinová¹, Dana Jurkovičová¹

¹ *Slovak Academy of Sciences, Institute of Molecular Physiology and Genetics, Department of Transport Proteins, Vlárská 5, 833 34 Bratislava, Slovak Republic, katie.jaskova@mail.com*

² *Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Animal Physiology and Ethology, Mlynska dolina, 842 15 Bratislava, Slovak Republic*

³ *University of Tartu, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology, Ravila 19, Tartu, Estonia*

Abstract

Calcium plays an indispensable role in the vital functions of neurons, such as proper neurite outgrowth, adequate signal transmission, control of gene expression and apoptosis. Impaired calcium signaling leads to neurodegeneration, the process of subsequent neuronal dysfunction. *In vitro* model of fibrotic scar serves as a tool for investigating pathological neurodegenerative processes as its biochemical and molecular features are similar to pathological conditions during brain trauma or inflammation. This model is formed after meningeal fibroblasts and cortical astrocyte co-cultivation, which are treated with transforming growth factor β 1 (TGF- β 1). We examined changes in a gene expression of intracellular (IP₃Rs, RyRs, SERCA2) and plasma membrane (NCX) calcium transporters in cerebellar granule neurons (CGNs) and correlation with protein level of IP₃R1. Neurites showed significant reduction in the length in correlation with decreased calcium transporters gene expression. Impact of TGF- β 1 on structural level of IP₃R1 localization was examined as well.

Keywords: *neurodegeneration; calcium transporters; fibrotic scar; IP₃R1 localization.*

Introduction

Neurodegenerative disorders present an enormous medical, social, financial and scientific problem. Despite intense research into the causes of these disorders, only marginal clinical progress has been made and they remain incurable [1]. It is clear that dysregulation of calcium homeostasis compromises the well-being of neuron, because of its substantial importance in the regulation of fundamental neuronal processes as plasticity and the synaptic transmission [2].

For investigation of involvement of calcium transporters in the process of neurodegeneration we adopted an *in vitro* model of fibrotic scar, which is created after astrocytes and fibroblasts co-cultivation and administration of TGF- β 1 as a fibrogenic factor. Fibrotic scar formed by this procedure (brain injury, meningitis) is in its molecular and biochemical features is similar to fibrotic scar formed in damaged CNS [3]. The scar expresses various axonal growth-inhibitory molecules such as Phosphacan, Semaphorin 3A, Neurocan and Tenascin-C which may act as chemical barriers for axonal regeneration [4].

The goal of our interests was to monitor impact of TGF- β 1 on expressional level (mRNA) of calcium transporters (IP₃R1, IP₃R2, RyR1, RyR2, SERCA2, NCX) and functional level (protein) of calcium transporter (IP₃R1) in CGNs after TGF- β 1, 2APB (blocker of IP₃Rs) and LY364947 (blocker of TGF- β 1) administration. We determined impact of TGF- β 1 on morphological level by measuring of neurite outgrowth. Impact of TGF- β 1 on structural level (IP₃R1 localization) we evaluated by confocal image microscopy. Changes in localization of IP₃R1 we determined also in CGNs cultivated on fibrotic scar.

Material and methods

Primary CGNs as well as astrocytes and fibroblasts were isolated from rats (Wistar strain, 2 days old, sex undefined). For isolation of fibroblasts the meninges were stripped from the cortices of 2 day-old neonatal rats and astrocytes were isolated from cerebral cortices after removal of meninges and blood vessels. Dissected meninges were chopped into small pieces, plated on culture flasks 50 ml (Sarstedt, Germany) coated with poly-L-lysine (PLL; Sigma). When meningeal cells were propagated to confluent culture from the sliced small tissue, the cells were dissociated with trypsin, resuspended with culture medium and cultured another 2-12 weeks [3]. Both astrocytes and fibroblasts were cultivated in a BMEM (Basal Modified Eagle Medium) containing 10% fetal bovine serum, L- glutamine and gentamycine (Lonza, Verviers, Belgium). Isolated astrocytes and fibroblasts were co-cultivated both in concentration 5×10^4 cells/dish each. After 7 days of co-cultivation astrocytes and fibroblasts contacted each other and TGF- β 1 (Biomedica s.r.o, Slovakia) in a concentration 10 ng/ml was added to this co-culture to induce creation of fibrotic scar. CGNs were isolated from cerebellum of 8 day-old rats and cultivated in a BMEM with 25 mM KCl. 1-14 days after TGF- β 1 addition CGNs were seeded in a concentration 600 000 cells/dish on already formed fibrotic scar. Cultivation of CGNs on the scar lasted for minimum 2 days. Cells in formed fibrotic scar were cultivated in a culture dishes 60 mm (Sarstedt, Germany) in a cultivation box with a temperature 37°C, 20% O₂, 5% CO₂, 75% N₂. Medium was changed every 2-3 days.

As a methodological approach we used isolation of RNA from the scraped and centrifugated cells, using TriReagent™ (Molecular Research Center, Ltd. USA). After 5 min. the cell homogenate was extracted by chloroform. RNAs in the aqueous phase were precipitated by isopropanol. RNA pellet was washed with 75% ethanol and stored under 96% ethanol at -70°C. The purity and integrity of isolated RNAs were checked on GeneQuant Pro spectrophotometer (Amersham Biosciences, UK). Reverse transcription was performed using

1.5 µg of total RNAs. To monitor gene expression of calcium transporters we used Reverse Transcriptional Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) with RT kit (Amersham Biosciences, UK) and specific pairs of primers for PCR (IP₃Rs, NCX, RyRs, and SERCA2) with GAPDH as a housekeeper gene (Tab.1) and with PCR conditions described in the Tab. 2:

Tab. 1 Primer sequences, their positions and sizes of amplified fragments

Primer	Sequence	Position in a gene	Size
GAPDH1	5'- AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT - 3'	795-814	309 bp
GAPDH2	5'- TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA - 3'	506-525	
IP ₃ R1A	5'- GTG GAG GTT TCA TCT GCA AGC - 3'	70-90	535 bp
IP ₃ R1B	5'- GCT TTC GTG GAA TAC TCG GTC - 3'	573-593	
IP ₃ R2A	5'- GCT CTT GTC CCT GAC ATT G - 3'	3284-3306	361 bp
IP ₃ R2B	5'- CCC ATG TCT CCA TTC TCA TAG C - 3'	3524-3645	
SERCA2A	5'- ATT GTT CGA AGT CTG CCT TCT GTG G - 3'	1489-1522	174 bp
SERCA2B	5'- CAT AGG TTG ATC CAG TTA TGG TAA A - 3'	1648-1672	
NCX1	5'- AGG CGG CTT CTC TTT TAC - 3'	1127-1145	301 bp
NCX2	5'- CGA CTT CCA AAA CCA GAC - 3'	1286-1304	
RyR1A	5'- GAC CAA CAA GAG CAA GTG AAG - 3'	1328-1349	115 bp
RyR1B	5'- CTC TTC TAG AGT GTG GGT CTC - 3'	1421-1442	
RyR2A	5'- CAT CGG TGA TGA AAT TGA AGA - 3'	96-116	129 bp
RyR2B	5'- AGC ATC AAT GAT CAA ACC TTG - 3'	205-225	

Tab. 2 Temperature programs with numbers of PCR cycles for each pairs of primers

Primer	Initial denaturation	Denaturation	Aneling	Polymerization	Final polymerization	Number of cycles
GAPDH	94°C/5 min	94°C/1 min	60°C/1 min	72°C/1 min	72°C/7 min	25
IP3R1	94°C/5 min	94°C/1 min	60°C/1 min	72°C/1 min	72°C/7 min	30
IP3R2	94°C/5 min	94°C/1 min	60°C/1 min	72°C/1 min	72°C/7 min	30
SERCA2	94°C/5 min	94°C/1 min	60°C/1 min	72°C/1 min	72°C/7 min	27
RyR1	94°C/5 min	94°C/1 min	56°C/1 min	72°C/1 min	72°C/7 min	25
RyR2	94°C/5 min	94°C/1 min	56°C/1 min	72°C/1 min	72°C/7 min	25
NCX	94°C/5 min	94°C/1 min	48°C/1 min	72°C/1 min	72°C/7 min	20

PCR product were labelled with a dispensing mixture (0,125% bromphenol blue; 12,5% Ficoll 400; 0,125% xylen-cyanol a 0,1% mol/l EDTA with pH 8,8). Products were analyzed in 2% agarose gel and signals were evaluated by PCBAS 2.0 software (Düsseldorf, Germany).

Protein levels were determined by Western blot analysis. Samples were mixed with Lysing buffer (10 mM Tris HCl, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF and 4% protease inhibitor) and after centrifugation pelet was resuspendet in Lysing buffer with detergent chloridamoniumpersulfate (CHAPS). Samples were mixted for 30 min on ice. Equivalent amounts of total protein were separated by SDS-PAGE on 6% polyacrylamide gels and then transferred to Hybond-P PVDF transfer membranes (Amersham Biosciences, UK) in

0,1 M Tris-base, 0,192 M glycine, and 10% (v/v) methanol using an electrophoretic transfer system.

The membranes were blocked with 5% (w/v) nonfat dried milk in TBS containing 0,1% (v/v) Tween-20 at room temperature for 1 h. After blocking, the membranes were incubated overnight with primary IP₃R1 antibody (1:1000, Affinity BioReagents, USA) followed by washing and subsequent incubation with appropriate HRP-conjugated secondary antibody (1:4000, Pierce) for 1 h at room temperature. Immunoreactive bands (MW 240 kDa) were detected by enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Biosciences, UK) using medical x-ray film blue (Agfa, Belgium). The probed blots were then densitometrically analyzed using a QuantityOne 710 System (Bio-Rad, USA). Values were quantified relatively to the housekeeper gene Actin.

For immunocytochemistry CGNs were grown on glass coverslips and fixed in methanol at -20 °C for 15 min. Nonspecific binding was blocked with PBS containing 1% BSA for 30 min at 37 °C. The cells were sequentially incubated with IP₃R1 primary antibody (1:250, Affinity BioReagents, USA) followed by the secondary anti-rabbit antibody Alexa (1:250, Abcam, UK) each for 1 h at 37 °C, washed three times with PBS. In the case of CGNs grown on fibrotic scar, for separation of CGNs we used primary antibody (Neurofilament, 1:250, Affinity BioReagents, USA) followed by the secondary anti-mouse antibody (1:500, Abcam, UK). Finally, the cells were mounted onto slides in Fluorescent Mounting Medium (Calbiochem, Germany), analyzed by Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope, scanned in multitrack mode and deconvoluted by Huygens software (Scientific Volume Imaging, Netherlands).

Each value represents the average of 5 individual cell preparations. Results were expressed as a mean \pm S.E.M. Statistical differences among groups were determined by one-way analysis of variance (ANOVA). Length of neurites was measured from microscope pictures in Photoshop NeuronJ Imaging software. Each value represents an average of 12 neurites and is expressed as a mean \pm S.E.M. Statistical significance between groups was defined as * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. For multiple comparisons, an adjusted t test with p-values corrected by the Bonferroni method was used (Statistica 7; 14 StatSoft, Czech Republic).

Results and discussion

Results of our experiments demonstrate decrease in a gene expression of all calcium transporters in CGNs by TGF- β 1 (IP₃R1: from $11,5 \pm 2,0$ to $4,0 \pm 1,5$ a. u.; IP₃R2 from $8,2 \pm$

2,2 to $3,2 \pm 0,5$ a. u.; RyR1 from $2,1 \pm 0,5$ to $0,8 \pm 0,1$ a. u.; RyR2 from 6 ± 1 to $2,3 \pm 0,4$ a. u.; SERCA2 from 11 ± 3 to $6,5 \pm 1,5$ a.u.; NCX from $12,9 \pm 2,0$ to $8,6 \pm 0,5$ a. u.). 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB, $10\mu\text{M}$ final concentration) significantly decreased gene expression only IP₃R1 (from $11,5 \pm 2,0$ to 7 ± 2 a.u.) and IP₃R2 (from $8,2 \pm 2,2$ to 6 ± 1 a. u.). Blocker of TGF- β 1 LY-364947 ($5\mu\text{M}$ final concentration) returned mRNA levels of all calcium transporters to the level of control CGNs (Fig. 1).

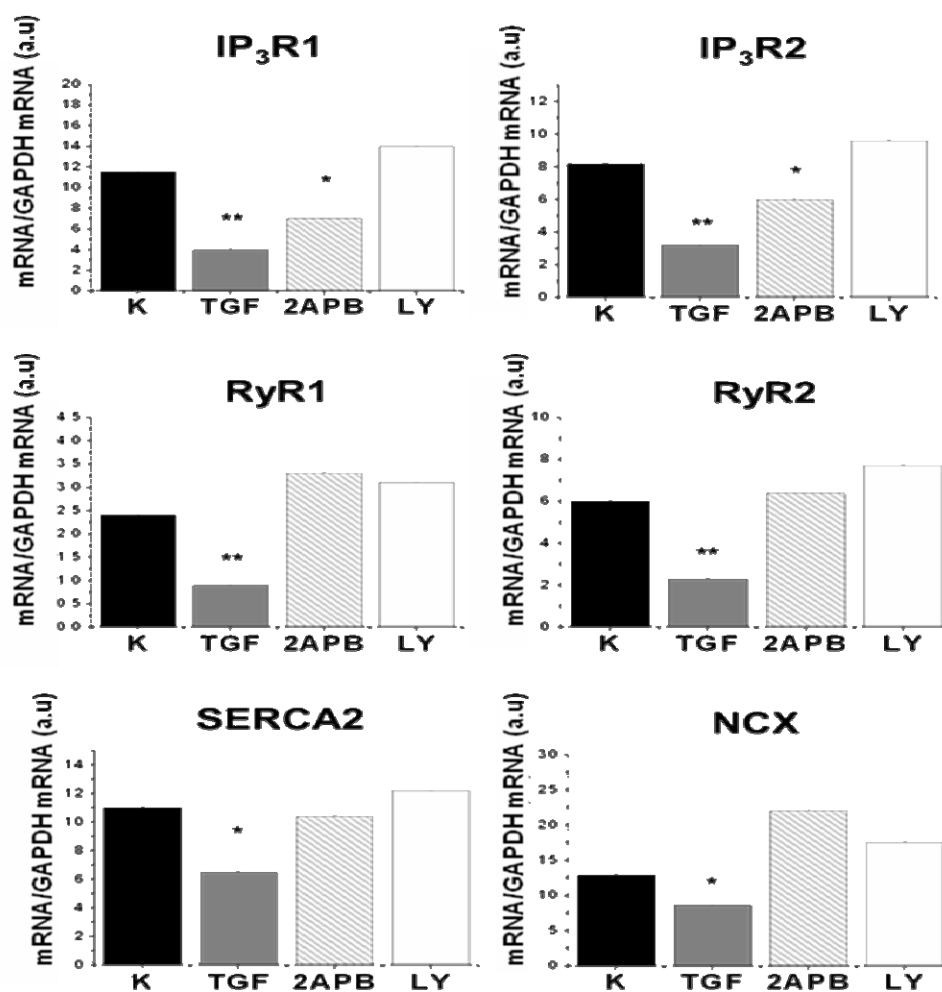


Fig. 1 Changes in mRNA levels of calcium transporters in CGNs controls (K), CGNs influenced by transforming growth factor β 1 (TGF), 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2APB, blocker of IP₃R) and LY364947 (LY, blocker of TGF- β 1). Results are expressed in arbitrary units (a.u). Results are presented as mean \pm SEM.

Statistical significance between control and treated neurons was considered as * $p < 0.05$ versus control and ** $p < 0.01$ versus control. For multiple comparisons, an adjusted t test with p-values corrected by the Bonferroni method was used

We observed also changes in the protein level of IP₃R1 after TGF- β 1 administration compare to control level of the protein (from 10,0 to 0,4), 2APB slightly decreased protein levels (from 10,0 to 8,9) and LY364947 was without effect (Fig. 2).

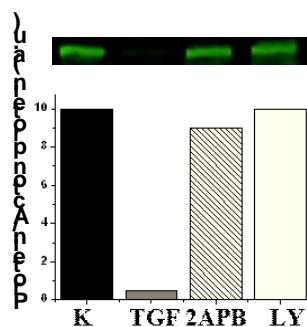


Fig. 2 Changes in protein level of IP₃R1 in CGNs influenced by transforming growth factor β1 (TGF-β1, TGF), 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2APB, blocker of IP₃R) and LY364947 (LY, blocker of TGF-β1). Results are expressed in arbitrary units (a.u).

Confocal microscope images confirmed changes in localization of IP₃R1 in CGNs influenced by TGF-β1. We observed mobilization of IP₃R1 to the nucleus (Fig. 3).

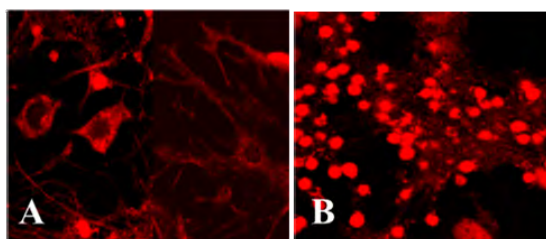


Fig. 3 Changes in a localization of IP₃R1 after transforming growth factor β1 administration (B, 40x magnification) compare to the control CGNs (A, 63x magnification)

Conclusion

Our preliminary results show that the induction of fibrotic scar-like structure upon a TGF-β1 administration led to changes in an expressional, functional, morphological and structural levels of different neuronal calcium transporters.

Acknowledgment

This work was supported by grant VEGA 2/0097/11 and the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-0212-10.

References

- [1] Bezprozvanny I. (2009) Trends. Mol. Med. 15(3), p. 89
- [2] Wojda U., Salinska E., Kuznicki J. (2008) IUBMB Life. 60(9), p.575
- [3] Kimura-Kuroda J., Teng X., Komuta Y., et al. (2010) Mol. Cell. Neurosci. 43(2), p. 177
- [4] Klapka N., Müller H. W. (2006) J. Neurotrauma. 23(3-4), p. 422

Produkcia ľahkého reťazca ľudskej enterokinázy v metylotrofnej kvasinke *Pichia pastoris* 1

Kristína Jiríčková, Ján Krahulec, Diana Hopková, Lucia Bocánová, Zuzana Zvadová, Stanislav Stuchlík, Ján Turňa

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; jirickova@fns.uniba.sk

Abstrakt

Enterokinase (EC 3.4.21.9) is a serin protease, with highly specific substrate recognition properties. It cleaves N-terminus protein from C-terminus after four aspartate and one lysine without leaving any undesirable amino acid residue on N-terminus. Mature form of enterokinase represents heterodimer, which is composed of heavy and light chain. Catalytically more active light chain exhibits great potential for biotechnology use. In this work, an active human enterokinase light chain (EK_L) was produced in secretory form by methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Expression level of EK_L after cultivation in lab-scale fermentor was about 2g/l media. The recombinant EK_L was purified on affinity chromatography and 15 mg pure active EK_L was obtained. The recombinant EK_L is able to replace commercially bovine enterokinase EKMax.

Kľúčové slová: *Pichia pastoris*; serín proteáza; enterokináza; heterologická expresia proteínov

Úvod a formulácia cieľa

Mnohé rekombinantné proteíny, využívané vo farmaceutickom priemysle, sú produkované vo forme fúzných proteínov. Tento spôsob efektívne zlepšuje expresiu, rozpustnosť a purifikáciu biologicky aktívnych proteínov, ktoré boli ťažko exprimované bez fúzneho partnera [1]. Po expresii a purifikácii je potrebné sa zbaviť fúzneho partnera, aby sme získali samotný proteín nášho záujmu v monomérskej forme. Práve tento krok je rozhodujúcim pri dosiahnutí čo najvyššej čistoty a výťažku daného proteínu. Bolo vytvorených niekoľko endoproteáz, ktoré zabezpečia enzymatické odštiepenie fúznej značky [2]. Jedným z enzýmov uskutočňujúcich proteolytické štiepenie fúzneho proteínu je enterokináza.

Enterokináza (EC 3.4.21.9) (EK) je serínová proteáza produkovaná enterocytmami a pohárovými bunkami z kefkovitého okraja tenkého čreva u stavovcov. Aktivuje natívny substrát trypsinogén na trypsin odštiepením N-koncovkej časti peptidu, za ktorým sa nachádza špecifická sekvencia štyroch asparágových kyselín a jedného lysínu (Asp)₄-Lys [3]. EK má vysoko špecifickú rozoznávaciu schopnosť a odštiepuje N-koncový proteín od C-koncového tesne za týmito aminokyselinami, bez zostatku nežiaducich kyselinových zvyškov na N-konci [4]. EK si ponecháva špecifickú aktivitu v prítomnosti viacerých detergentov a denaturačných činidiel, v prostredí so širokým rozmedzím pH a teploty. Vďaka týmto vlastnostiam by mohla byť využívaná ako výborný nástroj v génovom inžinierstve pri štiepení fúzných proteínov. Práve katalyticky aktívny reťazec vykazuje veľký potenciál pre biotechnologické využitie [5].

V našej práci sme sa zamerali na produkciu ľahkého reťazca ľudskej EK (katalytickej podjednotky) v metylotrofnej kvasinke *Pichia pastoris*. Tá sa v posledných rokoch stala obľúbeným expresným systémom na produkciu veľkého množstva až niekoľko gramov rekombinantných proteínov na liter média [6,7]. *Pichia pastoris* kombinuje výhody prokaryotických organizmov (jednoduchá genetická manipulácia, rýchla a finančne menej náročná kultivácia) so schopnosťou eukaryotických organizmov zabezpečiť posttranslačné úpravy a procesingu do maturovanej formy. Navyše rekombinantné proteíny sú bez endotoxínov, onkogénnej alebo vírusovej DNA [8].

Materiál a metódy

Bunky, plazmidy

Pri expresii sme použili bunky *P. pastoris* YGE, ktoré boli pripravené inzeriou plazmidu pGZ-EKh (pGAPZ α C, enterokináza) do divého typu *P. pastoris* Y111430 [9].

Tab. 1 Zoznam plazmidov a kmeňov *P. pastoris* použitých v tejto práci

Kmeň/Plazmid	Popis	Zdroj/Referencia
<i>P. pastoris</i> Y11430 <i>P. pastoris</i> YGE	divý typ <i>P. pastoris</i> Y11430 s inzeriou pGZ-EKh	[9] [9]
pGAPZ α C pGZ-EKh	pUC ori, <i>Sh ble</i> (Zeo ^R), <i>GAP</i> promótor, <i>alfa</i> -faktor pGAPZ α C, enterokináza	Invitrogen [9]

Expresia ľahkého reťazca ľudskej EK v maloobjemovom fermentore Na konštitutívnu expresiu v maloobjemovom fermentore bolo použité chemicky definované médium s prídavkom 1% kvasničného autolyzátu a 2% peptónu. Po sterilizácii bolo dodaných 12 ml.l⁻¹ stopových prvkov PMT1 a 40 ml.l⁻¹ „feed“ média (500 g glycerolu alebo iného uhlíkového zdroja na liter). Kultivácia bola uskutočnená pri teplote 28°C. Vo fáze „fed-batch“ bola glukóza dávkováná v exponenciálnej fáze až po dosiahnutie stacionárnej fázy. Potom bolo dávkovanie konštantné.

Stanovovanie biomasy Jeden mililiter kultúry bol centrifugovaný v skúmavke na minicentrifuge pri maximálnych otáčkach po dobu 3 minút. Médium bolo odstránené a usadené bunky predstavujú vlhkú biomasu (hmotnosť vlhkých buniek). Skúmavka s vlhkou

biomasou bola inkubovaná na 100°C. Usušené bunky predstavujú vysušenou biomasou (hmotnosť suchých buniek).

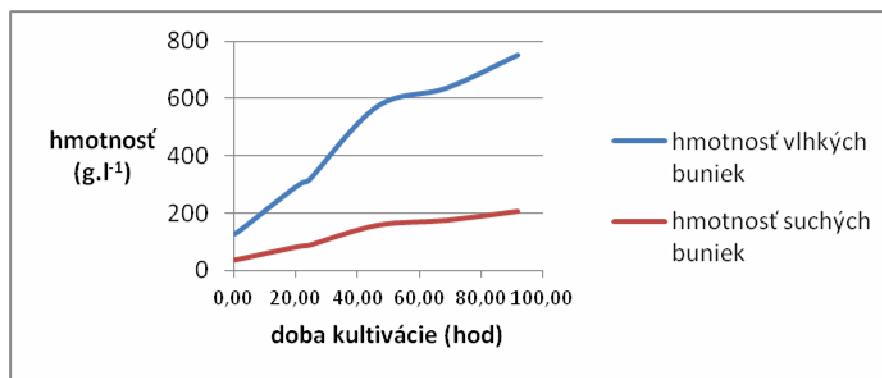
Izolácia a purifikácia ľahkého reťazca ľudskej EK Enzým bol purifikovaný pomocou chromatografie s objemom matrice 5 ml. Na purifikáciu sa využil FPLC ÄKTA Avant 25. Pre IMAC (ion-metal affinity chromatography) boli použité kolóny His-Trap FF a His-Trap HP s objemom 5 ml a na iónomeničovú chromatografiu (anex) bola použitá kolóna HiTrap Q s objemom 5 ml. Afinitné separácie boli robené v prostredí 50 mmol.l⁻¹ K_xPO₄ pH 8; 0,5 mol.l⁻¹ NaCl, pričom elučný roztok bol ešte obohatený o 0,5 M imidazol. Iónomeničové separácie boli robené v prostredí 50 mmol.l⁻¹ Tris-HCl pH 8, pričom boli proteíny separované skokovým gradientom s elúciou pri 200 mmol.l⁻¹. Prostredie v odobraných frakciách bolo upravované pomocou dialýzy do vody.

Stanovenie koncentrácie proteínov Koncentráciu proteínov sme určili spektrofotometricky štandardnou Bradfordovou metódou a kalibráciou s BSA.

Stanovenie aktivity ľahkého reťazca ľudskej EK Aktivita bola stanovovaná denzitometricky ako pomer odštiepeného tioredoxínu (Trx) ku neštiepenému tiorexínu vo fúzii s dermcidínom (Trx-DCD1) v 16% PAGE géli pomocou softvéru CP Atlas. Testované vzorky boli nariadené v 50 mmol.l⁻¹ Tris-HCl pH 8 v pomere 1:4. Následne bol z tohto riedenia odobraný 1 µl a pridaný k 4 µl fúznemu proteínu DCD1-Trx. Štiepenie prebiehalo 1 hodinu pri teplote 37°C. Porovnaním aktivity s komerčnou hovädzou enterokinázou EK Max (Invitrogen) bola stanovená 1 jednotka enterokinázy.

Výsledky a diskusia

Expresia ľahkého reťazca ľudskej EK v maloobjemovom fermentore Pri kultivácii v maloobjemovom fermentore sa postupovalo ako je opísane v časti materiál a metódy. Kultúra bola pestovaná po dobu 92 hodín od inokulácie, kedy dosahovala biomasa približne 750 g.l⁻¹ vo vlhkej forme a 200 g.l⁻¹ v suchej forme, čím sa nám podarilo dosiahnuť vyššiu hustotu buniek ako je opísané v predošlej publikácii [9]. Koncentrácia produkovaného ľahkého reťazca ľudskej EK po fermentácii dosahovala hodnotu 2 g.l⁻¹.



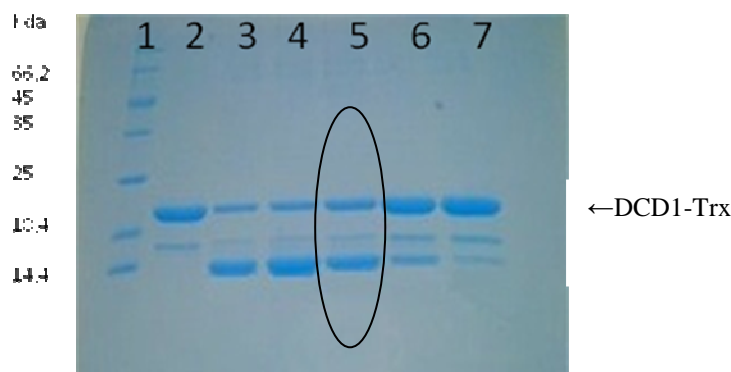
Obr. 1 Priebeh kultivácie vo fermentore

Izolácia ľahkého reťazca ľudskej EK Bunky boli odseparované z biomasy centrifugáciou a následne médium bolo upravené pomocou ultrafiltrácie na prostredie vhodné pre IMAC. Väzba na matricu prebiehala pri teplote 4°C po dobu 16 hodín. Prefiltrovaný eluát bol potom ďalej aplikovaný na anexovú chromatografiu. Použili sme skokový gradient s elúciou 200 mmol.l⁻¹ NaCl, pretože tým bol dosiahnutý vyšší výťažok. Po dôkladnom premytí kolónky s nulovou koncentráciou soli, bola elúcia prevedená 200 mmol.l⁻¹ NaCl a kolónka bola následne regenerovaná 1 mol.l⁻¹ NaCl. Po následnej dialýze do destilovanej vody sme dosiahli výťažok 15 g čistej aktívnej EK.

Stanovenie aktivity ľahkého reťazca ľudskej EK Výsledky štiepenia substrátu DCD1-Trx prostredníctvom ľahkého reťazca ľudskej EK (Obr. 2) a komerčnou hovädzou EKMax (Obr. 3) sme porovnali a vyhodnotili jej aktivitu v 16% PAGE pomocou softvéru CP Atlas. Zistili sme, že aktivita 0,01 U EKMax zodpovedá 0,1 µl rekombinantnej EK z čoho vyplýva, že jedna jednotka (1U) predstavuje 10 µl (10 mg) rekombinantnej EK.



Obr. 2 Štiepenie substrátu DCD1-Trx (2,4 mg/l) s ľahkým reťazcom ľudskej EK. 1. dráha štandard molekulových hmotností, 2. dráha substrát štiepený EK po purifikácii a dialýze (c=1g/l), 3. dráha substrát štiepený EK riedenou v pomere 1:3, 4. dráha dráha substrát štiepený EK riedenou v pomere 1:10, 5 dráha dráha substrát štiepený EK riedenou v pomere 1:30, 6. dráha dráha substrát štiepený EK riedenou v pomere 1:100, 7. dráha dráha substrát štiepený EK riedenou v pomere 1:300



Obr. 3 Štiepenie substrátu DCD1-Trx (2,4 mg/l) s EKMax (Invitrogen). 1. dráha štandard molekulových hmotností, 2. dráha substrát štiepený EKMax riedenou v pomere 1:10, 3. dráha substrát štiepený EKMax riedenou v pomere 1:3, 4. dráha dráha substrát štiepený EKMax riedenou v pomere 1:30, 5 dráha dráha substrát štiepený EKMax riedenou v pomere 1:100, 6. dráha dráha substrát štiepený EKMax riedenou v pomere 1:300, 7. Dráha dráha substrát štiepený EKMax riedenou v pomere 1:1000

Záver

Prostredníctvom konštitutívnej expresie z promotóra glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAP) v hostiteľskom organizme *Pichia pastoris* sa nám podarilo naprodukovať 2 g.l⁻¹ media ľahkého reťazca ľudskej EK. Jeho množstvo po izolácii pomocou afinitnej chromatografie a následnej dialýze dosiahlo hodnotu 15 g. Ukázalo sa, že enzým je schopný nahradiť komerčne dostupnú enterokinázu EKMax.

Pod'akovanie

Táto práca je výsledkom realizácie projektu: “Produkcia biologicky aktívnych látok na báze rekombinantných proteínov (BIOPROT, ITMS 26240220048) na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Terpe, K. (2003) Appl Microbiol Biotechnol., 60(5), p. 523–533
- [2] Lu, D., Yuan, X., Zheng, X., Sadler, J. E. (1997) J Biol Chem, 272(50), p. 31293-31300
- [3] Gasparian, M. E., Bychkov, M. L., Dolgikh, D. A., Kirpichnikov, M. P. (2011) Protein Expr Purif., 79(2), p. 191-196
- [4] Fang, L., Sun, Q. M., Hua, Z. C. (2004) Acta Biochim Biophys Sin., 36(7), p. 513–517
- [5] Shahravan, S. H., Qu, X., Chan, I. S., et al. (2008) Protein Expr Purif., 59(2), p. 314-319

- [6] Macauley-Patrick, S., Fazenda M. L., McNeil, B., et al. (2005) *Yeast*, 22(4), p. 249-270
- [7] Çelik, E., Çalık, P. (2012) *Biotechnol Adv.*, 30(5), p. 1108-1118
- [8] Gellissen, G., Kunze, G., Gaillardin, C., et al. (2005) *FEMS Yeast Res.*, 5(11), p. 1079-1096
- [9] Pepeliaev, S., Krahulec, J., Černý, Z. (2011): *J Biotech.*, 154(1), p.65-75

Kvantitatívna analýza biologického materiálu na forenzné účely

Lenka Jurčišinová¹, Barbara Sviežená²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; jurcisinovalenka@gmail.com

²Kriminalistický a expertízny ústav PZ SR, Oddelenie kriminalistickej biológie a genetickej expertízy, Sklabinská 1, 812 72 Bratislava, Slovenská republika

Abstrakt

Forensic biology uses a lot of methods, but not all are able to determine the type of biological material in a trace. In recent years two novel analyses – mRNA and miRNA profiling – have raised which seem to be able to overcome the limitations of conventional methods. Advantage of RNA-based approach includes greater specificity, analysis through a common assay format, decreased sample consumption, and compatibility with DNA extraction methodologies. In our work, we have tried to identify four body fluids (blood, menstrual blood, vaginal secretions and semen) in a stain using quantitative real-time PCR and a panel of 11 miRNA - miR451, miR16, miR412, miR124a, miR372, miR135b, miR10b, miR891a, miR943, miR507 and RNU6b. Our work represents a pilot study of miRNA-based forensic analysis of particular body fluids.

Kľúčové slová: *miRNA profiling; real-time PCR; body fluids; forensic biology*

Úvod a formulácia cieľa

Genetický základ každého človeka, s výnimkou jednovaječných dvojčiat, je tvorený unikátnou sekvenciou jadrovej DNA. Fakt, že približne 3% jadrového genómu sú vysoko polymorfné je základnou bázou forenznej genetickej analýzy pre účely individuálnej identifikácie osôb. Pomocou STR polymorfizmov v analyzovaných markerových génoch je dnešná forezná genetika schopná určiť pôvodcu biologickej stopy nájdenej na mieste činu. Dôležitá úloha DNA profilizácie nespočíva iba v určení, či sa podozrivá osoba zúčastnila na mieste trestného činu, no taktiež v celosvetovom meradle umožňuje oslobodiť nesprávne obvinené osoby [1].

Pri určitých trestných činoch je kľúčové poznať druh biologickej vzorky z hľadiska hlbšieho objasňovania vyšetrovacích verzií. Identifikované telesné tekutiny v biologických stopách tak slúžia ako výborný ukazovateľ udalosti. Napríklad, krvné stopy by mohli naznačovať rôzne formy boja, napadnutia či vraždy, no identifikácia prítomnosti spermy a vaginálnych sekrétov v rovnakej biologickej vzorke by mohla poukazovať na sexuálne násilie alebo zneužívanie [2].

mRNA profilizácia, ako jedna z možností identifikácie druhu telesných tekutín vo forenznej stope, je prvou metódou, ktorá umožňuje súčasnú koextrakciu DNA a RNA. Takýto spôsob izolácie je veľkou výhodou v porovnaní s doterajšími metódami určovania materiálu

pomocou špecifických prevažne imunochemických skúšok, a to z dvoch dôvodov. Prvým je znížený nárok na spotrebu vzorky (biologická stopa nie je objemovo alebo rozmerovo veľká, čo môže viesť ku spotrebe celej vzorky bez možnosti opakovania analýzy) a druhým je jednoznačná identifikácia pôvodcu zisteného biologického materiálu (pri pôvodných metódach sa na analýzu DNA používa iná časť vzorky ako na analýzu bio-materiálu). Ďalším dôležitým faktorom je nutnosť vysokej špecificity vybraných mRNA markerov, s čím súvisí citlivosť tejto metódy. Aj keď sa táto metóda pokúša riešiť nedostatky konvenčných metód (neschopnosť pozitívne potvrdiť určité telesné tekutiny, veľká spotreba vzorky následnými analýzami, znemožnená súčasná DNA analýza a v neposlednom rade ich časová náročnosť) [3], stálym problémom zostáva degradácia mRNA molekúl ribonukleázami prítomnými v cytoplazme buniek. Existujú štúdie potvrdzujúce stabilitu RNA [4, 5], v skutočnosti prirodzené environmentálne činitele (teplota, UV žiarenie, vlhkosť, dážď) ovplyvňujú stabilitu RNA [5]. Tomuto problému by sa dalo predísť dizajnom kratších testovaných amplikónov, ktoré pomalšie podliehajú degradácii [3].

Eliminácia uvedených nedostatkov bude s veľkou pravdepodobnosťou možná na základe kvantitatívnej analýzy krátkych nekódujúcich RNA molekúl tzv. mikroRNA (miRNA). V roku 2009 bola publikovaná prvá štúdia, ktorá poukázala na potenciálne forenzné využitie tkanivovo-špecifických miRNA [3]. Naším cieľom bolo overiť reprodukovateľnosť dvojice vybraných miRNA pre každú testovanú telesnú tekutinu (periférna krv, menštruačná krv, sperma, vaginálne sekréty) v čerstvých vzorkách a pokúsiť sa miRNA profilizáciu aplikovať na reálne forenzné stopy, ktoré neboli analyzované v žiadnej z doterajších publikovaných štúdií. Treba podotknúť, že v prípade forenzných stôp sa mnohé metodiky navrhnuté pri čerstvom biologickom materiáli nedajú aplikovať bez predchádzajúcej optimalizácie.

Materiál a metódy

Pri našej práci sme používali 4 druhy telesných tekutín – periférna krv (30 μ l, čerstvá), menštruačná krv (vatová tyčinka, zamrazená), sperma (50 μ l, zamrazená) a vaginálne sekréty (vatová tyčinka, zamrazená). Pracovali sme s čerstvými vzorkami, zmiešanými a foreznými stopami.

Na izoláciu celkovej RNA obohatenej o miRNA sme používali sadu reagensí *miRNeasy Mini kit* (Qiagen). Z každej izolácie sme získali 30 μ l roztoku, z ktorého sme 10 μ l použili na tvorbu cDNA pomocou sady reagensí *miScript II RT kit* (Qiagen). Vzniknutú cDNA sme podľa potreby nariedili.

Nariedená cDNA slúžila ako templát na kvantifikáciu jednotlivých miRNA pomocou *real-time* PCR. Pre tento účel sme použili sadu reagensí *miScript SYBR Green PCR kit* (Qiagen) a panel 11 miRNA, ktoré boli súčasťou *miScript Primer Assay* (Qiagen). Real-time cyklér sme naprogramovali podľa tab. č. 1.

Po kvantifikácii sme získali C_T hodnoty jednotlivých miRNA, ktoré boli normalizované pomocou vzorca [I.], kde C_{TM} predstavuje C_T hodnotu miRNA a $C_{T\ RNU}$ je C_T hodnota housekeeping génu.

$$\Delta C_{TM} = C_{T\ RNU} - C_{TM} \quad [I.]$$

ΔC_T hodnoty nám slúžili na interpretáciu výsledkov pomocou programu Microsoft Excel 2010.

Tab. č. 1 Teplotný program pre real-time PCR

Krok	Čas	Teplota
Aktivačný krok	15 min	95°C
3krokový cyklus:		
Denaturácia	15s	94°C
Anelácia	30s	55°C
Extenzia	30 alebo 34s	72°C
Počet cyklov	40	

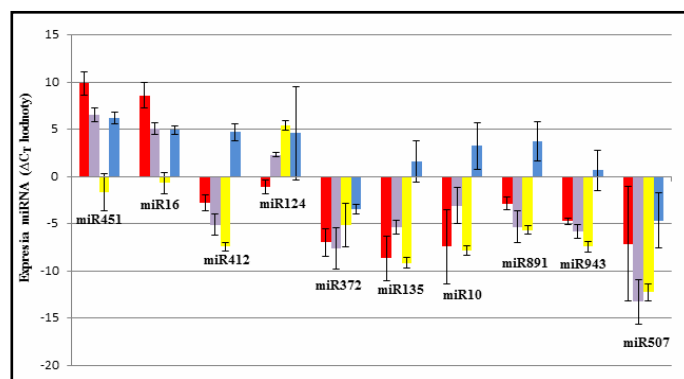
Výsledky a diskusia

V našom laboratóriu pokračujeme vo výskume využitia miRNA profilizácie vo forenznej praxi. Výsledky z doterajšieho výskumu naznačujú, že miRNA profilizáciou sme schopní detegovať periférnu krv, menštruačnú krv a vaginálne sekréty vo forezných stopách. Na druhej strane miR135b a miR10b nie sú vhodnými kandidátmi na identifikáciu spermy v týchto stopách [6]. Prvotnou úlohou bolo zistiť, či sú všetky vybrané miRNA špecifické pre dané telesné tekutiny, konkrétne: periférna krv (miR16, miR451), menštruačná krv (miR412), vaginálne sekréty (miR124, miR372), sperma (miR135b, miR10b, miR891a, miR943, miR507). RNU6b (snRNA) slúžila ako vnútorná kontrola a housekeeping gén pre normalizáciu.

Z našich výsledkov vyplýva (obr. č. 1):

- v krvi: expresia potvrdená u miR451 a miR16, ostatné miRNA sú nízko exprimované;

- v menštruačnej krvi: pomerne vysoká expresia krvných markerov (miR451 a miR16); nižšia expresia miR412 než v periférnej krvi;
- vo vaginálnych sekrétoch: najvyššia expresia miR124 z pozorovaných telesných tekutín; nízka expresia miR372 vo všetkých testovaných telesných tekutinách.
- v sperme: najvyššia expresia preukázaná pri miR891 a miR10b; z testovaných spermatických markerov má najnižšiu expresiu miR507; prekvapivá expresia krvných markerov (miR16, miR451); detekcia vysokej exprese menštruačného markera miR412.



Obr. č. 1 Určenie exprese testovaných miRNA v štyroch telesných tekutinách (červená – krv, fialová – menštruačná krv, žltá – vaginálne sekréty, modrá – sperma)

Za účelom potvrdenia reprodukovateľnosti tejto metódy sme namerané ΔC_T hodnoty príslušných miRNA zo samostatných vzoriek použili na tvorbu rozptylových grafov. Zistili sme, že merania prislúchajúce rovnakej telesnej tekutine vytvárajú zoskupenia, čo bolo preukázané už v roku 2009 [3]. Ďalej sme potvrdili vhodnosť dvojice miR124 a miR16 na identifikáciu menštruačnej krvi. Kombinácia týchto dvoch miRNA spôsobuje jednoznačné oddelenie krvných vzoriek od menštruačných. V súčasnosti nie je možná identifikácia menštruačnej krvi. V prípade spermatických vzoriek sme testovali všetky kombinácie dvojíc miRNA (miR135b, miR10b, miR891, miR943, miR507) prebraných z publikácií dvoch rôznych autorov, ktorí začali túto problematiku skúmať [3, 7]. Kombinácie dvojíc miRNA zo štyroch spermatických markerov (miR135, miR10, miR891, miR943) vytvárali v rozptylových grafoch samostatné zoskupenia. V prípade kombinácií s miR507 sme získali falošne pozitívne výsledky, preto sme túto miRNA vyradili z nášho ďalšieho testovania.

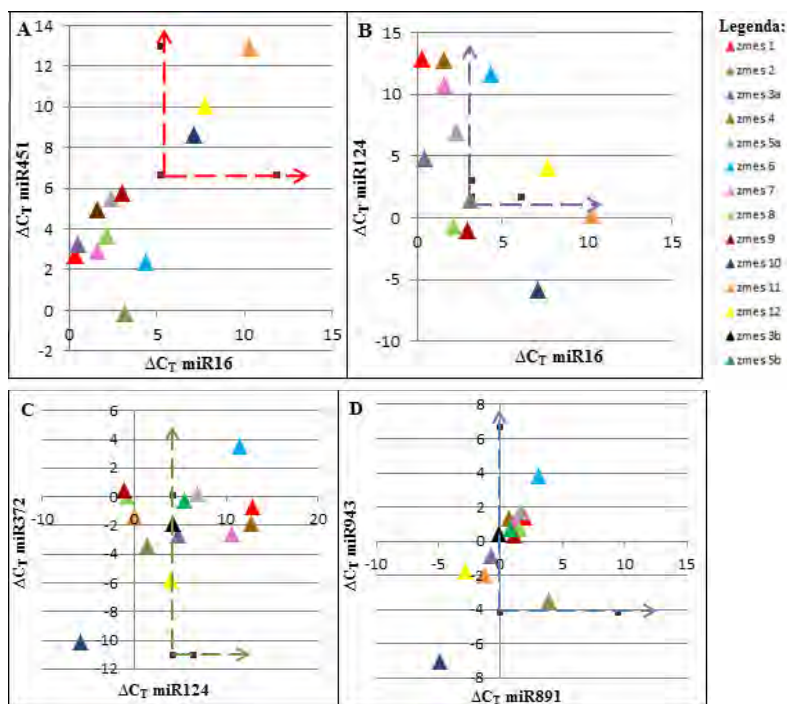
Všetky testované miRNA sme analyzovali v simulovaných zmiešaných vzorkách s rozdielnym zastúpením telesných tekutín z dôvodu potenciálneho zmiešaného charakteru forenzných stôp. Na interpretáciu výsledkov sme použili už vytvorené rozptylové grafy.

Zistili sme, že:

- pri identifikácii spermy nie je možné pozitívne určiť žiadnu vzorku obsahujúcu spermu.
- pri krvných vzorkách sme pozorovali tvorbu niekoľkých falošne negatívnych výsledkov.
- naopak falošne pozitívne výsledky sme detegovali pri identifikácii menštruačnej krvi a vaginálnych sekrétov.

Na základe týchto výsledkov sme konštatovali, že takýto postup testovania nie je vhodný.

Napriek tomu, že sme získali odlišné výsledky zo zmiešaných stôp, aplikovali sme tieto rozptylové grafy na forenzné stopy. Špecifickými skúškami (Hemdirect – krv, PSA – sperma) sme identifikovali telesné tekutiny a miRNA profilizáciou sme sa snažili overiť získané výsledky. Periférnu krv sme identifikovali v troch z piatich pozitívne otestovaných vzorkách (obr. č. 2 A). V zmesi 8 a 9 sme namiesto periférnej krvi detekovali prítomnosť spermy (obr. č. 2 D).



Obr. č. 2 A, B, C, D: Identifikácia prítomnosti telesných tekutín vo forenzných vzorkách. Obr. 2 A preukazuje identifikáciu periférnej krvi. Falošne pozitívne výsledky identifikácie menštruačnej krvi (obr. 2 B). Obr. 2 C zobrazuje identifikáciu vaginálnych sekrétov. Identifikácia spermy pomocou miR891 a miR943 (obr. 2 D). Prerušované čiary naznačujú špecifické oblasti identifikácie jednotlivých telesných tekutín (červená – krv, fialová – menštruačná krv, zelená – vaginálne sekréty, modrá – sperma)

Identifikáciou menštruačnej krvi sme získali dva falošne pozitívne výsledky, ktoré vyžadujú opätovnú analýzu (obr. č. 2 B, zmes 6 a 12). Vaginálne sekréty sme detekovali v takmer všetkých overených spermatických vzorkách a v zmesiach 6 a 7 (obr. č. 2 C). Prítomnosť spermy sme potvrdili vo všetkých spermatických vzorkách a v zmesi 6 a 7 (obr. č. 2 D), ktoré potenciálne mohli obsahovať spermu aj keď nebola pozitívne identifikovaná špecifickou skúškou PSA.

Záver

Naša práca predstavuje pilotnú štúdiu analýzy forezných stôp miRNA profilizáciou. Veľkým prínosom oproti doterajším (konvenčným) metódam je možnosť odlíšenia menštruačnej krvi od periférnej krvi a taktiež identifikácia vaginálnych sekrétov vo forezných stopách. Zistili sme, že miR891 a miR943 sú vhodnejšími kandidátmi na pozíciu špecifických spermatických markerov. Vysoká špecificita markerov zvyšuje citlivosť danej metódy, ktorá je kľúčovou podmienkou zavedenia metódy do rutinej foreznej praxe. Na základe našich výsledkov odporúčame optimalizovať metódu aj zvýšením počtu darcov biologického materiálu.

PodĎakovanie

Táto štúdia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti bezpečnostného výskumu kód ITMS: 26240120034, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Kayser M., de Knijff P. (2011) *Nat. Rev. Genet.* 12(3), p. 179
- [2] An J. H., Shin K. J., Yang W. I., Lee H. Y. (2012) *BMB Rep.* 45(10), p. 545
- [3] Hanson E. K., Lubenow H., Ballantyne J. (2009) *Anal. Biochem.* 387(2), p. 303
- [4] Zubakov D., Hanekamp E., Kokshoorn M., et al. (2008) *Int. J. Legal Med.* 122(2), p. 135
- [5] Setzer M., Juusola J., Ballantyne, J. (2008) *J. Forensic Sci.* 53(2), p. 296
- [6] Hrbíková K. (2012) Identifikácia druhu biologického materiálu v stope z miesta činu analýzou RNA. (Diplomová práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p. 64
- [7] Zubakov D., Boesma A. W. M., Choi Y., et al. (2010) *Int. J. Legal Med.* 124(3), p. 217

Izolácia a charakterizácia kmeňových buniek z tukového tkaniva

Michal Jurík¹, Drahomír Palenčár², Ľudevít Kádaši¹, Andrea Šoltýsová¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; michal.jurik2@gmail.com

²Klinika plastickej, estetickej a rekonštrukčnej chirurgie - FN Bratislava, Ružinovská 6, 826 06 Bratislava, Slovenská republika

Abstrakt

Advanced Cell-based therapies such as tissue engineering will benefit from a source of autologous multipotent stem cells. For mesodermal tissue engineering, one source of cells is the bone marrow stroma. The bone marrow compartment contains several cell populations, including mesenchymal stem cells (MSCs). An alternate source of autologous adult stem cells that is obtainable in large quantities, under local anesthesia, with minimal discomfort is adipose tissue obtained by liposuction. By 3 methods we can obtain a fibroblast-like population of cells, that can differentiate *in vitro* into adipogenic, chondrogenic, myogenic, and osteogenic cells in the presence of lineage-specific induction conditions.

Kľúčové slová: mezenchymatické kmeňové bunky; tukové tkanivo; *in vitro* diferenciácia

Úvod a formulácia cieľa

Kmeňové bunky majú unikátne vlastnosti ako potenciál diferencovať sa na všetky bunkové typy ľudského organizmu v raných fázach vývinu (obmedzene aj počas celého života) a schopnosť sebaobnovy. Počas života slúžia ako reparačný systém tkanív a orgánov, vďaka svojmu neobmedzenému deleniu a spomínanej schopnosti sebaobnovy. Rozoznávame dva základné typy kmeňových buniek : embryonálne kmeňové bunky (embryonic stem cells, ESCs), ktoré sú izolované z vnútornej bunkovej masy blastocysty, a dospelé kmeňové bunky (adult stem cells, ASCs), ktoré môžeme nájsť v rôznych typoch už diferencovaných tkanív. Za tretí typ môžu byť považované indukované pluripotentné kmeňové bunky [1], ktoré vznikajú dediferencovaním somatických buniek na stav podobný embryonálnym kmeňovým bunkám.

Objav možnosti pestovať embryonálne kmeňové bunky [2] naštartoval progresívny výskum v tejto oblasti a vznik nového odvetvia - regeneratívnej medicíny [3]. Keďže použitie a komerčné využitie embryonálnych kmeňových buniek je kontroverzné a v niektorých krajinách trestným činom, pozornosť sa upriamila práve na adultné (mezenchymatické) kmeňové bunky, ktoré môžu byť získané z tela pacienta a ďalej použité na terapiu. Hlavným zdrojom takýchto buniek je kostná dreň, pupočníková krv ale aj tukové tkanivo [4]. Tukové tkanivo sa ukazuje byť vhodným alternatívnym zdrojom kmeňových buniek hlavne vďaka jednoduchšej dostupnosti, keďže punkcia kostnej drene môže byť pre pacienta značne nepohodlná a bolestivá.

Hlavným cieľom našej práce bolo optimalizovať a preveriť jednotlivé metódy izolácie

mezenchymálnych kmeňových buniek z tukového tkaniva a následne overiť ich schopnosť multilineálnej diferenciácie. Ďalším cieľom bolo overenie ich viability a schopnosti diferencovať sa v 3D nosičoch, akým je napríklad fibrínový scaffold.

Materiál a metódy

Ako zdroj mezenchymatických kmeňových buniek nám slúžilo tukové tkanivo - lipoaspirát (LA), získaný z *Kliniky plastickej, estetickej a rekonštruktívnej chirurgie*, Fakultnej nemocnice Ružinov. Všetky vzorky tuku boli získané invazívnou liposukciou, vďaka čomu bolo celkové poškodenie buniek minimálne. Objem lipoaspirátu, miesto odberu ako aj vek a pohlavie darcov varíroval.

„MINIMÁLNA METÓDA“ IZOLÁCIE - (A)

100ml lipoaspirátu bolo scentrifugovaných pri 1200 x g po dobu 3 minút. Následne došlo k frakcionalizácii lipoaspirátu. Pelet spolu s niekoľkými mililitrami roztoku bol odobratý a premytý PBS. Po ďalšej centrifugácii bol pelet rozsuspendovaný v kultivačnom médiu (DMEM+10%FBS+1x Antibiotikum/antimykotikum mix) a nasadený do kultivačnej fľaše s kultivačným povrchom 175cm².

IZOLÁCIA ENZYMATICKOU DIGESCIOU KOLAGENÁZOU (C)

K 100ml LA bolo pridaných 50ml PBS spolu s 0,1% kolagenázou (finálna koncentrácia) a antibiotikom/antimykotikom (finálna koncentrácia anti-anti, 3,3x). K účinnejšej enzymatickej digescii bola použitá inkubácia na trepačke pri 37°C 2 hod.. Po enzymatickej digescii bolo nutné inaktivovať enzymovú aktivitu kolagenázy. Na tento účel postačilo 50ml kultivačného média. Na zachytenie väčších kusov tukového tkaniva bola použitá filtrácia cez 4vrstvy sterilnej gázy. Enzymaticky poštiepený a prefiltrovaný lipoaspirát bol scentrifugovaný pri 210 x g po dobu 10min. Pelet premytý v PBS roztoku, scentrifugovaný a následne rozsuspendovaný v kultivačnom médiu a vysadený do 175cm² kultivačnej fľaše.

IZOLÁCIA ENZYMATICKOU DIGESCIOU TRYPSÍNOM - (F)

2x 50ml lipoaspirátu bolo nechaných počas 2 hodín pri RT (izbovej teplote). Došlo k spontánnej frakcionalizácii a približne 20-25ml spodných frakcií roztoku a tuku bolo ponechaných vo falkónke. Trypsín bol pridaný do celkového objemu 30ml. Nasledovala stacionárna inkubácia pri 37°C po dobu 2 hodín. Ako v predchádzajúcom prípade po centrifugácii (210x g/ 10min) bol odobratý pelet, ktorý bol premytý PBS a následne rozsuspendovaný v kultivačnom médiu.

DIFERENCIÁCIA (*in vitro*)

Bunky boli vysiate na 6-jamkovú platničku s hustotou 10⁴/cm². Po 2-3dňoch

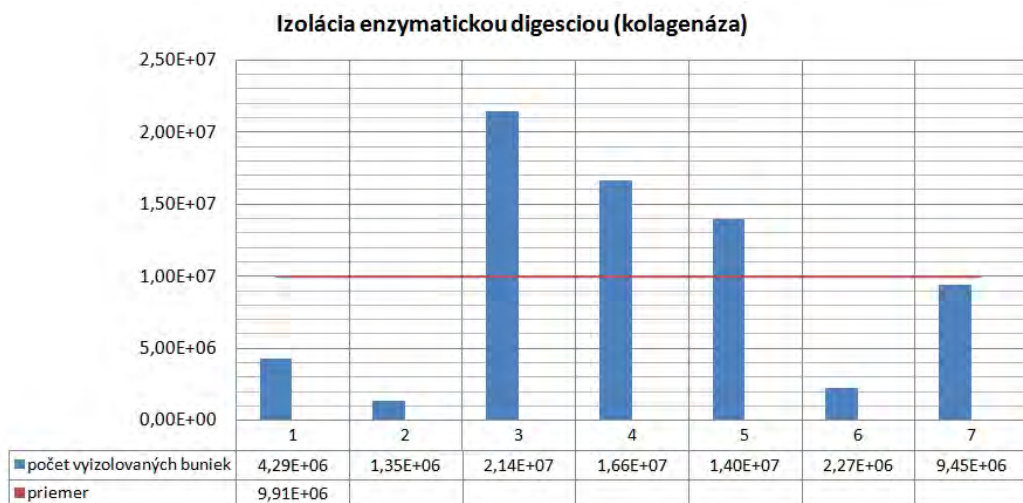
kultivácie bolo médium odpipetované a pridané indukčné/diferenciačné médium. K adipogénnej, chondrogénnej a osteogénnej diferenciácii bolo použité médium STEMPRO® Differentiation Kit (Gibco). Na myogénnú diferenciáciu bolo použité DMEM +10%FBS s 50 μ M hydrokortizónom. Neurogénna diferenciácia vyžadovala použitie preindukčného (DMEM+10%FBS+1mM BME) a indukčného média (DMEM+10%FBS+5-10mM BME).

Výsledky a diskusia

Počas 10 mesiacov sme získali 7 vzoriek tukového tkaniva, ktoré sa líšili objemom, miestom odberu, vekom pacientov a samotným vzhľadom. Pomocou použitých metód sme vyzolovali heterogénnu bunkovú populáciu, tzv. stromálnu vaskulárnu frakciu, ktorá je bohatá práve na mezenchymatické bunky. Pri prvej izolácii sme testovali viacero modifikácií použitých metód, ale ďalej sme postupovali už iba tromi metódami, ktoré sa ukázali ako najefektívnejšie. V tabuľke (**Tab. 1**) sú uvedené metódy a výťažky z rôznych objemov lipoaspirátu. Pre porovnanie, je uvedený prepočet na 50ml. Ako najefektívnejšia metóda sa ukázala izolácia enzymatickou digesciou pomocou kolagenázy (označená ako „C“). V priemere bolo touto metódou získaných 9,91.10⁶ buniek po 13dňoch kultivácie z 50ml LA (**Obr. 1**). Všetky izolácie boli uskutočnené v čo najkratšom čase od liposukcie (max 3h). Podľa nedávneho výskumu [5], by sa mala obohatiť frakcia MSCs v uskladnenom LA pri 4°C/24h bez prístupu kyslíka. Práve preto bola uskutočnená siedma izolácia v čase 3 a 21 hodín od liposukcie 3 metódami z 25ml LA. (**Obr. 2**) Z grafu jasne vidno, že v prípade izolácie metódou „C“ (enz. digescia kolagenázou) došlo niekoľkonásobne vyššiemu výťažku po uskladnení LA (21h/4°C).

Tab. 1 - Výťažky izolácii

izolácia	objem LA	výťažok	prepočet	izolácia	objem LA	výťažok	prepočet
A1	100ml	2,6.10 ⁶	1,3.10 ⁶	F5	50ml	3.10 ⁴	3.10 ⁴
C1	100ml	8,58.10 ⁶	4,29.10 ⁶	A6	100ml	3,8.10 ⁴	1,9.10 ⁴
F1	100ml	6,65.10 ⁶	3,33.10 ⁶	C6	100ml	1,9.10 ⁷	9,45.10 ⁶
C2	100ml	2,7.10 ⁷	1,35.10 ⁶	F6	100ml	4,5.10 ⁴	2,25.10 ⁶
A3	50ml	1,09.10 ⁷	1,09.10 ⁷	A7	25ml	1,9.10 ⁶	3,8.10 ⁶
C3	50ml	2,14.10 ⁷	2,14.10 ⁷	A7:21	25ml	3.10 ⁴	6.10 ⁴
F3	50ml	3,52.10 ⁷	3,52.10 ⁷	C7	25ml	1,36.10 ⁶	2,27.10 ⁶
A4	50ml	6,24.10 ⁶	6,24.10 ⁶	C7:21	25ml	9,48.10 ⁶	1,9.10 ⁷
C4	50ml	1,66.10 ⁷	1,66.10 ⁷	F7	25ml	6,85.10 ⁵	1,37.10 ⁶
A5	50ml	2,5.10 ⁴	2,5.10 ⁴	F7:21	25ml	3.10 ⁴	6.10 ⁴
C5	50ml	1,4.10 ⁷	1,4.10 ⁷				

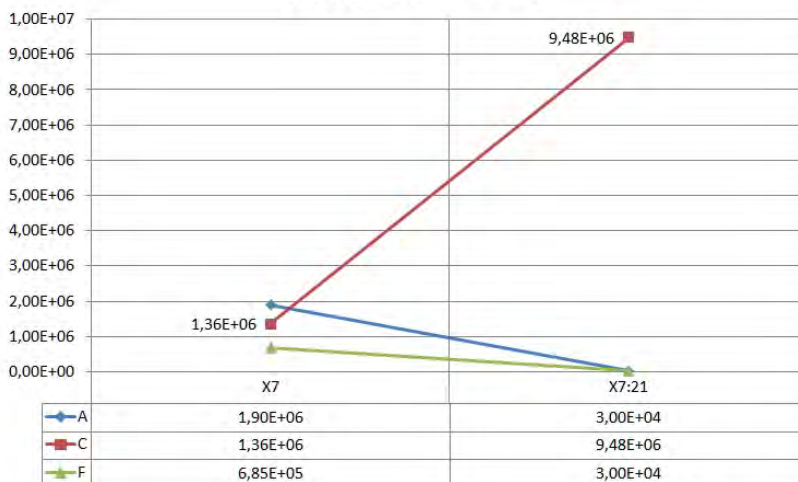


Obr. 1 Výťažok enz. digesciou - Môžeme vidieť ako sa menil výtťažok pomocou metódy enz. digesciou kolagenázou (C) v jednotlivých izoláciách. Červená priamka predstavuje priemernú hodnotu ($9,91 \cdot 10^6$) vyizolovaných buniek po 13dňoch kultivácie.

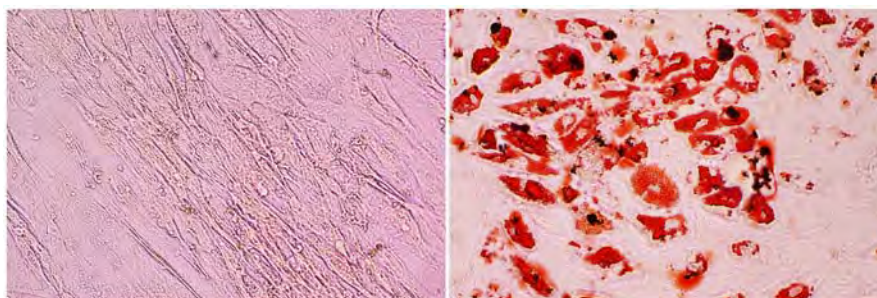
3h od liposukcie

21h od liposukcie

Obr. 2 Výťažky izolácie z uskladneného LA



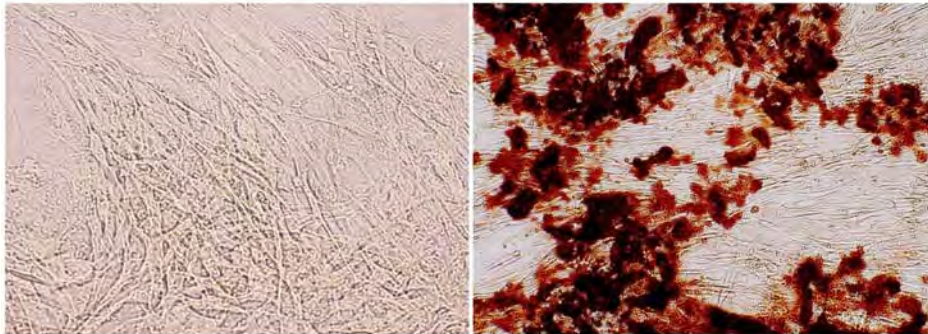
Vyizolovanie kmeňových buniek bolo overené multilineálnou diferenciáciou (**Obr. 3, 4, 5**), ktorá je ich typickou vlastnosťou. Úspešne sa nám podarilo kmeňové bunky diferencovať na adipocyty, chondrocyty a osteoblasty, čo sme dokázali špecifickým farbením.



Obr. 3 Adipogénna diferenciácia - špecifické zafarbenie lipidov Oil Red O farbením (vľavo - negatívna kontrola)

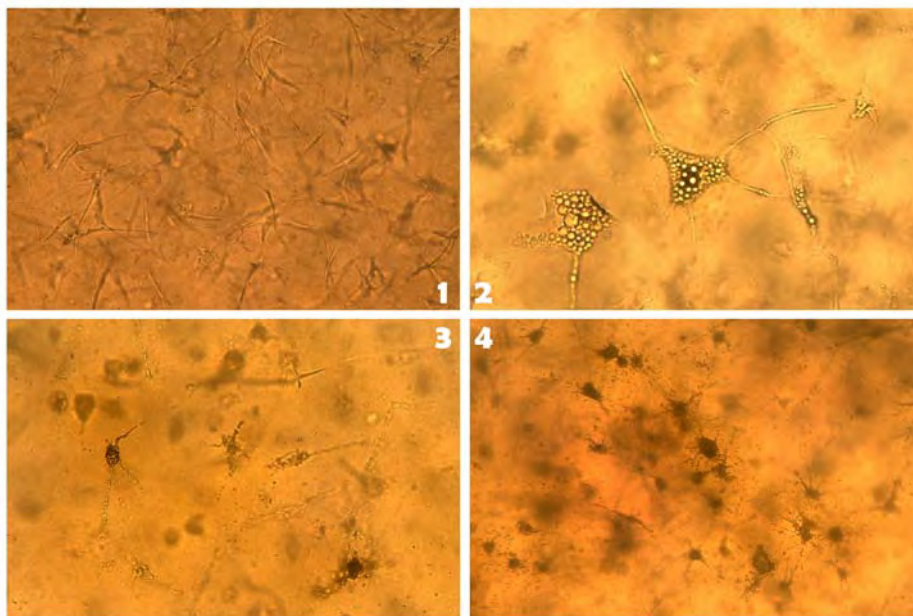


Obr. 4 Chondrogenná diferenciácia - špecifické farbenie Alcian blue indikuje syntézu proteoglykánov (vľavo negatívna kontrola)



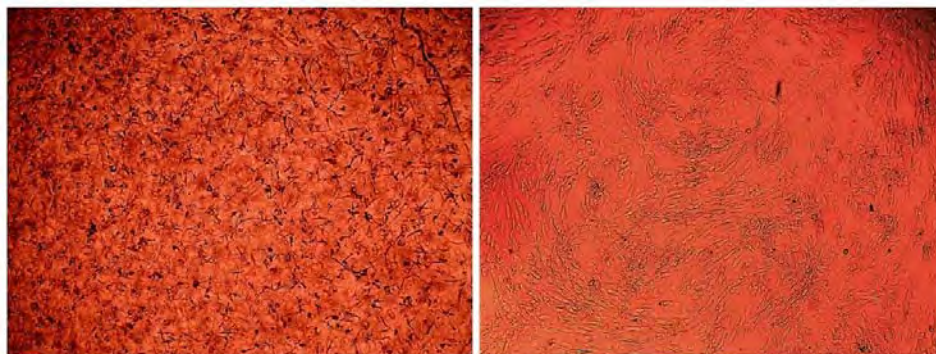
Obr. 5 Osteogenná diferenciácia - špecifické farbenie Alizarin Red indikuje kalcifikovaný matrix

Pre potreby tkanivového inžinierstva sú dôležité 3D scaffoldy, ktoré svojim mikroenvironmentom dokážu stimulovať kmeňové bunky k efektívnej diferenciácii alebo slúžia k udržaniu nediferencovaného stavu počas kultivácie. K tomuto účelu sme použili fibrínový hydrogél (tzv. fibrin scaffold), na ktorom sme diferencovali kmeňové bunky (**Obr. 6**).



Obr. 6 Kultivácia vo fibrínovom scaffolde - 1.nediferencované MSCs (100x), 2.adipogénna dif.(200x), 3.chondrogénna dif.(100x), 4.osteogénna diferenciácia (100x)

Pri kultivácii v takomto hydrogely (3D kultivácia) sa líšia bunky aj samotnou morfológiou nakoľko nedochádza k prichyteniu o dvojrozmerný plastový povrch kultivačnej fľaše (**Obr. 7**).



Obr. 7 Porovnanie 3D (fibrín scaffold) a 2D kultivácie

Záver

Našou prácou sme potvrdili a ukázali, že tukové tkanivo je vhodným alternatívnym zdrojom kmeňových buniek, ktoré majú schopnosti multilineálnej diferenciácie. Takto získané kmeňové bunky môžu byť pasážované, a tak zaistíme nárast celkovej populácie, ktorá môže byť v budúcnosti použitá spolu s 3D nosičmi (scaffolds) pre aplikácie tkanivového inžinierstva a regeneratívnej medicíny alebo génovú terapiu.

Pod'akovanie

Moje pod'akovanie patrí MUDr. Drahomírovi Palenčárovi za poskytnutý materiál.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Martin G. R. (1981) Proc Natl Acad Sci USA 78(12), p.7634
- [2] Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., et al. (2007) Cell. 131(5), p. 861
- [3] Gurtner G.C., Callaghan M.J., Longaker M.T. (2007) Annu Rev Med. 58, p.2 99
- [4] Mafi R., Hindocha S., Mafi P., et al. (2011) Open Orthop J 5 (Suppl 2-M2), p. 242
- [5] Eom Y. W., Lee J. E., Yang M. S., et al. (2011) Yonsei Med J. 52(6), p. 999

Characterization of telomere-binding properties of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*

Katarína Juríková, Lubomír Tomáška

Comenius University, Faculty of Natural Sciences, Department of Genetics, Mlynská dolina, 842 1, Bratislava, Slovak Republic; kata.jurikova@gmail.com

Abstract

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a metabolic enzyme involved in the glycolysis pathway. Beside this role, mammalian GAPDH is involved in a wide variety of cell processes. In this work, we examine the role of GAPDH in telomere binding in yeast *Yarrowia lipolytica*. Heterologously expressed protein was purified and the maintenance of its enzymatic activity was confirmed by real-time spectrophotometry. Purified GAPDH was used to perform electrophoretic mobility shift assay to assess its telomere-binding properties *in vitro*. We show that it is able to bind telomeric DNA from *Y. lipolytica* independently from the integrity of active site or NAD⁺-binding site of the enzyme. The GAPDH gene was fused with green fluorescent protein to examine its intracellular localization. In the cells of *Saccharomyces cerevisiae*, a chimeric protein exhibits both nuclear and cytoplasmic localization. These results suggest that GAPDH may be a telosome component of *Y. lipolytica*.

Key words: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; telosome; yeast; moonlighting enzymes

Introduction

Telomeres are nucleoprotein structures localized at the ends of eukaryotic chromosomes. The special structure of telomeres provides a mean to distinct naturally occurring chromosome end from double strand DNA break. Without such a mechanism, DNA repair pathways may recognize chromosome ends as a damage and repair them, leading to chromosome fusions and resulting genome instability [1]. Ends of linear DNA are shortened after each cycle of DNA replication as a result of DNA replication machinery limitations. A widespread solution of this "end-replication problem" lies in recruitment of a specialized reverse transcriptase, bearing its own template, to synthesize the very ends of chromosomes to maintain the DNA length [2]. This enzyme is called telomerase and its recruitment to telomeres and further regulation is provided by protein components of telomeres [3].

Telomeric DNA is composed of tandemly repeated sequences, with 3' single-stranded overhang, which serves as a primer for telomerase. Telomeric DNA is stabilized by a number of telomeric proteins and this nucleo-protein complex forms a specific spatial structure called telosome [4]. The telosome of extensively studied yeast species, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, is well described. However, other yeasts, so called non-conventional, may be also interesting model organisms for telomeric biology. One of these species is *Yarrowia lipolytica*, previously explored

for its potential in biotechnology, with its ability to grow on n-paraffins and organic acid production [5]. *Y. lipolytica* shares multiple molecular characteristics with higher eukaryotes rather than other yeast [6]. Unlike conventional yeast species, *Y. lipolytica* telomeric repeats are regular [7]. Tay1, dsDNA binding protein is a single telomeric protein known in *Y. lipolytica*. No single-strand DNA binding telomeric proteins are known in this yeast. Our results suggest as a potential telomeric protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), a protein involved in anaerobic glycolysis.

GAPDH belongs to the group of moonlighting proteins. This group consists of multifunctional proteins fulfilling very diverse functions that are not the result of domain fusion in evolutionary history of a protein [8]. Mammalian GAPDH functions are well described [9]. It was reported to participate in transcriptional and post-transcriptional regulation of protein expression, Rab2-mediated intracellular vesicular transport between endoplasmatic reticulum and Golgi apparatus, androgen receptor signalling pathway or receptor-mediated intake of iron into macrophages. GAPDH harbours also proapoptotic function, participates in autophagy pathways and promotes the maintenance of DNA integrity. It activates DNA repair enzymes or protects telomeres from chemoterapeutics. Both active site residue (Cys149) and NAD⁺-binding site residue (Asp32) are essential for telomere-binding properties of human GAPDH [10].

Our aim is to elucidate, whether GAPDH may be a component of telosome in *Y. lipolytica*.

Material and methods

*Y*GAPDH amplified from *Y. lipolytica* genome was cloned into expression vector pEcoli-6xHN-Nterm (Invitrogen) and the expressed protein with His tag was purified using Co²⁺ beads (TALON Metal Affinity Resin, Clontech) with protocol modified according to [7].

Site-directed mutagenesis was performed to prepare point mutants D34A and C151A. Mutagenic PCR was run with Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) and mutagenic primers.

Real-time spectrophotometry was used to observe the enzymatic reaction rate change over time, measured as change in absorbance of solution at 340 nm. The experiment was performed on Varian Cary 50 Bio UV/Visible Spectrophotometer (McKinley Scientific). Control samples were measured without addition of substrate, glyceraldehyde-3-phosphate. Specific activity in units per milligram was calculated as $(\Delta A_{340} / \text{min}) / (6.22 \cdot m_e \cdot V)$, where $\Delta A_{340} = A^{65s} - A^{5s}$, A^k is absorbance at 340 nm measured in time k, m_e is enzyme mass in mg, V is reaction mixture volume in ml and 6.22 is

an extinction coefficient of NAD^+ .

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was performed with radioactively labeled single-stranded telomeric oligonucleotide of length 40 nt, what corresponds to four telomeric repeats from *Y. lipolytica*. Samples were separated in 5% polyacrylamid gel in MiniProtean TetraCell electrophoresis system (BioRad).

YlGAPDH gene without stop codon was amplified by PCR from genomic DNA of E129 *Y. lipolytica* strain and was cloned into pUG35 vector (J. Hegemann, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf, Germany) carrying enhanced GFP gene. Transformation of construct into *S. cerevisiae* cells was accomplished according to [11]. Grown transformants were visually inspected in fluorescent microscope Olympus BX51.

Results and discussion

After purification of sufficient amount of *YlGAPDH* in *E. coli*, we examined the intactness of protein function by measuring its enzymatic activity. In glycolysis, GAPDH catalyses conversion of glyceraldehyde-3-phosphate to 1,3-bisphosphoglycerate. In this reaction, NAD^+ serves as a cofactor and is reduced to NADH. This reduction confers a way to measure the GAPDH activity via real-time spectrophotometry, because NAD^+ and NADH differ in their absorbance of light of 340 nm wavelength. We were able to detect enzyme activity in purified protein solution, which was observed as a change in absorbance in time (data not shown).

To rule out the possibility that the detected enzyme activity is due to presence of co-purified bacterial GAPDH, we prepared point mutants that served as negative controls. The desired mutations were introduced into NAD^+ -binding site (Asp34 to Ala) and active site (Cys151 to Ala) of the enzyme. Mutant proteins were purified and the overall enzymatic activity of wild-type protein compared to mutants was measured (Fig. 1). Our results confirm that the majority of detected enzymatic activity was accomplished by purified *YlGAPDH*.

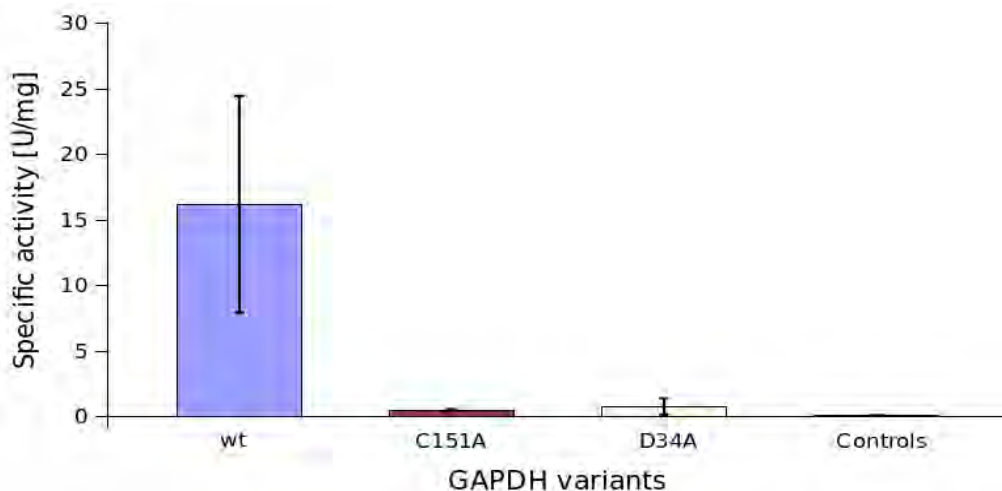


Figure 1 Glycolytic activity in purified protein solution is mediated mostly by ectopically expressed *Y*GAPDH. Each bar represents an average value from four experiments. Black lines represent standard deviation. wt – wild-type protein, C151A – mutant in active site, D34A – NAD⁺-mutant in binding site. Control samples were prepared as described in Material and methods.

After the confirmation of enzymatic activity, we performed EMSA to analyze telomere-binding properties of purified GAPDH *in vitro*. Our results show that purified *Y*GAPDH induces shift in single-stranded telomeric DNA migration, it thus binds telomeric oligonucleotide (Fig. 2). In the same experiment, both D34A and C151A mutants were tested for telomere binding. These mutants were shown to be unable to bind telomeric DNA in humans [10] what led to conclusion that these sites are crucial for telomere binding. Our results do not confirm the same characteristics for *Y*GAPDH. The differences between wild-type protein and the two mutants are negligible, and D34A mutant shows slightly stronger ability to induce DNA shift (Fig. 2).

The ability of GAPDH to bind single-stranded telomeric oligonucleotide *in vitro* suggests it may have a role in telomere binding in living cells and may potentially represent an ssDNA-binding telomeric protein in *Y. lipolytica*. To further inspect this possibility, we transformed cells of *S. cerevisiae* with plasmid bearing *Y*GAPDH, fused on its C-terminus with green fluorescent protein (GFP). The GFP signal in cells transformed with this construct was detected and the intensity of fluorescence was similar to the intensity of signal in control cells harbouring only vector with GFP. Furthermore, in comparison to the same control, chimeric protein exhibited also localization into discrete foci, which may be probably cell nuclei (Fig. 3). This result can be further examined by use of DNA-binding dyes (e.g. 4',6-diamidino-2-phenylindole or Hoechst stains). Furthermore, beside *S. cerevisiae*, more answers may confer fluorescence microscopy performed on transformed

Y. lipolytica cells.

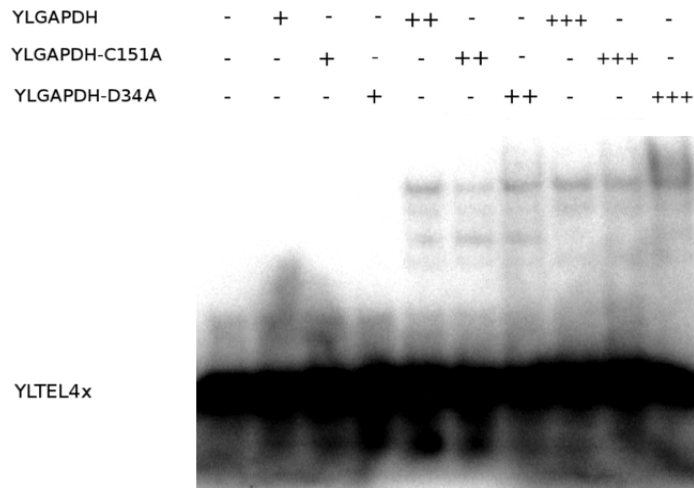


Figure 2 *Y*GAPDH induces shift of telomeric oligonucleotide in EMSA. C151A (mutant in active site) exhibits weaker binding properties, whereas D34A (mutant in NAD⁺-binding site) exhibits slightly stronger binding to telomeric probe than wt protein. Stoichiometric molar ratio was estimated to 16:1 protein to oligonucleotide, inferring from [10]. + : stoichiometric concentration (1x), ++: 10x, +++: 20x.

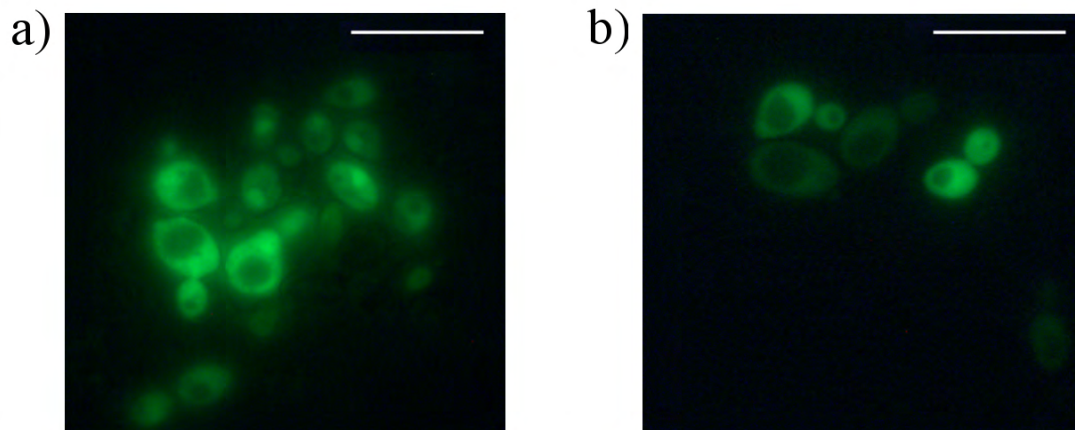


Figure 3 *Y*GAPDH exhibits both cytoplasmic and putative nuclear localization in *S. cerevisiae*. a) Chimeric protein *Y*GAPDH-eGFP in pUG35. b) pUG35 carrying enhanced GFP. Bar represents 20 μm.

Conclusions

Our results support hypothesis that GAPDH may play a role at telomeres of *Y. lipolytica*. The

EMSA results confirmed the binding of telomeric oligonucleotide by *YlGAPDH*, however, this may represent unspecific binding. This eventuality could be tested by further EMSA experiments with competitor – oligonucleotide similar in composition, but sequentially different from telomeric probe.

The results of fluorescence microscopy may point at high evolutionary conservation of GAPDH as a metabolic enzyme also in distantly related yeast, as are *S. cerevisiae* and *Y. lipolytica*. As was already mentioned, fluorescence microscopy on *Y. lipolytica* may further elucidate the eventual nuclear localization of *YlGAPDH*. Another unresolved question is the temporal aspect of *YlGAPDH* migration, what may be, as is the case of human GAPDH, dependent on the cell cycle phase.

Furthermore, other direct telomere binding assays may be performed. Chromatin immunoprecipitation assay may bring information about *YlGAPDH* associated DNA regions. Another possibility is one-hybrid screen, which may prove the ability of *YlGAPDH* to bind telomeric DNA.

Acknowledgements

This work was supported by grants VEGA (1/0311/12), APVV (0035-11) and Orange Foundation (87-SpT/2011). We would like to thank members of Professor Ladislav Kováč Laboratory, for good advices, critical insights and enjoyable working atmosphere.

References

- [1] Blackburn E. (2010) *Angew. Chem. Int. Ed.* 49(41), p. 7405
- [2] Greider C. W., Blackburn E. H. (1985) *Cell.* 43, p. 405
- [3] Nandakumar J., Cech T. R. (2013) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14(2), p. 69
- [4] Wright J. H., Gottschling D. E., Zakian V. A. (1992) *Genes Dev.* 6, p. 197
- [5] Tsugawa R., Nakase T., Kobayashi T., et al. (1969) *Agric. Biol. Chem.* 33(2), p. 158
- [5] Casaregola S., Neuvéglise C., Lépingle A., et al. (2000) *FEBS Lett.* 487(1), p. 95
- [6] Kramara J., Willcox S., Gunišová S., et al. (2010) *J. Biol. Chem.* 285(49), p. 38078
- [7] Jeffrey C. J. (1999) *Trends Biochem. Sci.* 24, p. 8
- [8] Sirover M. A., (2011) *Biochim. Biophys. Acta.* 1810(8), p. 741
- [9] Demarse N. A., Ponnusamy S., Spicer E. K., et al. (2009) *J. Mol. Biol.* 394(4), p. 789
- [10] Gietz R. D., Schiestl R. H., Willems A. R., et al. (1995) *Yeast.* 11, p. 355

Orphan gene detection in yeast

Katarína Juríková¹, Toni Gabaldón²

¹*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Genetics, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovak Republic; kata.jurikova@gmail.com*

²*Centre for Genomic Regulation, Bioinformatics and Genomics Programme, Comparative Genomics Group, C/ Dr. Aiguader 88, 080 03 Barcelona, Spain*

Abstract

Gene emergence was long thought to occur predominantly by gene duplication. Recently, *de novo* gene origin was shown to occur in a wide range of genomes, from parasitic unicellulars to primates and humans. Genes originated from non-coding sequence were termed orphan genes. We developed a pipeline to identify orphan genes in yeast genomes. This pipeline builds orphan gene prediction from open reading frames using synteny information, what enhances its ability to distinguish between highly divergent homologues and *de novo* originated genes. We use RNA sequencing data to estimate expression, what represents an advantage for non-conventional yeast analysis, where proteomic data are not available. Results of our pipeline are comparable with earlier approaches. We were able to detect new putative orphan genes, which were previously omitted due to underrepresentation of orphans among annotated genes.

Key words: *orphan genes; gene evolution; yeast*

Introduction

Evolutionary innovations may arise from slight changes in protein structure, more massive sequence rearrangements, regulatory changes and other processes. *De novo* gene emergence, e.g. gene origination from non-coding sequence, was long thought to play only marginal role in gene evolution. In his seminal work, Susumu Ohno postulated that gene duplication may lead to subsequent divergence of function of the two gene copies and further sequence evolution. Gene duplication was considered to be the major factor in novel gene emergence [1]. The theory had a substantial influence on the current paradigm, so that François Jacob stated that “creation of entirely new nucleotide sequence could not be of any importance in the production of new information” [2].

A growing body of evidence is now contradicting this paradigm. Genes originated from scratch, present only in one species or one clade, were termed orphan genes and their presence was found in wide variety of species and lineages [3]. Orphan genes are often defined *sensu lato* as genes that do not have any known homologous protein, possibly due to duplication followed by a high rate of divergence [4]. Orphan genes *sensu stricto* correspond to *de novo* evolved genes, originated from scratch.

Our goal is to identify orphan genes *sensu stricto* in genomes of recently sequenced non-conventional yeast species and attempt to construct a reliable pipeline without including proteomic data.

Material and methods

The pipeline used for prediction of orphan genes was developed for *Saccharomyces cerevisiae*, and steps in pipeline are thus described for this organism. However, the same pipeline may work for any yeast species with available input data. Custom programs were written in programming language Python (v2.7) and whole analysis was run under GNU/Linux operating system (v12.04 Precise Pangolin). We used various tools from emboss package [5], BEDtools [6] and SAMtools [7].

In every iteration of BLAST we used a threshold $E < 10^{-4}$ to consider two proteins as homologous. Filtered set of open reading frames was compared to NCBI non-redundant database [8].

Raw RNASeq data for *S. mikatae* and *S. bayanus* were downloaded from Sequence Read Archive (SRA) at NCBI [9] and SHRiMP [10] was used for mapping RNASeq reads. Two arbitrary thresholds were chosen for evaluating ORF as expressed – 70% of ORF length covered by RNASeq reads, and second, level of transcription compared to annotated genes. As a measure of expression was used rpkms (reads per kilobase per million mapped reads) value. A threshold was set equal to the maximal rpkms value of 20% of the least transcribed genes. This was estimated as 12.4 rpkms for *S. cerevisiae* and based on this cut-off, the set of putative orphan genes was further filtered.

Synteny was evaluated based on data retrieved from YGOB database [11], 2. 11. 2012. Synteny of inspected ORF was considered conserved if adjacent and overlapping genes were in the same order in every considered species. Three most closely related species included in YGOB were taken into account for each query species. For these three species, also alignment of corresponding region was forced to assess homology of the corresponding loci.

Results and discussion

Fig. 1 summarizes the pipeline and number of open reading frames (ORFs) remaining after each step. The first step in pipeline was the prediction of open reading frames. Building an

initial set of sequences from ORFs enables our pipeline to proceed without "gene annotation bias". The annotation process may lead to underrepresentation of orphan genes in the set of annotated genes. Using annotated genes as an initial set may thus lead to many omitted cases [12]. This approach resulted in number of ORFs more than three times bigger than is the known number of *S. cerevisiae* genes (6607 [13]). The next step was BLAST search for homologous proteins for predicted ORFs. Only ORFs that did not have any hit against any protein in nr database were kept as "putative orphans". Using BLAST, we further filtered ORFs that were able to have a hit with itself and non-paralogous ORFs.

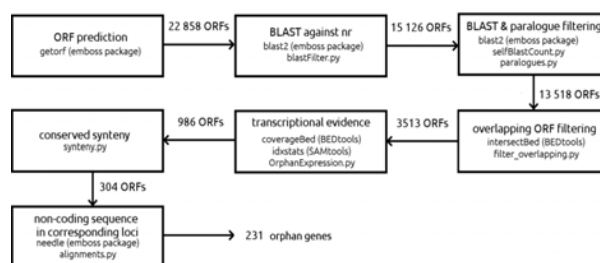


Figure 1 Pipeline summary for *Saccharomyces cerevisiae*. In each frame, for a given step of pipeline is denoted used available tool and the package it comes from, and eventually custom scripts written in Python

In the next step, we removed ORFs that overlapped in 30 to 96% of their length with already annotated gene. Less than 30% was considered to be acceptable overlap to possibly claim the ORF to be *de novo* originated, more than 96% overlap was considered as identity with annotated gene. (Such gene may be then classified as *de novo* originated, orphan gene.) In the Fig. 2 is visualized part of the genome in Interactive Genomics Viewer (igv) [14] with ORFs before and after the filtering step.

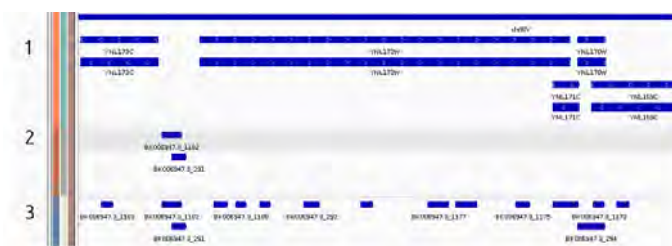


Figure 2 Filtering out putative orphans overlapping with genes reduced number of ORFs to one tenth. On the top are visualized annotated genes (1), track in the middle shows ORFs after filtering (2), the bottom track shows ORFs before filtering (3). ORFs overlapping with annotated genes were discarded

Furthermore, we looked for signs of expression. As a measure of expression we used RNASeq data, which are available also for non-conventional yeasts. To distinguish between highly divergent sequences and orphan genes, for each orphan, we searched for a highly similar, but non-coding sequence on the corresponding homologous locus in closely related species. From the resulting set of 304 ORFs in *S. cerevisiae*, we further considered as orphans only those ORFs that had non-coding sequence in the homologous loci in related species. As non-coding was considered sequence with ORF no longer than 50% of a putative orphan ORF in query species.

After orphan ORF prediction, we compared our results with previously published data. First, we inspected gene BSC4 [15], which was not detected in our analysis. Closer look in YGOB database revealed that neighbour genes order is not entirely conserved in all considered species (Fig. 3). In *S. bayanus var. uvarum* is one interspersed gene, which has no homologues in other species, so BSC4 has not conserved synteny. Similarly, "orphan" gene YEL067C [16] was not found with our pipeline. The reason is again the broken symmetry, probably due to lower assembly quality of genomes of non-conventional yeast species (Fig. 4).



Figure 3 Gene BSC4 was not detected as orphan because of broken synteny. A snapshot from YGOB showing gene maps of selected region, homologous genes are organized in columns (pillars). The position of predicted orphan gene BSC4 is added as a light-blue rectangle

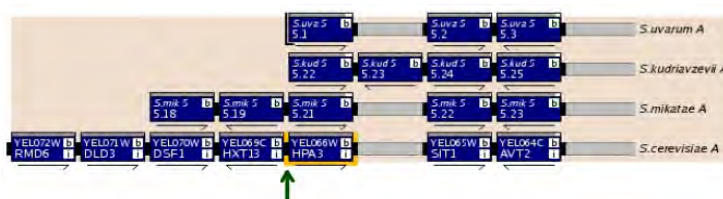


Figure 4 Predicted orphan gene locus is located on the scaffold/contig edge, thus can not be considered syntenic. Gene order visualized in YGOB, position of gene YEL067C is marked by green arrow

On the other hand, from six annotated genes that our pipeline identified as orphan, two were not recognized as orphan in [16]. These two genes are nevertheless transcribed, have non-

coding sequence counterparts in related species and do not have any homologues in nr. The probable explanation is that they were listed in SGD as dubious, and thus may be omitted if the initial set is constructed from annotated genes, as was the case for Ekman and Elofsson study [16]. Finally, the developed pipeline was used also for orphan gene prediction in *S. mikatae* and *S. bayanus var. uvarum* (Tab. 1).

Table 1 A summary of partial results after each step of the pipeline and the total number of predicted orphans

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. mikatae</i>	<i>S. bayanus</i>
ORFs	22 858	21 718	25 182
filter & blast vs nr	13 000	14 164	17 370
no gene overlap	3 515	3 496	4 497
RNA data	986	768	1 252
synteny	304	214	396
homologous non-coding seq.	231	151	313

Conclusions

In this work, we developed a pipeline for orphan gene identification in yeast. The initial set consists of open reading frames predicted in genome, what prevents it from omitting many orphan genes, as is the case for pipelines starting from annotated genes. This hypothesis was proved by comparison with previous results in budding yeast, where our pipeline found orphans not identified previously.

Synteny data in our approach allows distinguishing between highly divergent sequences and *de novo* originated orphan genes. However, using synteny in orphan gene detection may be misleading in cases where genome assembly is not finished. In this case, the conservation of synteny can not be estimated for gene on the border of scaffold or contig, what may lead to false negative results.

Using RNA sequencing data to assess expression is an advantage for orphan detection in non-conventional yeast species, where proteomic data are rarely available. For further assessment of functionality, tests of neutral selection, amino-acid composition or SNP variation across strains may be performed. The final proof of functionality may be biological analysis, but with initial bioinformatic filtering of candidate ORFs, mutant phenotype analyses or other experiments may be targetted. Utilizing our pipeline, we identified orphan ORFs in genomes of *S. cerevisiae*, *S.*

mikatae and *S. bayanus*.

Acknowledgements

This work was supported by Tatra Banka Foundation (2012sds101) and SPP Foundation Smarthead travel scholarships. We would like to thank Ľubomír Tomáška, Lezsek Prysycz for providing RNA Seq data, help and advices, and all members of Comparative Genomics Group for their willingness to advise and enthusiasm.

Literature

- [1] Ohno S. (1970) Evolution by gene duplication. Allen and Unwin, London, p. 8
- [2] Jacob F. (1977) Science 196(4295), p. 1161
- [3] Tautz D., Domazet-Lošo T. (2011) Nat. Rev. Genet. 12(10). p. 692
- [4] Khalturin K., Hemmrich G., Fraune S., et al. (2009) Trends Genet. 25(9), p. 404
- [5] Rice P., Longden I., Bleasby A. (2000) Trends Genet. 16(6). p. 276
- [6] Quinlan A. R., Hall I. M. (2010) Bioinformatics. 26(6). p. 841
- [7] Li H., Handsaker B., Wysoker A., et al. (2009) Bioinformatics. 25(16). p. 2078
- [8] NCBI nr database [Cited: 21. january 2012] <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=ProgSelectionGuide#db>
- [9] NCBI Sequence Read Archive (SRA) [Cited: 19. november 2012] <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra>>
- [10] David M., Dzamba M., Lister D., et al. (2011) Bioinformatics. 27(7). p. 1011
- [11] Byrne K. P., Wolfe K. H. (2005) Genome Res. 15(10). p. 1456
- [12] Guerzoni D., McLysaght A. (2011) PLoS Genet. 7(11). p. e1002381
- [13] SGD [Cited: 21. january 2012] <<http://www.yeastgenome.org/>>
- [14] Thorvaldsdóttir H., Robinson J. T., Mesirov J. P. (2012) Brief. Bioinformatics. E-publication ahead of print
- [15] Cai J., Zhao R., Jiang H., et al. (2008) Genetics .179(1), p. 487
- [16] Ekman D., Elofsson A. (2010) J. Mol. Biol. 396(2). p. 396

Test abortivity peľu natívnej flóry a *Tradescantia* MCN test v dlhodobej fytoindikácii zmien ekogenotoxickej záťaže v Horných Opatovciach

Erik Kerekeš, Andrea Pogányová, Ján Miškovic, Karol Mičieta

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra botaniky, Révova 39,
811 02 Bratislava, Slovensko, kerekes@fns.uniba.sk

Abstrakt

The authors follow the previous research focused on phytoindication of the environment's genotoxicity. For a target locations they have chosen territory of the defunct village Horné Opatovce next to Žiar nad Hronom. With methods as the pollen abortivity test of native flora and the *Tradescantia* MCN test, they are passing a long-term research. They demonstrate and justify seasonal disturbances of the xenobiotic load on environment, pollen abortivity declines of native flora and their correlation with the values of air pollutants released into the air. They are looking for correlations between traffic and the mentioned disturbances in results. Implanted species *Tradescantia paludosa* L. for the micronucleus test are also used.

Kľúčové slová: Genotoxicita; fytoindikácia; Test abortivity peľu; *Tradescantia* MCN test.

Úvod a formulácia cieľa

Životné prostredie je v súčasnosti poznamenané výrazným antropogénnym vplyvom. To platí najmä v mestských a priemyselných zónach, kde sa do ovzdušia uvoľňuje väčšie množstvo znečisťujúcich látok z výroby, dopravy, energetiky a ďalších zdrojov. Mnohé chemické látky, ktoré exhaláty obsahujú, sú nebezpečné svojím genotoxickým účinkom. Ich nadmerná prítomnosť v životnom prostredí môže vyvolať poškodenia a štruktúrne zmeny v bunkách, vedúce k mutáciám či karcinogenite.

Cieľom tejto práce bolo získať informácie o pôsobení genotoxických vplyvov v priemyselnej lokalite Horné Opatovce pri Žiari nad Hronom aplikáciou vybraných fytoindikačných testov na vzorky miestnej vegetácie, a ich porovnanie s výsledkami predchádzajúcich výskumov. Divo rastúca flóra funguje ako prirodzený integrátor vzájomne reagujúcich zložiek a faktorov životného prostredia [1] a preto nám fytoindikácia *in situ* umožňuje zhodnotenie environmentálnych rizík a ekologickej únosnosti prostredia.

Materiál a metódy

Pri monitoringu priemyselnej lokality sme použili test abortivity peľových zŕn [1, 2] a *Tradescantia* MCN test [3]. Monitoring lokality vo vegetačnej sezóne 2012 nadviazal na výskum s predošlých rokov. Vzorky pre analýzu abortivity peľových zŕn sme získali z divorastúcej flóry v blízkosti zaniknutej obce Horné Opatovce. Zhodnotili sme abortivitu

17tich rastlinných druhov. Výber druhov, metodiku zberu a hodnotenia sme vykonali podľa kritérií a postupov publikovaných v práci [1]. *Tradescantia* MCN test bol vykonaný na jedincoch *Tradescantia paludosa* klon 03, ktoré sme transplantovali do monitorovanej oblasti. Z rastlín boli následne odoberané vzorky na analýzu. Presný postup získania, spracovania a hodnotenia vzoriek sme vykonali podľa práce [4].

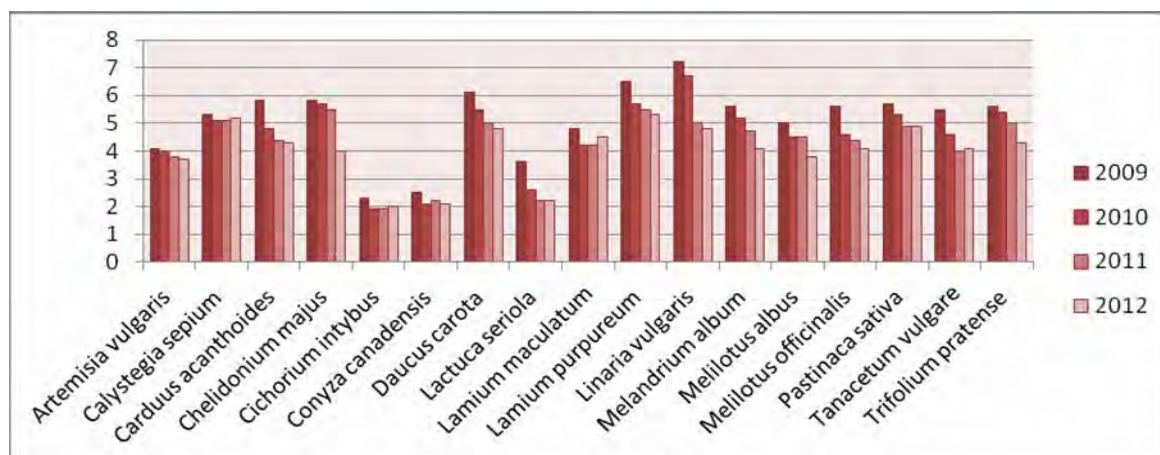
Výsledky a diskusia

Výsledky výskumu z rokov 2009 – 2013 potvrdzujú hypotézu sezónnych nárastov a medzi sezónnych poklesov hodnôt peľovej abortivity. Priemerný indukčný index všetkých vybraných druhov počas sledovaného obdobia klesal. Zároveň sme zaznamenali, že hodnoty jednotlivých priemerných indukčných indexov majú v priebehu vegetačnej sezóny stúpajúcu tendenciu. Vid' obrázok č. 1.



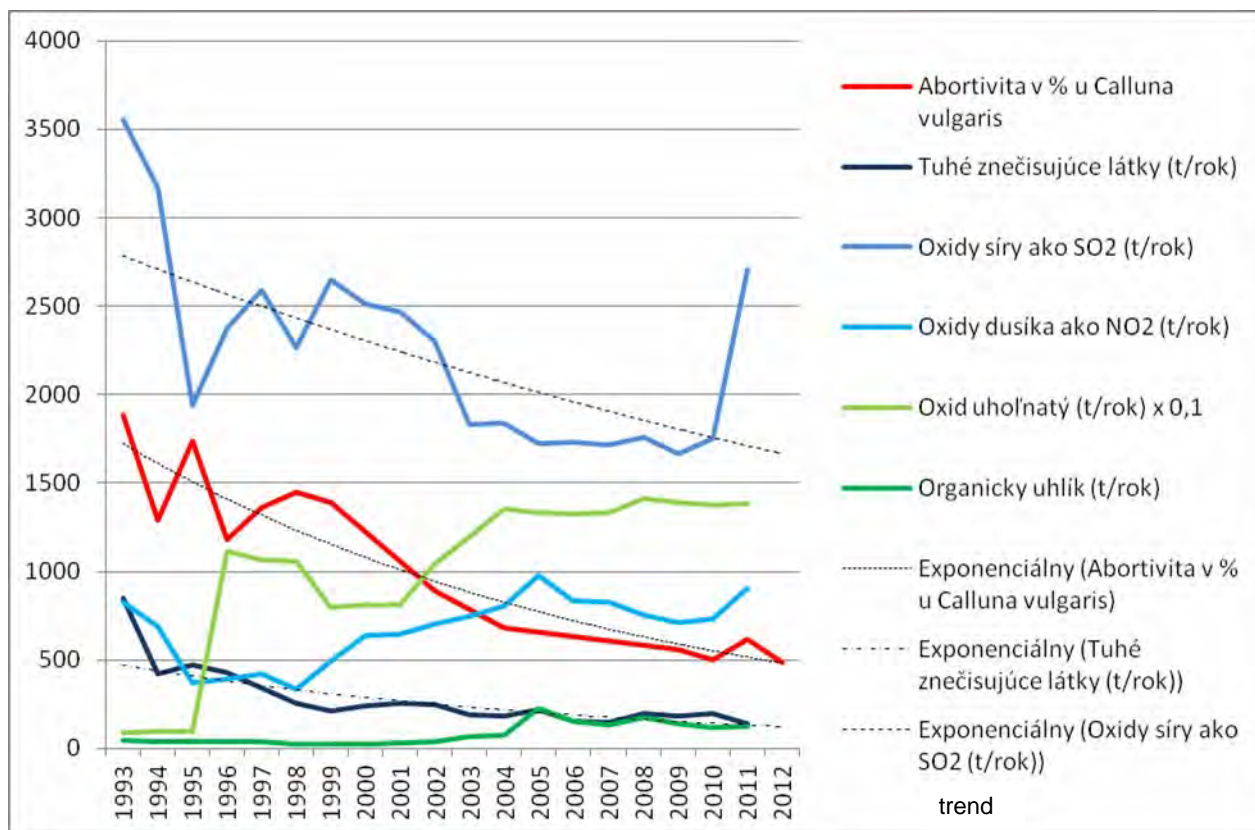
Obr. 1 Vývoj indukčných indexov abortivity peľu u divorastúcej flóry (*Callunu vulgaris* L. vynímajúc). Viditeľný je nárast hodnôt počas každej jednotlivéj sezóny a súčasne ich pokles zo sezóny na sezónu. Čiastočné autorské výsledky

Medzisezónny pokles hodnôt abortivity peľu jednotlivých natívnych druhov, obr. č. 2.



Obr. 2 Zobrazenie postupne klesajúcich (prevažne) hodnôt abortivity peľu u jednotlivých natívnych druhov na cieľovej lokalite v rokoch 2009-2012. Ide o doterajšie čiastočné autorské výsledky

Genotoxické vplyvy znečistenia sme sledovali porovnaním korelačných vzťahov medzi disturbanciami v hodnotách abortivity peľu druhu *Calluna vulgaris* (L.) Hull. a množstvom do ovzdušia vypustených jednotlivých látok z priemyselných zdrojov v okrese Žiar nad Hronom v rokoch 1993 – 2012 (Obr. č. 3). Pri porovnaní sme použili výsledky z publikácií [5, 6], autorské údaje a údaje z Národného emisného informačného systému [7].



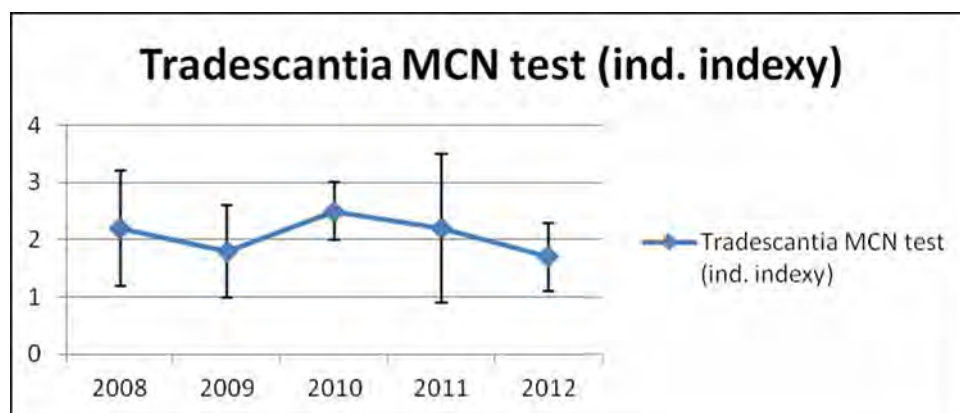
Obr. 3 Graf závislosti klesajúcej abortivity peľu u *Calluna vulgaris* (L.) Hull. od klesajúceho množstva polutantov v prostredí (abortivita je pre lepšiu názornosť v grafe uvedená ako 100-násobok pôvodnej percentuálnej hodnoty). Zdroj údajov [5,6,7] a autorské merania

Z grafu vyplýva, že spolu s klesajúcimi množstvami vypúšťaného SO_2 a TZL čiastočne klesala aj abortivita. Súčasne nebola pozorovaná žiadna korelácia s narastajúcimi hodnotami CO, NO_2 a uhlíka viazaného v organických zlúčeninách. (To isté možno povedať aj o hodnotách abortivity peľu ostatných divo rastúcich druhov). Výsledky potvrdzujú čiastočnú priamu závislosť abortivity peľu od niektorých znečisťujúcich zložiek antropogénneho pôvodu. V prípade CO, NO_2 a uhlíka ako súčasti komplexnej zmesi organických zlúčenín tento trend nebol pozorovaný. Je však možné, že je ich vplyv je v porovnaní s vplyvom ostatných klesajúcich polutantov niekoľko násobne nižší a účinok týchto látok je vo výslednom efekte prekrytý.

V monitorovanej oblasti v rokoch 2008 až 2011 prebehla výstavba rýchlostnej cesty R1 v úseku Žarnovica - Šášovské podhradie. Táto komunikácia značne odbremenila dovtedy jedinú cestnú spojnicu E65 v tejto lokalite, ktorá prechádzala tesne popri Žiari nad Hronom a zároveň medzi priemyselným podnikom a záujmovou lokalitou - územím zaniknutej obce Horné Opatovce. Rýchlostná cesta do značnej miery kopíruje trasu cesty E65, avšak práve v blízkosti Žiaru nad Hronom je odklonená od Horných Opatoviec o cca 2300 metrov severozápadným smerom (zatiaľ čo cesta E65 sa od najbližších miest terénneho zberu materiálu nachádza iba 150 metrov). Spomenutá vzdialenosť ciest spolu s dnes už nižšou úrovňou dopravy na ceste E65 by mohli teoreticky viesť k poklesu environmentálnej záťaže v lokalite Horné Opatovce. Vplyvy sú však diskutabilné. Hoci došlo k zrýchleniu dopravy, rýchlostná cesta rovnako znamená automaticky zvýšenie množstva prechádzajúcich vozidiel, čo logicky vedie k nárastu emisií. Ani samotná vzdialenosť nemusí hrať tak významnú rolu ako by sa mohlo zdať, nakoľko prevažujúce severozápadné prúdenie vzduchu [8], teda v smere od rýchlostnej cesty a zároveň aj od hlinikárne, môže tento parameter čiastočne alebo úplne eliminovať.

Z obrázkov číslo 1 až 4 je zrejmé, že v roku 2011, keď bol spomínaný úsek rýchlostnej cesty daný do prevádzky nenastala žiadna zmena v trende poklesu peľovej abortivity u divorastúcej flóry, s výnimkou *Calluna vulgaris* (L.) Hull., kde vidíme mierny nárast oproti roku 2010, hoci v tomto období nečakane narastá aj množstvo oxidov síry a dusíka zo stacionárnych zdrojov [7].

Výsledky nášho doterajšieho výskumu nepreukazujú na cieľovej lokalite zatiaľ nijaké signifikantné odchýlky v meraniach výskytu mikrojadier (obrázok č. 4), takže je jednoznačne (na základe obdobných výskumov) potrebný ďalší výskum s použitím tejto metodiky.



Obr. 4 Grafické znázornenie výsledkov doterajšieho výskumu na cieľovej lokalite pomocou *Tradescantia* MCN testu. Ide o autorské výsledky

Záver

Predložené výsledky potvrdili zlepšujúcu sa kvalitu životného prostredia v okolí Žiaru nad Hronom. V práci boli použité fytoindikačné metodiky test abortivity peľových zŕn, aplikovaný *in situ* na divo rastúcu flóru a *Tradescantia* MCN test detekcie prítomnosti mikrojadier. Obe metodiky dokázali svoj potenciál pri hodnotení genotoxickej deteriorizácie životného prostredia. Pri pokračujúcom monitoringu tejto oblasti plánujeme použitie fytoindikačných metód rozšíriť o Comet assay test a zamerať sa na sledovanie genotoxických zmien v nadväznosti na zmenený dopravný režim v lokalite, ktorý vznikol ako dôsledok výstavby rýchlostnej komunikácie v okolí mesta.

PodĎakovanie

Ďakujeme pracovníkom Katedry botaniky PriF UK v Bratislave za cenné rady a pripomienky. Táto práca bola finančne podporená projektmi UK/147/2013 a VEGA 1/0380/13.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Mičieta K., Murín G. (1996) Environ. Exp. Botany 36, p. 21
- [2] Murín, A. (1995) Biologia 50, p. 37
- [3] Ma, T. H. (1982) Mutat. Res. 99, p. 293
- [4] Ma, T.H., Cabera, G.L., Chen, R., et al. (1994) Mutat. Res. 310, p. 221
- [5] Mičieta K., Kunová K. (2000) Biologia 55, p. 75
- [6] Mišík M., Mičieta K., Solenská M., et al. (2007) Environ. Pollut. 145, p. 459
- [7] Národný emisný informačný systém. [Citované: 3. február 2013]
<http://www.air.sk/neiscu/main_gui.php>
- [8] Slovenský hydrometeorologický ústav. [Informácie poskytnuté: 28. január 2012]

Neobvyklé fyzikálno-chemické vlastnosti rastového faktora asociovaného s myším herpetickým vírusom (MHV-68)

Petra Kmeťová¹, Miroslava Šupolíková¹, Lívia Číková¹, Jozef Marák², Andrea Staňová², Pavol Koiš³, František Golais¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
5ka.kmetova@gmail.com

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

³Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

Abstrakt

Production of murine herpes virus (MHV-68) growth factor (MHGF) was demonstrated in some virus infected cells cultivated in conditions non-permissive for virus replication. This factor has the ability to transform normal, non-transformed cells and to change the phenotype of transformed cells towards the normal one. Higher temperature, urea concentration and higher pH were unexpectedly shown to enhance these activities. On the other hand, these activities could be neutralized by two monoclonal antibodies (moabs) directed against glycoprotein B (gB) of MHV-68. Treatment of MHGF with some organic chemicals resulted in three outcomes: a/ MHGF retained both activities, b/ it lost the transforming and retains the transformed phenotype repressing activity, or c/ lost the transformed phenotype repressing activity retaining the transforming activity. In the case of b/ and c/ the sensitivity to moabs disappeared, probably due to conformational changes. The possibility to remove transforming activity of MHGF is discussed as a potential method to prepare a successful anti-cancer substance.

Kľúčové slová: MHV-68; rastový faktor; transformácia; separácia; fyzikálno-chemické vlastnosti

Úvod a formulácia cieľa

V niektorých bunkách infikovaných herpetickými vírusmi a kultivovaných v podmienkach nepermissívnych pre replikáciu vírusu bola dokázaná osobitná trieda látok, pripomínajúcich rastové faktory. Tieto látky majú schopnosť navodzovať v netransformovaných bunkách transformovaný fenotyp, kým fenotyp transformovaných buniek je v ich prítomnosti potláčaný [1]. Takýto faktor, označovaný ako MHGF bol dokázaný aj v bunkách infikovaných s myším herpetickým vírusom MHV-68 [2, 3]. Zistilo sa, že tieto dve vyššie uvedené biologické aktivity MHGF sú neutralizované dvoma monoklonálnymi protilátkami (moab) MG-1A12 a SC-9E8 proti glykoproteínu B (gB) MHV [3, 4, 5, 6, 7]. V súčasnosti prebiehajú pokusy s cieľom objasniť štruktúru MHGF s použitím separačných techník a metódy hmotnostnej spektrometrie [4, 5]. Súčasťou týchto pokusov bolo aj stanovenie niektorých fyzikálnochemických vlastností MHGF a zistilo sa, že tento faktor vykazuje v tomto smere určité atypické vlastnosti.

Materiál a metódy

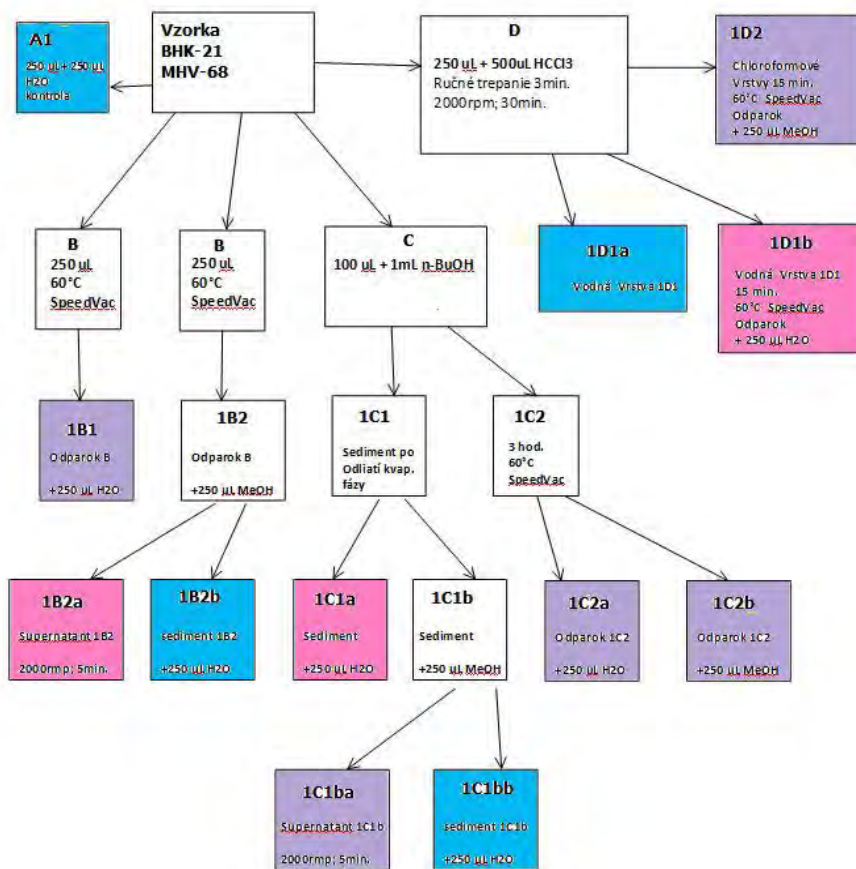
Vírus a bunkové kultúry. Prototypový vírus MHV-68 bol množený v bunkách BHK-21 alebo v myších bunkách NIH 3T3. Študované rastové faktory boli testované na uvedených bunkových líniiach a taktiež na nádorovej bunkovej línii HeLa. Bunky boli kultivované v médiu DMEM obohatenom o 7-10% inaktivovaného fetálneho bovinného séra.

Príprava MHGF. Bunky BHK-21 boli infikované s MHV-68 o multiplicitate infekcie (MOI) 0,01 a kultivované 24 hod. pri teplote 41°C. Následne bolo médium z jednovrstvy zliate a vyčírené nízkootáčkovou centrifugáciou a použité na ďalšie štúdie [3].

Testovanie vplyvu teploty, močoviny, pH na aktivitu MHGF. Rôzne koncentrácie MHGF boli zahrievané pri rozličných teplotách po dobu 15 min. a titrované na mikrotitračnej platničke pre zistenie transformačnej aktivity v bunkách BHK-21, alebo NIH 3T3 a v bunkách HeLa na potláčanie transformovaného fenotypu. Podobne boli vzorky obsahujúce MHGF pridané do roztoku močoviny s rozličnou molaritou alebo do roztokov s rôznym pH (pH 2,95; pH 10,03) a následne ponechané 15 min. pri rozličných teplotách. Desiatkové riedenia boli pridávané na 4 jamky mikrotitračnej platničky s vyrastenou bunkovou líniiou, pričom riedenie, ktoré spôsobilo zmenu netransformovaného alebo transformovaného fenotypu v 50 % buniek bolo považované za jednu aktívnu jednotku.

Výsledky a diskusia

Vzorky surového média boli podrobené frakcionácii s využitím bežných separačných postupov (Obr.1). Po niektorých procedúrach pri opracovaní vzoriek MHGF ostali obidve aktivity zachované, v iných prípadoch však došlo k strate transformačnej alebo transformáciu potláčajúcej aktivity, v tomto prípade však už nedochádzalo k neutralizácii aktivity s moab.



Obr. 1 Schéma opracovania vzoriek MHGF

- Transformujúci efekt na bunky (odstránený transformáciu potláčajúci efekt)
- Transformáciu potláčajúci efekt na bunky (odstránený transformačný efekt)
- Oba efekty, transformačný aj transformáciu potláčajúci

A1 - kontrolná vzorka nariadená s H₂O

B - vzorka odparená v SpeedVac

1B1 - H₂O pridaná k odparku vzorky B

1B2 - MeOH pridaný k odparku vzorky B

1B2a - supernatant získaný centrifugáciou suspenzie 1B2

1B2b - H₂O pridaná k sedimentu získanému centrifugáciou suspenzie 1B2

C - vzorka a k nej pridaný n-BuOH

1C1 - dosušený sediment po centrifugácii suspenzie C

1C1a - sediment zo suspenzie 1C1 + H₂O

1C1b - sediment zo suspenzie 1C1 + MeOH

1C1ba - supernatant získaný centrifugáciou suspenzie 1C1b

1C1bb - sediment získaný centrifugáciou suspenzie 1C1b + H₂O

1C2 - kvapalná fáza zo suspenzie C odparená v SpeedVac

1C2a - sediment po odparení suspenzie 1C2 + H₂O

1C2b - sediment po odparení suspenzie 1C2 + MeOH

D - vzorka + CHCl₃, extrakcia a následná centrifugácia

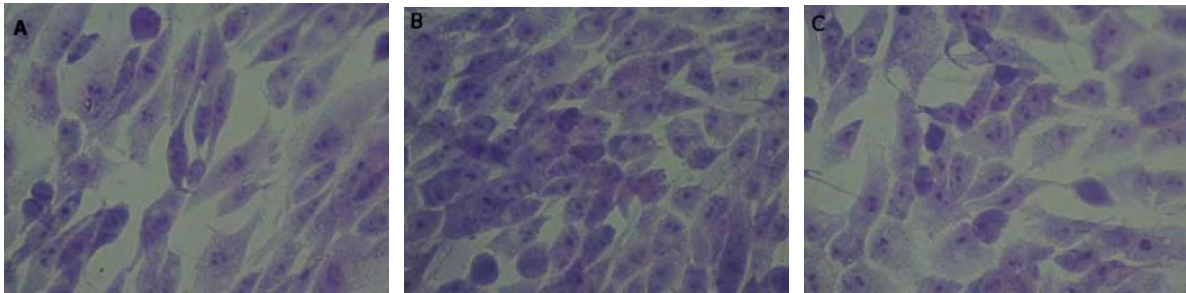
1D1 - vodná fáza suspenzie D

1D1a - vodná fáza suspenzie 1D1

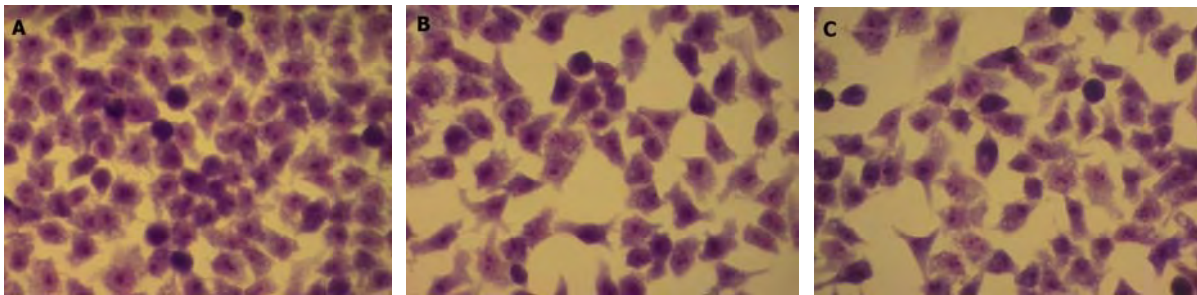
1D1b - odparok suspenzie 1D1 + H₂O

1D2 - chloroformová fáza suspenzie D odparená v SpeedVac

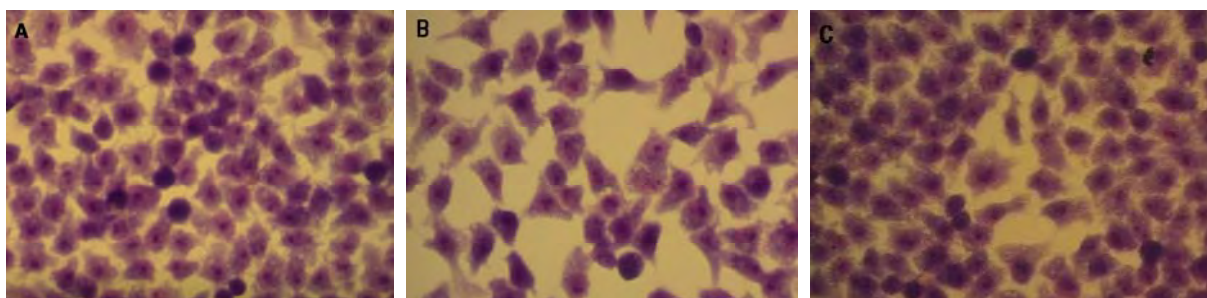
Teplota, močovina a vysoké hodnoty pH neočakávane zvyšovali biologickú aktivitu MHGF, nízke hodnoty pH nemali na aktivitu vplyv.



Obr. 2 **A** - bunky BHK-21 kultivované v intaktnom médiu (kontrola), **B** – bunky BHK-21 kultivované v prítomnosti MHGF, **C** – bunky BHK-21 kultivované v prítomnosti MHGF opracovaného vzorkou 1D2 (odstránenie transformačného efektu, ponechanie transformácie potláčajúceho efektu)



Obr. 3 **A** - bunky HeLa kultivované v intaktnom médiu (kontrola), **B** – bunky HeLa kultivované v prítomnosti MHGF, **C** – bunky HeLa kultivované v prítomnosti MHGF opracovaného vzorkou 1D2 (odstránenie transformačného efektu, ponechanie transformácie potláčajúceho efektu)



Obr. 4 **A** - bunky HeLa kultivované v intaktnom médiu (kontrola), **B** – bunky HeLa kultivované v prítomnosti MHGF, **C** – bunky HeLa kultivované v prítomnosti MHGF opracovaného vzorkou 1B2a (ponechanie transformačného efektu, odstránenie transformácie potláčajúceho efektu)

Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že nový rastový faktor bude mať pravdepodobne zaujímavú štruktúru o čom svedčí neobvyklé zvyšovanie jeho biologickej aktivity s rastúcou teplotou, zvyšujúcou sa koncentráciou močoviny a alkalickým pH. To, že transformačnú, alebo transformáciu potláčajúcu aktivitu možno niektorými chemickými látkami odstrániť,

pričom sa stráca citlivosť na moab svedčí, že štruktúra MHGF pravdepodobne podlieha konformačným zmenám, prejavujúcimi sa zmenou biologickej aktivity. Odstránenie transformačnej aktivity, ktoré bude pravdepodobne ireverzibilné sa bude možno v budúcnosti dať využiť pri príprave MHGF ako potenciálnej protinádorovej látky.

Záver

Neobvyklé fyzikálno-chemické vlastnosti, ako rastúca teplota, zvyšujúca sa koncentrácia močoviny a alkalické pH by mohli svedčiť o neobvyklej štruktúre MHGF, ktoré sú v súčasnosti naďalej študované.

PodĎakovanie

Táto práca bola realizovaná s finančnou podporou grantov VEGA 1/1305/12, VEGA 1/0262/13, APVV-0583-11.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Konvalina I., Gašperík J., Golais F. (2002) Acta Vet. Brno 71, p. 29
- [2] Gašperík J., Leško J., Csabayová M., et al. (1994) Acta Virol. 38, p. 117
- [3] Číková, L., Šupolíková M., Marák, J., et al. (2012) Zborník recenzovaných príspevkov 2012, ŠVK, PriF UK Bratislava, SR, p. 92
- [4] Staňová A., Marák J., Šupolíková M., et al. (2012) Advances in Chromatography and Electrophoresis and Chiral. Medzinárodná konferencia Olomouc, Univerzita Palackého, 2012, p. 160
- [5] Staňová A., Marák J., Šupolíková M., et al. (2012) 19th International Mass Spectrometry Conference, Kyoto, Japan 15. – 21.9.2012
- [6] Gillet L., Gill M. B., Colaco S., et al. (2006) J. Gen. Virol. 87, p. 3515
- [7] Glauser D.L., Kratz A. S., Gillet L., et al. (2011) J. Gen. Virol. 92, p. 2020

Mapovanie a ochrana zástupcov radu Lepidoptera skupiny Rhopalocera na Kysuciach

Ján Kočišek

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra zoológie, Mlynská dolina 4, 842 15, Bratislava, Slovensko; jankocisek@centrum.sk

Abstrakt

To prevent degradation of biodiversity we have to evaluate the impact of human activities. For particular endangered species it can be determined from long term records of population levels. Present study is focused on long term mapping of Lepidoptera levels in north Slovakia, specifically the Kysuce region. The complete list of the species observed during the period 2000 - 2012 is presented, which could be used also in extraterritorial research. Intensive human activity in two of the studied habitats results into significant variation of the butterflies population levels. The numbers of *Papilio machaon* observed in habitat "Jurošovský vrch" increased after temporary deforestation. On the other hand, aircraft dissection in habitat "Polievkovci" results into decrease in population levels of *Apatura iris* and *Apatura ilia* for several years. The ways to protect the butterflies diversity are discussed on the basis of author personal experience.

KLúčové slová: *Lepidoptera, Rhopalocera, druhová diverzita, Kysuce, mapovanie, ochrana*

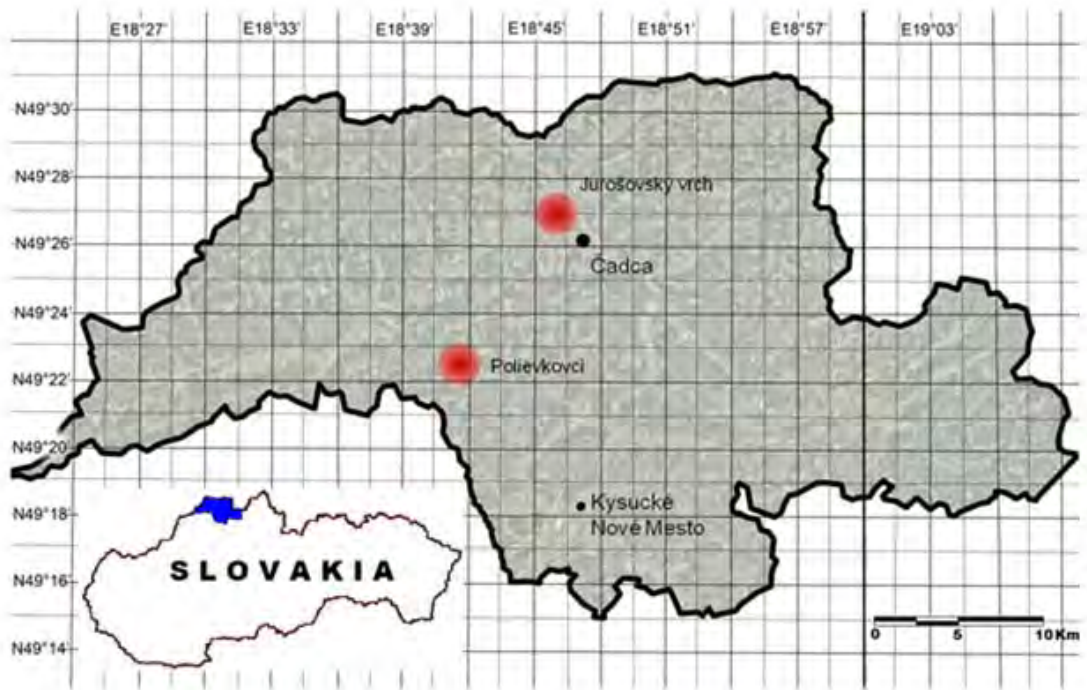
Úvod a formulácia cieľa

V súčasnosti sa mapovanie a ochrana motýľov stáva čoraz aktuálnejšou témou, nakoľko motýle predstavujú vynikajúce biologické indikátory a opel'ovače rastlín. V práci sa venujeme výskumu mapovaniu denných motýľov (Rhopalocera) na uvedenom území regionu Kysúc a spracované údaje pochádzajú z rokov 2000-2012. Cieľom práce je urobiť výskum druhového zloženia denných motýľov (Rhopalocera) na Kysuciach, ako i vplyv vybraných antropogénnych faktorov na početnosť vybraných druhov a na ich rozšírenie v severnej časti skúmaného územia. V súčasnosti sú výsledky o výskyte denných druhov motýľov v regióne Kysúc nedostatočné[1].

Materiál a metódy

Získaný materiál pochádza z dvoch lokalít: Lokalita 1. - Jurošovský vrch (N 49°26'39'' E 18°45'58''s) dĺžkou transektu 1, 2 km. Lokalitu tvorí lúka obklopená zmiešaným lesom. Lokalita 2. - Zákopčie u Polievkou (N 49°22'39'' E 18°41'25'') s dĺžkou transektu 1, 5 km. Lokalita sa nachádza v inundačnej oblasti Polievkovského potoka, z ľavej strany je lemovaná cestnou komunikáciou. Výskum sme robili metódou transektového sčítania druhov motýľov [2]. Mapovanie sme uskutočnili v období apríl - október, vždy jeden krát do týždňa. V prípade potreby sme motýle odchytili entomologickou sieťkou

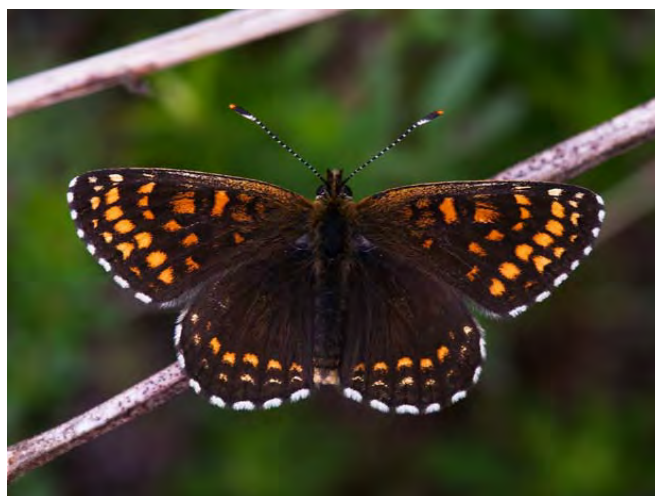
a následne určili do druhu.



Obr. 1 Mapa regiónu Kysúc s vyznačenými lokalitami mapovania

Výsledky a diskusia

V uvedenom období bolo na skúmaných lokalitách zistených 50 druhov denných motýľov patriacich do piatich čeľadí (tab. 1). K významným nálezom na tomto území považujeme najmä výskyt druhov *Melitaea diamina* a *Melitaea cinxia* (výskyt v rámci SR lokálny, patria k zraniteľným druhom) a *Lycaena dispar* (zákonom chránený, NATURA 2000).



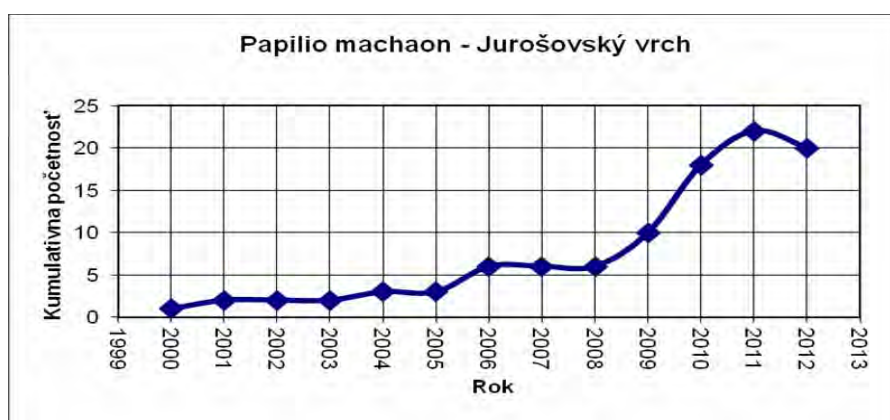
Obr. 2 *Melitaea diamina* (foto: autor)

Zaujímavým výsledkom je i výskyt druhu *Lasiommata megera*, ktorý sme na Kysuciach zaregistrovali prvý krát až v roku 2012. Toto zistenie potvrdzuje nami predpokladaný postupný posun teplomilných druhov do severnejších oblastí [3].

Tab. 1 Zoznam druhov motýľov zaznamenaných na skúmaných lokalitách

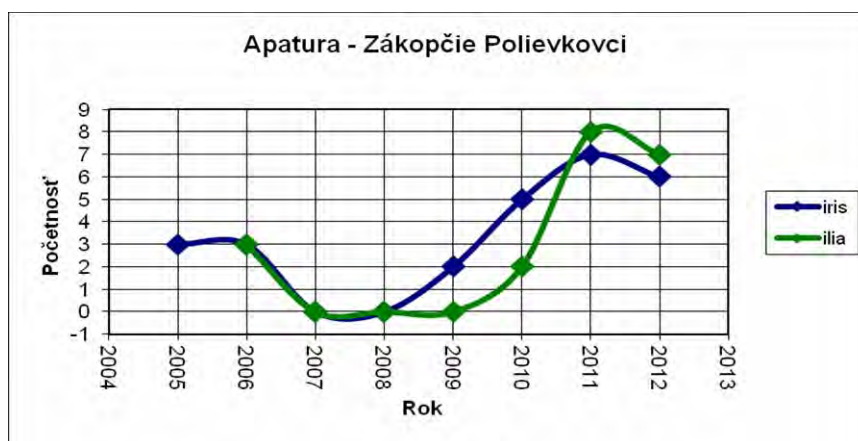
<p style="text-align: center;">PAPILIONIDAE</p> <p>1. <i>Papilio machaon</i> (Linnaeus, 1758)</p> <p style="text-align: center;">NYMPHALIDAE</p> <p>1. <i>Apatura iris</i> (Linnaeus, 1758) 2. <i>Apatura ilia</i> (Denis&Schifferrmuller, 1775) 3. <i>Limenitis populi</i> (Linnaeus, 1758) 4. <i>Limenitis camilla</i> (Linnaeus, 1764) 5. <i>Nymphalis polychloros</i> (Linnaeus, 1758) 6. <i>Nymphalis antiopa</i> (Linnaeus, 1758) 7. <i>Inachis io</i> (Linnaeus, 1758) 8. <i>Vanessa atalanta</i> (Linnaeus, 1758) 9. <i>Vanessa cardui</i> (Linnaeus, 1758) 10. <i>Aglais urticae</i> (Linnaeus, 1758) 11. <i>Polygonia c-album</i> (Linnaeus, 1758) 12. <i>Araschnia levana</i> (Linnaeus, 1758) 13. <i>Argynnis paphia</i> (Linnaeus, 1758) 14. <i>Argynnis aglaja</i> (Linnaeus, 1758) 15. <i>Boloria selene</i> (Denis&Schifferrmuller, 1775) 16. <i>Brenthis ino</i> (Rottemburg, 1775) 17. <i>Melitaea diamina</i> (Lang, 1789) 18. <i>Melitaea cinxia</i> Linnaeus, 1758) 19. <i>Melitaea athalia</i> (Rottemburg, 1775) 20. <i>Melenargia galathea</i> (Linnaeus, 1758) 21. <i>Pararge aegeria</i> (Linnaeus, 1758) 22. <i>Aphantopus hyperanthus</i> (Linnaeus, 1758) 23. <i>Coenonympha arcania</i> (Linnaeus, 1761) 24. <i>Coenonympha glycerion</i> (Borkhausen, 1788) 25. <i>Maniola jurtina</i> (Linnaeus, 1758)</p>	<p>26. <i>Erebia medusa</i> (Denis&Schifferrmuller, 1775) 27. <i>Erebia aethiops</i> (Esper, 1777) 28. <i>Lasiommata maera</i> (Linnaeus, 1758) 29. <i>Lasiommata megera</i> (Linnaeus, 1767)</p> <p style="text-align: center;">PIERIDAE</p> <p>1. <i>Leptidea sinapis</i> (Linnaeus, 1758) 2. <i>Anthocharis cardamines</i> (Linnaeus, 1758) 3. <i>Aporia crataegi</i> (Linnaeus, 1758) 4. <i>Pieris brassicae</i> (Linnaeus, 1758) 5. <i>Pieris rapae</i> (Linnaeus, 1758) 6. <i>Pieris napi</i> (Linnaeus, 1758) 7. <i>Colias crocea</i> (Fourcroy, 1785) 8. <i>Colias hyale</i> (Linnaeus, 1758) 9. <i>Gonepteryx rhamni</i> (Linnaeus, 1758)</p> <p style="text-align: center;">LYCAENIDAE</p> <p>1. <i>Polyommatus icarus</i> (Rottemburg, 1775) 2. <i>Polyommatus semiargus</i> (Rottemburg, 1775) 3. <i>Lycaena virgaureae</i> (Linnaeus, 1758) 4. <i>Lycaena dispar</i> (Haworth, 1803) 5. <i>Lycaena hippothoe</i> (Linnaeus, 1761) 6. <i>Lycaena phlaeas</i> (Linnaeus, 1761)</p> <p style="text-align: center;">HESPERIIDAE</p> <p>1. <i>Thymelicus lineola</i> (Ochsenheimer, 1808) 2. <i>Pyrgus malvae</i> (Linnaeus, 1758) 3. <i>Carterocephalus palaemon</i> (Pallas, 1771) 4. <i>Hesperia comma</i> (Linnaeus, 1758) 5. <i>Erinis tages</i> (Linnaeus, 1758)</p>
--	---

K veľmi závažným zisteniam patria i výsledky z výskumu početnosti motýľov. Ako vidno na obr. 3 početnosť druhu *Papilio machaon* bola v období 2000 - 2005 približne na rovnakej úrovni - tri jedince na sledovanom transekte. V rokoch 2005 - 2009 pozorujeme narastanie početnosti približne na šesť jedincov/rok. Uvedený nárast početnosti dávame do súvisu s objavením sa tretej generácie motýľov, čo je pravdepodobne spôsobené klimatickými zmenami na danom území. V období 2009 - 2012 dochádza k výraznému zvýšeniu populácie na 10 až viac ako 20 jedincov tohto druhu. Toto výrazne zvýšenie populácie pravdepodobne súvisí výrubom lesného porastu a následným zarastaním rúbane druhmi rastlín z čeľade mrkvovitých.



Obr. 3 Početnosť populácie druhu *Papilio machaon* v uvedenom období.

Na obrázku 4, je zreteľne vidno, že druhy z rodu *Apatura* v rokoch 2007 - 2009 neboli v oblasti Zákopčie Polievkovci zistené. Pokles populácie nevieme fundovane vysvetliť. V období rokov 2009 - 2012 sme ich výskyt opäť zaregistrovali a ich kvantita sa zvýšila až na sedem kusov na transekte.



Obr. 4 Početnosť populácie druhov *Apatura iris* a *Apatura ilia* v uvedenom období.

Niektoré zo zistených druhov majú rôznu stupeň ochrany. Na základe našich skúseností na ich ochranu navrhujeme nasledovný manažment: Zachovanie lúčnych porastov kosením, ideálny spôsobom udržiavania lúky je tzv. mozaikovitú kosenie [3]. Ďalej je potrebné zachovanie súčasných rúbaniskových plôch, čiže základom ochrany je zabezpečenie potrebného životného prostredia. Motýle sa radia k skupine tzv „umbrella species“, ktoré majú výrazný pozitívny vplyv i na iné organizmy na tomto území [3].

Záver

V práci uvádzame výsledky transektového výskumu motýľov za roky 2000 - 2012. V uvedenom období sme zistili 50 druhov z 5 čeľadí. Zo zistených druhov sú z hľadiska ochrany prírody najvýznamnejšie druhy *Lycaena dispar* a *Melitaea diamina*. U ohrozených druhov *Papilio machaon*, *Apatura iris* a *Apatura ilia* sme počas uvedených rokov urobili i výskum ich početnosti. Na sledovaných územiach sme v tomto období zistili výrazne zmeny v kvantite jednotlivých populácií, čo súvisí tak s prebiehajúcimi klimatickými zmenami ako i antropogénnym zásahom najmä s výrubom lesa. V práci uvádzame i príslušné návrhy na ich ochranu. Naš výskum touto prácou rozhodne nekončí a v budúcnosti plánujem v ňom pokračovať.

Pod'akovanie

Chcel by som sa poďakovať MUDr. Milanovi Kudynovi za cenné a potrebné informácie.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Hrubý K. (1964) Prodrómus Lepidopter Slovenska. Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, Bratislava, p. 22
- [2] Berneš J., Konvička M., Dvořák J., et al. (2002) Motýli České republiky: Rozšíření a ochrana I. SOM, Praha, p. 68
- [3] Berneš J., Konvička M., Dvořák J., et al. (2002) Motýli České republiky: Rozšíření a ochrana II. SOM, Praha, p. 575, p. 741, p. 669

Anticancer and antiproliferative effects of atranorin on mammary cancer 4T1 and normal NMuMG cells

Lenka Koptašiková¹, Peter Solár¹, Rastislav Jendželovský¹, Peter Ferenc², Peter Fedoročko¹

¹*Pavol Josef Šafárik University in Košice, Faculty of Science, Institute of Biology and Ecology, Department of Cellular Biology, Moyzesova 11, 040 01 Košice, Slovakia; l.koptasikova@gmail.com*

²*University of Prešov in Prešov, Faculty of Humanities and Sciences, Institute of Biology, 17. novembra 1, 080 01 Prešov, Slovakia*

Abstract

With the aim of identifying novel agent with anticancer and antiproliferative activity we evaluated the effect of lichen secondary metabolite atranorin on breast carcinomas (4T1) and normal mammary gland (NMuMG) cells. The anticancer properties of atranorin have not been studied in detail yet. In our study, atranorin decreased cellularity in a dose- and time-dependent manner in both cell lines. Flow cytometric analysis did not confirm the inhibited entry into any phase of cell cycle, therefore, the potential of atranorin to induce apoptosis was examined. Apoptosis induced by atranorin was associated with the activation of the effector caspase-3. Moreover, atranorin at lower concentrations stimulated PARP cleavage in 4T1 cells and at higher ones the cleavage product of PARP in NMuMG cells was also observed. The expression of Bcl-x_L protein was slightly modified after atranorin treatment. Our results indicate that atranorin has antiproliferative effect on cancer 4T1 cells at relatively low concentrations, on the contrary, normal NMuMG cells were less sensitive to atranorin treatment.

Key words: cancer; 4T1; NMuMG; atranorin; apoptosis

Introduction

Natural product atranorin, isolated from lichens [1] is a colourless pigment [2] that is water insoluble. Atranorin properties have not been studied in detail and little information is available in the literature published so far about its biological properties [3].

Atranorin plays antiherbivorous, antimicrobial, analgesic, anti-inflammatory, immunomodulating and antinociceptive activities in the acute model of inflammation [4-8].

Although in lichens exist more than 800 types of compounds that account for many different properties, very few is known about their anticancer, cytotoxic or antiproliferative activities. Bačkorová *et al.* [9] have found that atranorin is more effective anti-cancer compound when compared to parietin and gyrophoric acid. So far it has been known a little about the precise mechanism of cytotoxicity of secondary lichen acids.

Apoptosis is programmed cell death type that is characterized at microscopic level by cell shrinking, nuclear condensation and fragmentation, membrane blebbing and redistribution of phosphatidylserine to the extracellular surface [10] The final outcome –

apoptosis – is generally the result of the activation of proteases known as „executioner“ caspase, in particular caspase-3, -6, -7 [11]. Executioner caspases are activated only by active initiator caspase-8, -9, and -10 [12] and when activated, have the ability to cleave the PARP protein. Functionless PARP enables activated DNase to cleave DNA within the nucleus [13].

The main goal of our work was to evaluate the potential anticancer and antiproliferative properties of atranorin on murine breast carcinoma cell line 4T1 and normal murine mammary glands cell line NMuMG. The difference in response of mentioned cell lines on atranorin treatment was also monitored.

Material and methods

Murine breast carcinoma cell lines 4T1 (ATCC, USA) were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Gibco, Invitrogen, UK), antibiotics- and gentamycine-free. Normal murine mammary gland cell lines NMuMG (ATCC) were cultured in complete DMEM medium (Sigma, SA, USA), supplemented with 10% heat-inactivated FBS and insuline (57µL/20mL). Cell lines were maintained at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

Metabolic activity assay (MTT) was performed according to *Burkitt et al.* [14]. Cellularity, viability and clonogenic assays were performed as described by *Bačkorová et al.* [15]. Cell cycle analysis was performed according to *Solár et al.* [16] and caspase-3 activation assay was performed as described in EnzChek® Caspase-3 Assay Kit # 2 according to manufacturer's protocol (Molecular Probes, Invitrogen). Finally, western blot was described as it is stated in *Ferenc et al.* [17].

Results and Discussion

The concentrations of atranorin were chosen based on the test of cell metabolic activity (data not shown).

The highest, 50 and 75 µM atranorin concentrations, reduced the cellularity of 4T1 cells in time-dependent manner (Fig. 1). On the contrary, the normal NMuMG cell line was less sensitive to high atranorin doses (Fig. 1). Surprisingly, the viability of both cell lines tested was not influenced by any atranorin concentrations and oscillated about the control values (data not shown). This result is consistent with the findings of *Melo et al.* and murine fibroblast cell lines L929 [18].

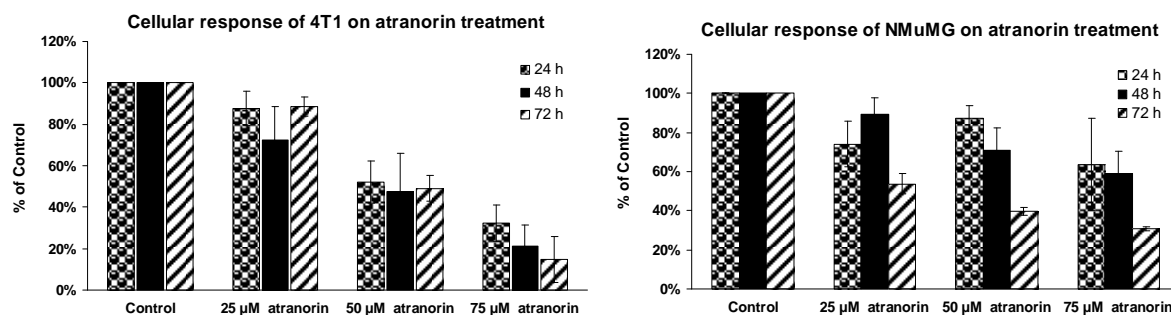


Fig. 1 Cellularity of 4T1 and NMuMG cells treated with atranorin. Both cell lines were treated with atranorin for 24, 48, and 72 h and then collected, supravivally stained with eosine and analysed by Burkner chamber. The data are presented as mean \pm SD of three independent experiments

Accordingly, the cancer 4T1 cell line treated with 50 μ M atranorin decreased the colonies formation (data not shown) up to 76%. In this regard, *Bačkorová et al.* investigated that atranorin (100 μ M) more significantly inhibited clonogenic ability of all tested tumor cell lines [15]. In normal NMuMG cells no differences in proliferation after atranorin treatment were apparent.

Characterise the form of cell death and/or reduction of 4T1 cellularity, we analyzed the caspase-3 and caspase-like proteases activities. Exposure of 4T1 cells to 25 and 50 μ M atranorin concentrations rapidly increased caspases activities after 1 h treatment

Conversely, 50 μ M atranorin has no effect on caspase-3 activation in human prostate cancer LNCaP and DU-145 cell lines, as described by *Russo et al.* [19]. Another 5-6 -fold increase in caspases activities of 4T1 cells (Fig. 2) was detected after 3-6 h treatment compared to untreated control. On the contrary, NMuMG cell line did not result in caspases activation 1 h after atranorin treatment, but revealed moderately increase at 3 h time point. The observed increase in caspase activity in both cell lines recovered at 24 h after atranorin treatment (data not shown), while in *Bačkorová et al.* found atranorin to be compound that increases caspase activity more pronounced at 48 h after atranorin treatment [9].

Further we investigated the cell cycle distribution of 4T1 and NMuMG cell lines. The 4T1 cells treated with atranorin were found mostly in G1- and S-phase of cell cycle. Statistically significant ($p < 0,01$) event occurred in 4T1 cells after 72 h treatment with 25 and 50 μ M concentrations of atranorin (Tab. 1). In the case of other previously published results, *Bačkorová et al.* demonstrated that atranorin did induce changes in all tested cell lines at 200 μ M, it was effective only in HL-60 cells at the lower (50 μ M) concentrations at 72 h [15].

Any major differences in the cell cycle distribution after atranorin treatment of normal NMuMG cells were appeared.

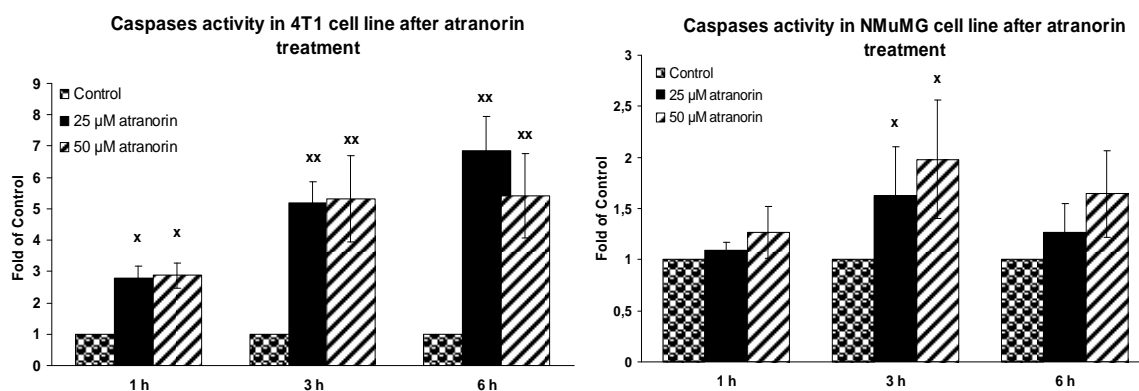


Fig. 2 Effects of atranorin on caspase-3 and caspase-like proteases activation in cancer 4T1 and normal NMuMG cell lines. The cells were treated with 25 and 50 μM atranorin for 1, 3, and 6 h and caspase activity was stated as described in manufacturer's protocol (Materials and Methods). The caspases activities are depicted as folds of untreated control. The data are presented as mean ± SD of three independent experiments. The statistical significance is designated as follows: atranorin vs. control as *(p < 0,05) and **(p < 0,01).

To confirm the apoptotic form of cell death induced in both cancer as well as normal cells by atranorin treatment standard western blot analysis with PARP and Bcl-X_L proteins detections was applied. In this regard, induction of PARP cleavage by atranorin was more apparent in 4T1 cell line when 50 μM concentration of atranorin resulted in clear PARP protein cleavage after 24 h. It correlates with the results demonstrated previously in the work of Bačkorová *et al.*, although we tested lower atranorin concentrations [9]. The same was observed in NMuMG cells after 48 h atranorin treatment (Fig. 3). Interestingly, the level of anti-apoptotic Bcl-X_L protein was not changed in cancer and normal cells after 24 and 48 h treatment with atranorin. However, Bcl-X_L protein levels in NMuMG cells were above 4T1 cell levels.

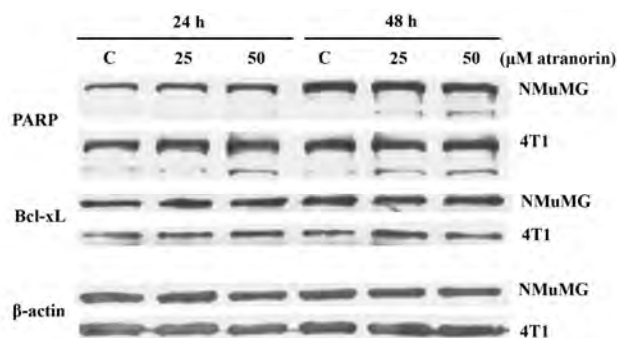


Fig. 3 Western blot probed for Bcl-XL and PARP proteins in whole 4T1 and NMuMG cell lysates. Cells were lysed 24 and 48 h after atranorin (25 and 50 μM) treatment. Equal amounts of protein extracts were resolved on 12% SDS-PAGE and analysed by western blot. Each blot is representative of two independent experiments with β -actin used as a loading control

Tab. 1 Cell cycle distribution of cancer 4T1 and normal NMuMG cell lines after treatment with 25 and 50 μM concentrations of atranorin. Both cell lines were treated with atranorin for 72 h and then fixed with 70% ethanol, labelled with propidium iodide and the amount of cell DNA was evaluated by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson, CA, USA). The data indicates the percentage over 15,000 events of cells in the indicated phase of cell cycle. The data are presented as mean \pm SD of three independent experiments. The statistical significance is designated as follows: atranorin vs. control as ******($p < 0,01$)

Cell line	Cell cycle	Atranorin			
		Control	25 μM	50 μM	75 μM
NMuMG	G1	57,05 \pm 4,17	56,48 \pm 1,79	51,24 \pm 1,32	50,04 \pm 3,82
	S	21,7 \pm 4,7	20,98 \pm 4,23	21,84 \pm 3,17	22,52 \pm 2,33
	G2	21,24 \pm 4,12	22,54 \pm 4,27	26,91 \pm 4,11	31,7 \pm 1,57
4T1	G1	47,24 \pm 7,67	44,92 \pm 4,22	45,84 \pm 4,44	45,39 \pm 7,06
	S	50,84 \pm 6,62	54,66 \pm 4,17	53,9 \pm 4,56	53,98 \pm 6,41
	G2	2,66 \pm 0,28	0,42 \pm 0,08 **	0,26 \pm 0,2 **	0,64 \pm 0,64

Conclusions

In summary, we may conclude that cancer 4T1 cell line is more sensitive to atranorin treatment than NMuMG cells, which was confirmed by decrease in cellularity and clonogenic ability of 4T1 cells. Although we did not observe any changes in the cell cycle distribution after atranorin treatment in both cell lines, we have found significant increase in caspases activities followed by PARP cleavage in cancer 4T1 cells and slightly in normal NMuMG cells after atranorin treatment. Taken together, this data illustrates that atranorin is able to reduce the growth of murine breast carcinoma cells 4T1 by activating an apoptotic process.

Acknowledgements

Authors thank Michala Uhrinová for the pivotal tests with atranorin and 4T1 cell lines. This study was partly supported by Scientific Grant of Ministry of Education of Slovak Republic under contract VEGA-1/0733/12.

References

- [1] De Carvalho M. G., De Carvalho G. J. A., Braz-Filho R. et al. (2000) *Journal Of The Brazilian Chemical Society*. 11(2), p. 143
- [2] Solhaug K. A., Larsson P., Gauslaa Y. (2010) *Planta*. 231(5), p. 1003
- [3] Ingolfssdottir K., Chung G. A., Skulason V. G. et al. (1998) *Eur. J. Pharm. Sci.* 6(2), p. 141
- [4] Nimis P. L., Skert N. (2004) *Environmental and experimental botany*. 55(1-2), p. 175
- [5] Turk H., Yilmaz M., Tay T., et al. (2006) *Z. Naturforsch. C*. 61(7-8), p. 499
- [6] Bugni T. S., Andjelic C. D., Pole A. R., et al. (2009). *Fitoterapia*. 80(5), p. 270
- [7] Carlos I. Z., Quilles M. B., Carl C. B., et al. (2009) *Z. Naturforsch. C*. 64(9-10), p. 664
- [8] Siqueira R. S., Bonjardim L. R., Araujo A. A., et al. (2010) *Z. Naturforsch. C*. 65(9-10), p. 551
- [9] Backorova M., Jendzelovsky R., Kello M., et al. (2012) *Toxicol. In Vitro*. 26(3), p. 462
- [10] Long J. S., Ryan K. M. (2012) *Oncogene*. 31(49), p. 5045
- [11] Fuentes-Prior P., Salvesen G. S. (2004) *Biochem. J.* 384(2), p. 201
- [12] Boatright K. M., Rénatus M., Scott F. L., et al. (2003) *Mol. Cell*. 11(2), p. 529
- [13] Lazebnik Y. A., Kaufmann S. H., Desnoyers S., et al. (1994) *Nature*. 371(6495), p. 346
- [14] Burkitt M., Magee C., O'Connor D., et al. (2007) *Mol. Carcinog*. 46(6), p. 466
- [15] Backorova M., Backor M., Mikes J., et al. (2011) *Toxicol. In Vitro*. 25(1), p. 37
- [16] Solar, P., Chytilova, M., Solarova, Z., et al. (2011) *Pharmaceuticals*. 4, p. 1488
- [17] Ferenc P., Solar P., Kleban J., et al. (2010) *J. Photochem. Photobiol. B*. 98(1), p. 25
- [18] Melo M.G., dos Santos J.P., Serafini M.R., et al. (2011) *Toxicol. In Vitro*. 25(2), p. 462
- [19] Russo A., Caggia S., Piovano M., et al. (2012) *Chem. Biol. Interact.* 195(1), p. 1

Fúzogénna aktivita ako faktor ovplyvňujúci pandemický potenciál vírusu chrípky

Lucia Kotlárová, Margaréta Práznovská, Eva Varečková

Virologický ústav SAV, oddelenie Ortomyxovírusov, Dúbravská cesta 9, 845 05, Bratislava, Slovenská republika, viruluko@savba.sk

Abstrakt

Influenza A viruses (IAV) cause an acute respiratory disease, which represents one of the most important public health problems at present. New viruses to which human population has no immunity arise by cumulative substitutions in virus genome or by reassortment among segments of human and avian viral genomes. The lacking of immunity in humans specific to new emerging IAV, as well as their interaction with human host determine the danger which new emerging viruses represent. We focused on hemagglutinin (HA). It is initially synthesized as a precursor molecule, HA0, which is proteolytically cleaved into HA1 and HA2 subunits. The HA1 subunit is responsible for virus attachment to susceptible cells, while HA2 gp mediates the fusion of viral and endosomal membranes. The structural change of HA induced by low pH, which is a result of release of intermolecular interactions in the HA trimer, is needed for activation of its fusion activity, the essential parameter for virus infectivity. The aim of this work was to examine how the differences in the fusion activity of HA influence *in vitro* and *in vivo* replication of two antigenic identical viruses of H3 subtype.

KLúčové slová: ľahký reťazec hemagglutínínu; fúzna aktivita; vírus chrípky typu A.

Úvod a formulácia cieľa

Hemagglutínín (HA) je povrchovým glykoproteínom vírusu chrípky, ktorého úloha spočíva v prichytení vírusovej častice na receptor vnímavej bunky a taktiež v sprostredkovaní fúzie vírusovej a endozomálnej membrány. HA je trimér, tvorený tromi identickými monomérmi, ktoré sa skladajú z HA1 a HA2 glykopolypeptidov (gp) spojených disulfidovou väzbou. HA1 a HA2 vznikajú po proteolytickom štiepení prekursora HA0 [1]. Fúzia vírusovej a endozomálnej membrány vyžaduje reštrukturalizáciu HA, kedy dôjde k expozícii konzervovanej, hydrofóbnej N terminálnej časti HA2 gp, ktorý sa inzertuje do cieľovej endozomálnej membrány a sprostredkuje fúziu týchto membrán. K reštrukturalizácii HA dochádza pri zníženom pH v endozóme a vytvorí následne fúzny pór. Nízke pH simultánne otvára protónový kanál, M2 proteín, ktorý umožňuje vstup protónov do viriónu. Následne sa M1 proteín disociuje od ribonukleoproteínu (RNP) [2], ktorý je transportovaný do jadra, do miesta replikácie vRNA.

V našej štúdii sme sa zamerali na porovnanie replikačnej schopnosti dvoch vírusov s rozdielnou fúznou aktivitou a sledovali sme jej vplyv na vírusovú virulenciu a patogenitu. Stanovili sme rozdiely v pH optime fúzie mutantného vírusu Ab4 odvodeného z vírusu X31 (H3N2), ktorý má aminokyselinovú substitúciu v pozícii 17 na ťažkom reťazci – histidín (H)

za arginín (R) a antigénne identického vírusu A/Dunedin/4/73 (H3N2). Bolo dokázané, že Ab4 mutantný vírus má pH optimum fúzie vyššie ako parentálny vírus [3], preto sme sa rozhodli porovnať ich replikačnú aktivitu *in vitro* a *in vivo*.

Materiál a metódy

MDCK bunky (Madine Darby Canine Kidney) a vírusy: A/Dunedin/4/73 (H3N2) (skr. "Dun") pochádzali zo zbierky Virologického ústavu SAV, Bratislava, SR; amantadín resistantný mutantný Ab4 vírus s H do R substitúciou na pozícii 17 v HA1 odvodený z parentálneho vírusu X-31 z NIMR, London, UK (skr. "Ab4") [3]. Vírusy boli pomnožené v kuracích embryách a purifikované diferenciálnou centrifugáciou z infekčnej alantoickej tekutiny v diskontinuálnom sacharózovom gradiente [4]. Na detekciu proteínov replikujúceho sa vírusu sme využili monoklonové protilátky pripravené na Virologickom ústave SAV: nukleoproteín-špecifickú MP 107L [5] a HA špecifickú protilátku (MP IIF4) [6], ktorá rozpoznáva HA2 gp [7]. Na stanovenie hemaglutinačného titra vírusov a detekciu fúzogénnej aktivity sme používali 1% ľudské erytrocyty skupiny 0 Rh+ alebo 5% erytrocyty morského prasat'a.

Šesť týždňové BALB/c myši sme v slabej narkóze infikovali intranasálne so 40ul infekčnej alantoickej tekutiny v príslušnom riedení. V príslušných intervaloch sme odoberali pľúca, ktoré boli homogenizované v 1ml PBS. Supernatant získaný po centrifugácii homogenátu bol použitý na stanovenie titra infekčného vírusu rýchlou kultivačnou metódou (RCA – rapid culture assay) ako už bolo predtým popísané [8]. Pri všetkých experimentoch bolo so zvieratami zaobchádzané podľa predpisov Európskej únie, s rešpektom na základné etické princípy a pohodlie zvierat.

Hemaglutinačný titer vírusu bol stanovený podľa štandardného postupu [9] s použitím 1% erytrocytov. Jedna hemaglutinačná jednotka (HAU), predstavuje recipročnú hodnotu najvyššieho riedenia vírusu, pri ktorom ešte vírus aglutinuje erytrocyty.

Schopnosť vírusov fúzovať membrány pri rozdielnom pH bola dokázaná hemolýzou [3] a optická denzita supernatantu bola zmeraná pri 540nm, ako bolo popísané [10].

PFU (plaque forming unit) vírusov sme stanovili plakovou titráciou, ktorá určuje množstvo infekčných vírusových častíc na základe počtu vytvorených plakov v jednotke objemu [11]. Infekčný titer vírusu bol stanovený RCA metódou a infekčný titer vírusu bol definovaný ako recipročná hodnota najvyššieho riedenia vírusu, pri ktorom ešte boli pozorované infikované bunky, červeno sfarbené v dôsledku imunochemickej detekcie vírusového antigénu [8].

Metódou ELISA [12] sme sledovali konformačné zmeny hemaglutinínu pri rôznom pH, s použitím HA2- špecifickej monoklonovej protilátky IIF4 (100ng/100ul), ktorá je monomér-špecifická.

Výsledky a diskusia

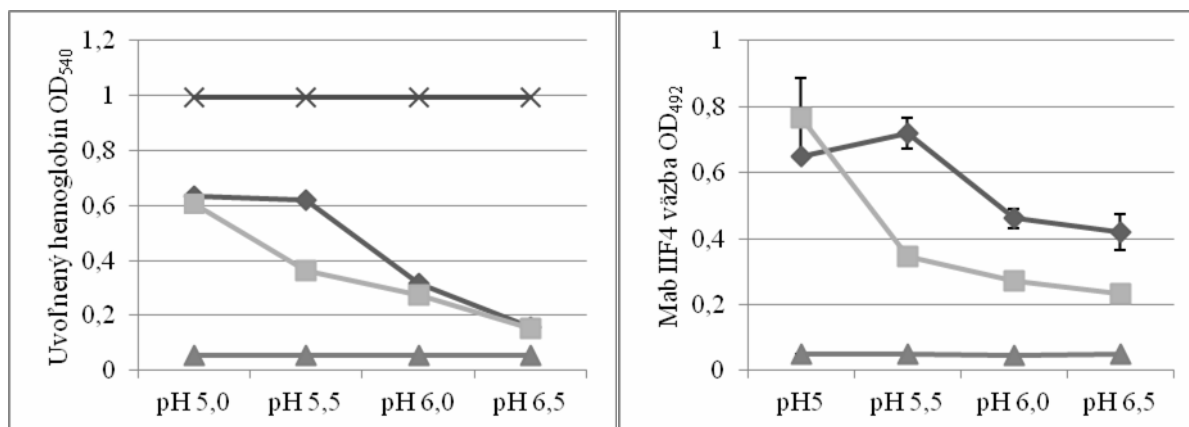
Aktivácia fúzneho potenciálu vírusu chrípky je krok nevyhnutný pre replikáciu vírusu, preto jej zmeny môžu mať dopad na jeho virulenciu a patogenitu. Fúzny potenciál vírusu chrípky je aktivovaný po reštrukturalizácii HA pri nízkom pH, preto sme sa rozhodli porovnať pH závislosť fúznej aktivity vo vzťahu k štruktúrn zmenám HA.

Na sledovanie pH závislosti fúznej aktivity vírusu Ab4 a Dun sme použili hemolytický test. Je založený na schopnosti vírusu chrípky, ktorý po jeho naviazaní na erytrocyty a po vystavení nízkemu pH, sprostredkuje lýzu červených krviniek. Množstvo uvoľneného hemoglobínu, ktoré je merané pri A_{540} , predstavuje mieru fúzie. Sledovali sme fúziu pri zostupnom pH v rozsahu od 6,5 do 5,0 (Δ pH 0,5). Zistili sme, že Ab4 vírus spôsobuje maximálnu lýzu erytrocytov pri pH 5,5, zatiaľ čo vírus Dun vyžaduje pH nižšie (pH 5) (Tab. 1, Obr. 1A).

Tab. 1 Porovnanie fúznej aktivity a konformačných zmien HA-u vírusov Ab4 a Dun

Fúzna aktivita [%]			Väzba Mab IIF4 – HA [%]		
pH	Ab4	Dun	pH	Ab4	Dun
5,0	100	100	5,0	90,3	100
5,5	97,8	62,5	5,5	100	45,3
6,0	50	42	6,0	64	35,4
6,5	25	25,5	6,5	58	30,5

Konformačná zmena hemaglutinínu vírusov Ab4 a Dun, spôsobená znížením pH bola monitorovaná pomocou väzbovej aktivity HA2-špecifickej MP IIF4. Táto MP sa viaže na konformačne zmenený HA, čím umožňuje sledovať zmenu jeho štruktúry. Maximálnu väzbu protilátky s vírusom Ab4 sme zaznamenali pri pH 5,5, zatiaľ čo s vírusom Dun pri pH 5,0. U Ab4 vírusu bolo pri pH 6,5 už 58% HA zmeneného, pričom u HA vírusu Dun len 30,5%. Maximálny rozdiel bol zaznamenaný pri pH 5,5, kedy bolo už 100% HA-u vírusu Ab4 konformačne zmeneného, zatiaľ čo u vírusu Dun len 45,3% (Tab. 1, Obr. 1B).



Obr. 1 Fúzna aktivita (1A) mutantného vírusu Ab4 (◆) a vírusu Dun (■) a porovnanie pH závislých konformačných zmien detekovaných monoklonovou protilátkou (1B)

1A: fúzia bola stanovená hemolýzou erytrocytov pri rôznom pH. Ako negatívnu kontrolu (▲) sme použili 5% erytrocyty v PBS a ako pozitívnu kontrolu (×) 5% erytrocyty v 0,2% Nonidete. Uvoľnený hemoglobín bol zmeraný pri A₅₄₀.

1B: Mab IIF4 bola použitá vo väzbovom ELISA teste pre sledovanie konformačných zmien v HA trimére. Ako negatívna kontrola bola použitá irelevantná protilátka (▲).

Porovnanie replikačnej aktivity vírusu Ab4 a Dun *in vitro*. MDCK bunky sme infikovali porovnateľnými dávkami vírusov (t.j. s rovnakými hemaglutinčnými titrami). Infekčný titer vírusu bol stanovený RCA metódou v troch intervaloch po infekcii: 6, 12 a 18 hodín. *In vitro* sme pozorovali významne vyšší RCA titer Ab4 vírusu ako Dun. Rozdiel bol pozorovaný v každom čase po infekcii (Tab. 2).

Tab. 2 *In vitro* replikačná aktivita vírusu Ab4 a Dun monitorovaná RCA metódou

Čas p.i [hod]	RCA Titer	
	Ab4	Dun
6	204 800	12 800
12	819 200	102 400
18	1 638 400	102 400

Porovnanie replikačnej aktivity vírusu Ab4 a Dun *in vivo*. BALB/c myši boli infikované intranasálne s použitím rozličných riedení vírusov Ab4 a Dun. Dva dni po infekcii sme v každej skupine dvom myšiam odobrali pľúca, pričom v homogenáte pľúc bol metódou RCA sledovaný titer vírusu (Tab. 3). Najvyšší dosiahnutý titer bol sledovaný pri skupine myši

infikovaných vírusom Dun, pri riedení 4×10^4 PFU/ml. Tento výsledok bol v korelácii s pozorovaným najvyšším signálom vírusovej RNA detekovaným RT-PCR v tejto skupine (dáta neuvedené). V ostatných skupinách myši infikovaných s rozdielnymi dávkami vírusu sme nezaznamenali signifikantný rozdiel.

Tab. 3 *In vivo* replikačná aktivita vírusov Ab4 a Dun v pľúcach myši

Infekčná dávka [PFU/ml]	RCA Titer	
	Ab4	Dun
8×10^4	800	800-1600
4×10^4	800	6400
2×10^4	1600	800

Záver

V našej práci sme porovnávali 2 antigénne príbuzné vírusy s rozdielnym pH optimom fúznej aktivity, ktorá je podmienená konformačnou zmenou v HA. Pri mutantnom víruse Ab4 sme zaznamenali pri pH 6,5 už 58% konformačne zmeneného- HA, zatiaľ čo pri víruse Dun to bolo len 30,5%. Najvýraznejší rozdiel sme pozorovali pri pH 5,5, kedy u vírusu Ab4 bolo 100% konformačne zmených HA a u vírusu Dun len 45,3%. Z toho vyplýva, že vírus Ab4 s mutáciou H do R nepotrebuje na aktiváciu svojej fúzogénnej aktivity vystavenie tak nízkemu pH ako to je u antigénne príbuzného vírusu Dunedin. Tieto zistenia sme potvrdili aj hemolytickým testom. Nepozorovali sme však rozdiel v *in vivo* replikácii vírusov Ab4 a Dun v myších pľúcach na druhý deň po infekcii. Taktiež sme nepozorovali výrazný rozdiel v protilátkovej odpovedi (dáta neuvedené). Možné vysvetlenie je, že vírusy Ab4 a Dun sú vírusy s nízkou virulenciou a preto nespôsobili žiadne klinické prejavy infekcie a ani smrť u myši. V našich nasledujúcich štúdiách sa chceme zamerať na aminokyselinové zámény v HA vírusov so strednou (A/Mississippi/1/85(H3N2) a vysokou virulenciou A/PR8/34(H1N1), aby sme zistili, či u virulentnejších vírusov môže dôjsť v dôsledku uvedených výmien spôsobujúcich zmenu fúznej aktivity následne k zmene virulencie a patogenity.

Pod'akovanie

Práca je podporovaná grantom APVV-0250-10 a VEGA grantmi 2/0176/12 a 2/0101/10.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Shekel J. J., Wiley D. C. (2000) *Annu. Rev. Biochem.* 69, p. 531
- [2] Plotch S. J., O'Hara B., Morin J., et al. (1999) *J. Virol.* 73, p. 140
- [3] Daniels R. S., Downie J. C., Hay A. J., et al. (1985) *Cell.* 40, p. 431
- [4] Russ G., Varečková E., Styk B. (1974) *Acta Virol.* 18, p. 299
- [5] Varečková E., Betáková T., Mucha V. (1995) *J. Immunol. Methods.* 180, p. 107
- [6] Varečková E., Mucha V., Čiampor F., et al. (1993) *Arch. Virol.* 130, p. 45
- [7] Varečková E., Mucha V., Wharthon S. A. et al. (2003) *Arch. Virol.* 148, p. 469
- [8] Tkáčová M., Varečková E., Baker I.C., et al. (1997) *J. Clin. Microb.* 35, p. 1196
- [9] Varečková E., Blaškovičová H., Gocník M., et al. (2006) *Acta Virol.* 50, p. 181
- [10] Formanowski F., Wharthon S. A., Calder L. J., et al. (1990) *J. Gen. Virol.* 71, p. 1181
- [11] Fislová T., Gocník M., Sládková T., et al. (2009) *Arch. Virol.* 154, p. 409
- [12] Stropkovská A., Mucha V., Fislová T., et al. (2009) *Acta Virol.* 53, p. 15

Somatometria slovenských vysokoškolských študentiek z PriF UK v Bratislave

Daniela Kramárová, Eva Neščáková, Radoslav Beňuš, Petra Uhrová, Michaela Dörnhöferová,
Silvia Bodoriková, Klaudia Kyselicová

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra antropológie,
Mlynská dolina B2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; kramaroad@fns.uniba.sk*

Abstract

The purpose of the present study was to monitor obesity and physical fitness among university students. The group consists of 109 female students of the Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava. Fifteen length and width measures were taken, as well as 12 circumference measures. There were calculated 14 body size indexes for each proband. According to the distribution of values in each index, most probands have a narrow chest (59.63%), 66.06% have a flat chest and 44.104% have a mesocephal head. According to Rohrer's Index 19.27% of probands are in the category of very weak, according to Pignet's Index 16.51% of probands are in the category of very thin, and according to Pignet-Vervaeck's Index 40.37% of probands are in the category of slim. According to the Body Mass Index (BMI) 12.84% of probands have overweight, 1.83% suffer from obesity and 13.76% from malnutrition. According to Conicity Index two probands (1.83%) have abdominal obesity, and as many as 82.57% of all probands have an increased risk in becoming obese in the region of the abdomen.

Key words: *Body composition; Body Mass Index; obesity; Rohrer's index.*

Úvod a formulácia cieľa

Všetky prebiehajúce zmeny pôsobia na komplexný vývoj človeka a odrážajú sa aj v zmenách telesnej stavby človeka, ktoré sú spôsobené trvajúcou rastovou akceleráciou a pôsobiacim sekulárnym trendom, čo sa zákonite prejavuje v celkovej zmene somatického habitatu ako jedinca, tak celej populácie. Napriek tomu, že indexy telesných rozmerov vyjadrujú vzájomnú proporcionalitu tela a jeho častí, je dôležité poznať veľkosti jednotlivých indexov, pretože jedinec sa počas ontogenetického vývinu mení. Na základe veľkosti indexov telesných rozmerov môžeme charakterizovať príslušníkov rôznych populácií z hľadiska proporcionality tela [1].

Cieľom práce bolo zistiť telesnú stavbu vysokoškolských študentiek na základe indexov telesných rozmerov.

Materiál a metódy

Súbor pozostáva zo 109 študentiek Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave. Priemerný decimálny vek študentiek je $19,808 \pm 0,765$ roku s vekovým rozpätím 18,337 – 22,964 roku. Zistovali sme 15 antropometrických rozmerov – telesnú hmotnosť,

telesnú výšku – TV, výšku po acromiale, výšku po daktylion III, výšku po iliospinale, výšku v sede, biakromiálnu šírku ramien, bikristálnu šírku panvy, bispinálnu šírku panvy, transversálny priemer hrudníka, sagitálny priemer hrudníka, šírku hlavy, dĺžku hlavy, epifyzárnú šírku humeru a epifyzárnú šírku femuru a 12 obvodových rozmerov – obvod hlavy, obvod hrudníka, obvod pásu, obvod brucha, obvod bokov, obvod ramena uvoľneného, obvod ramena napnutého, obvod predlaktia, obvod zápästia, obvod stehna gluteálny, obvod lýtka a obvod členka. Všetky rozmery boli zisťované podľa metodiky Martina a Sallera [2]. Z nameraných rozmerov bolo vypočítaných 13 indexov telesných rozmerov: index výšky v sede k TV, index dĺžky horných končatín k TV, index dĺžky dolných končatín k TV, index biakromiálnej šírky ramien k TV, index bikristálnej šírky panvy k TV (tieto indexy boli počítané podľa Brougsha) [2], index obvodu hrudníka k TV (index bol počítaný podľa Oliviera) [2], torakálny index [3], Rohrerov index [4], Pignetov index, Pignet-Vervaeckov index, cefalický index [5], BMI [6] a kónický index [7]. Pri štatistickom spracovaní sme použili Studentov t-test.

Výsledky a diskusia

V tabuľke 1 je uvedené rozdelenie pre index výšky v sede k TV a pre index dĺžky horných končatín k TV a ich zastúpenie v sledovanom súbore. Podľa indexu výšky v sede k TV sa najčastejšie vyskytli študentky s dlhým trupom (makrokormický; 58,72 %) a najmenej často sa vyskytli s krátkym trupom (brachykormický; 11,93 %). Podľa indexu dĺžky horných končatín k TV sa najčastejšie vyskytli študentky s krátkymi hornými končatinami (brachybrachion; 50,46 %) a najmenej často sa vyskytli s dlhými hornými končatinami (makrobrachion; 19,27 %).

Tab. 1 Rozdelenie pre index výšky v sede k TV (podľa Brougsha) a index dĺžky horných končatín k TV (podľa Brougsha) [2]

Index výšky v sede k telesnej výške			Index dĺžky horných končatín k telesnej výške		
Rozdelenie	N	f (%)	Rozdelenie	N	f (%)
Brachykormický	13	11,93	Brachybrachion	55	50,46
Metriokormický	32	29,36	Metriobrachion	33	30,28
Makrokormický	64	58,72	Makrobrachion	21	19,27
Spolu	109	100	Spolu	109	100

Legenda: N – počet jedincov, f (%) – frekvencia v percentách

V tabuľke 2 je uvedené rozdelenie pre index dĺžky dolných končatín k TV a pre index biakromiálnej šírky ramien k TV a ich zastúpenie v sledovanom súbore. Podľa indexu dĺžky dolných končatín k TV sa najčastejšie vyskytli študentky s dlhými dolnými končatinami

(makroskel; 88,99 %) a najmenej často sa vyskytli so stredne dlhými dolnými končatinami (metrioskel; 4,59 %). Podľa indexu biakromiálnej šírky ramien sa najčastejšie vyskytli študentky s úzkymi ramenami (45,87 %) a najmenej často sa vyskytli so širokými ramenami (15,60 %).

Tab. 2 Rozdelenie pre index dĺžky dolných končatín k TV (podľa Brougsha) a index biakromiálnej šírky ramien k TV (podľa Brougsha) [2]

Index dĺžky dolných končatín k telesnej výške			Index biakromiálnej šírky ramien k telesnej výške		
Rozdelenie	N	f (%)	Rozdelenie	N	f (%)
Brachyskel	7	6,42	Úzke ramená	50	45,87
Metrioskel	5	4,59	Stredne široké	42	38,53
Makroskel	97	88,99	Široké ramená	17	15,60
Spolu	109	100	Spolu	109	100

Legenda: N – počet jedincov, f (%) – frekvencia v percentách

V tabuľke 3 je uvedené rozdelenie pre index bikristálnej šírky panvy k TV a pre index obvodu hrudníka k TV a ich zastúpenie v sledovanom súbore. Podľa indexu bikristálnej šírky panvy k TV sa najčastejšie vyskytli študentky s úzkou panvou (stenopyelický; 73,39 %) a najmenej často sa vyskytli so širokou panvou (eurypyelický; 9,17 %). Podľa indexu obvodu hrudníka k TV sa najčastejšie vyskytli študentky s úzkym hrudníkom (59,63 %) a najmenej často sa vyskytli so širokým hrudníkom (7,34 %).

Tab. 3 Rozdelenie pre index bikristálnej šírky panvy k TV (podľa Brougsha) a index obvodu hrudníka k TV (podľa Oliviera) [2]

Index bikristálnej šírky panvy k telesnej výške			Index obvodu hrudníka k telesnej výške		
Rozdelenie	N	f (%)	Rozdelenie	N	f (%)
Stenopyelický	80	73,39	Úzky hrudník	65	59,63
Metriopyelický	19	17,43	Stredne široký	36	33,03
Eurypyelický	10	9,17	Široký hrudník	8	7,34
Spolu	109	100	Spolu	109	100

Legenda: N – počet jedincov, f (%) – frekvencia v percentách

V tabuľke 4 je uvedené rozdelenie pre torakálny index a cefalický index (index cephalicus) a ich zastúpenie v sledovanom súbore. Podľa torakálneho indexu sa najčastejšie vyskytli študentky s plochým hrudníkom (66,06 %) a najmenej často sa vyskytli so súdkovitým hrudníkom (7,34 %). Podľa cefalického indexu sa najčastejšie vyskytli študentky so stredne dlhou hlavou (mesocephal; 44,04 %) a najmenej často sa vyskytli s dlhou hlavou (dolichocephal; 16,51 %).

V tabuľke 5 je uvedené rozdelenie pre BMI (Body Mass Index) a pre Rohrerov index (index telesnej plnosti) a ich zastúpenie v sledovanom súbore. Podľa BMI má 12,84 % študentiek zo sledovaného súboru nadhmotnosť, dve študentky (1,83 %) trpia obezitou a 13,76 % podvýživou. Podľa Rohrerovho indexu sa najčastejšie vyskytli študentky

v kategórii veľmi silný (24,77 %), pričom druhou najčastejšie sa vyskytujúcou kategóriou u študentiek je kategória veľmi slabý (19,27 %). Najmenej často sa vyskytujú v našom sledovanom súbore študentky v kategórii silný (9,17 %).

Tab. 4 Rozdelenie pre torakálny index [3] a index cephalicus (upravené podľa Williama et al.) [8]

Torakálny index			Index cephalicus		
Rozdelenie	N	f (%)	Rozdelenie	N	f (%)
Plochý hrudník	72	66,06	Dolichocephal	18	16,51
Klenutý hrudník	29	26,61	Mesocephal	48	44,04
Súdkovitý hrudník	8	7,34	Brachycephal	43	39,45
Spolu	109	100	Spolu	109	100

Legenda: N – počet jedincov, f (%) – frekvencia v percentách

Tab. 5 Rozdelenie pre BMI [6] a Rohrerov index [4]

BMI			Rohrerov index		
Rozdelenie	N	f (%)	Rozdelenie	N	f (%)
Podvýživa	15	13,76	Veľmi slabý	21	19,27
Normálne rozpätie	78	71,56	Slabý	16	14,68
Nadhmotnosť	14	12,84	Stredný	19	17,43
Obezita I. stupňa	1	0,92	Dobrý	16	14,68
Obezita II. stupňa	0	0	Silný	10	9,17
Obezita III. stupňa	1	0,92	Veľmi silný	27	24,77
Spolu	109	100	Spolu	109	100

Legenda: N – počet jedincov, f (%) – frekvencia v percentách

V tabuľke 6 je uvedené rozdelenie pre kónický index a jeho zastúpenie v sledovanom súbore. Podľa tohto indexu majú dve študentky (1,83 %) abdominálnu obezitu, pričom až 82,57 % študentiek má zvýšené riziko abdominálnej obezity.

Tab. 6 Rozdelenie pre kónický index [7]

Kónický index		
Rozdelenie	N	f (%)
< 1 (bez rizika)	17	15,60
≥1 (zvýšené riziko)	90	82,57
≥1,18 (abdominálna obezita)	2	1,83
Spolu	109	100

Legenda: N – počet jedincov, f (%) – frekvencia v percentách

V tabuľke 7 je uvedené rozdelenie pre Pignetov index (index robusticity) a jeho zastúpenie v sledovanom súbore. Podľa tohto indexu sa najčastejšie vyskytli študentky v kategórii slabší (22,94 %), pričom druhou najčastejšie sa vyskytujúcou kategóriou u študentiek je kategória veľmi chudý a veľmi silný s rovnakým zastúpením (16,51 %). Najmenej často sa vyskytujú v našom sledovanom súbore študentky v kategórii dobrý (4,59 %).

V tabuľke 8 je uvedené rozdelenie pre Pignet-Vervaekov index a jeho zastúpenie v sledovanom súbore. Podľa tohto indexu sa najčastejšie vyskytli študentky v kategórii stredný (42,20 %), pričom druhou najčastejšie sa vyskytujúcou kategóriou u študentiek je kategória štíhly (40,37 %). Najmenej často sa vyskytujú v sledovanom súbore študentky v kategórii hyperstenický (2,75 %), pričom v kategórii astenický sa nevyskytovala ani jedna študentka.

Tab. 7 Rozdelenie pre Pignetov index [5]

Pignetov index		
Rozdelenie	N	f (%)
Veľmi silný	18	16,51
Silný	10	9,17
Dobrý	5	4,59
Stredný	17	15,60
Slabší	25	22,94
Chudý	16	14,68
Veľmi chudý	18	16,51
Spolu	109	100

Legenda: N – počet jedincov, f (%) – frekvencia v percentách

Tab. 8 Rozdelenie pre Pignet-Vervaekov index [5]

Pignet – Vervaekov index		
Rozdelenie	N	f (%)
Astenický	0	0
Štíhly	44	40,37
Stredný	46	42,20
Silný	16	14,68
Hyperstenický	3	2,75
Spolu	109	100

Legenda: N – počet jedincov, f (%) – frekvencia v percentách

V tabuľke 9 je uvedené porovnanie priemerných hodnôt vybraných indexov telesných rozmerov so štúdiou Bláhu et al. [1]. Zistili sme, že študentky zo sledovaného súboru majú signifikantne dlhšie dolné končatiny, užšie ramená a širšiu panvu ako ženy vo vekovej kategórii 18,00 – 22,99 rokov pred vyše 30 rokmi. Z výsledkov vyplýva, že sekulárny trend zrejme aj naďalej pretrváva.

Tab. 9 Porovnanie indexov telesných rozmerov so štúdiou Bláhu et al. [1]

Indexy	Aktuálna štúdia (N=109)		Bláhu et al. [1] (N=213)		P – value
	Priemer	SD	Priemer	SD	
Index dĺžky horných končatín k telesnej výške	43,10	1,25	43,12	1,68	n.s.
Index dĺžky dolných končatín k telesnej výške	56,12	1,40	53,78	1,25	***
Index biakromiálnej šírky ramien k telesnej výške	21,53	1,03	22,04	0,94	***
Index bikristálnej šírky panvy k telesnej výške	17,01	1,20	16,38	1,25	***
Index obvodu hrudníka k telesnej výške	50,46	4,04	50,44	2,86	n.s.
Torakálny index	68,87	7,49	69,06	5,76	n.s.

Záver

V sledovanom súbore sa najčastejšie vyskytuje dlhý trup (58,72 %), krátke horné končatiny (50,46 %), dlhé dolné končatiny (88,99 %), úzke ramená (45,87 %), úzka panva (73,39 %), úzky (59,63 %) a plochý hrudník (66,06 %) a stredne dlhá hlava (44,04 %). Podľa indexu telesnej plnosti sledovaný súbor spadá do kategórie veľmi silný (24,77 %), podľa indexu robusticity do kategórie slabší (22,94 %) a podľa Pignet-Vervaeckovho indexu do kategórie stredný (42,20 %). Podľa BMI sa väčšina probandiek v sledovanom súbore vyskytuje v normálnom rozpätí, ale 13,76 % zo súboru trpí podvýživou a 12,84 % zo súboru má nadhmotnosť. Pri porovnaní priemerných hodnôt indexov telesných rozmerov so ženami v rovnakej vekovej kategórii, ktoré sledoval Bláha et al. [1], sme zistili signifikantné rozdiely, čo by mohlo vypovedať o naďalej pokračujúcom sekulárnom trende.

Pokračovaním práce bude sledovanie intersexuálnych rozdielov u vysokoškolských študentov a študentiek.

Pod'akovanie

Tento projekt vznikol vďaka finančnej podpore UK/50/2013 „Výskyt obezity, nadváhy a miera fyzickej zdatnosti u vysokoškolských študentov“.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Bláha, P., Štěpánová, E., Veverková, L., et al. (1982) Antropologie československé populace od 6 do 35 let (Československá spartakiáda 1980). Oddělení zdravotnického zajištění vrcholového sportu ÚNZ, Praha, p. 11
- [2] Martin, R., Saller, K. (1957) Lehrbuch der Anthropologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, p. 348
- [3] Riegerová, J., Přidalová M., Ulbrichová M. (2006) Aplikace fyzické antropologie v tělesné výchově a sportu. HANEX, Olomouc, p. 16
- [4] Knussmann, R. Barlett, H. L., Berghaus, G., et al. (1988) Anthropologie. Handbuch der vergleichenden Biologie des Menschen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, p. 177
- [5] Fetter, V., Prokopec, M., Suchý, J., et al. (1967) Antropologie. Academia, Praha, p. 68
- [6] WHO (2000) Obésité: Prévention et Prise en Charge de L'épidémie Mondiale. WHO, Geneva, p. 10
- [7] Valdez, R. (1991) A simple model-based index of abdominal adiposity. J.C.E. 44, p. 955
- [8] Mahajan, A., Khurana, B. S., Barta, A. P. S., et al. (2009) The Study of Cephalic Index in Punjabi Students. JPAFMAT. 9, p. 66

Local-scale genetic structure in the spruce bark beetle, *Ips typographus* L. (Curculionidae, Scolytinae) in Carpathian Mountains

Eva Krascsenitsová, Milan Kozánek, Ladislav Roller

Institute of Zoology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, SK-845 06 Bratislava, Slovakia; eva.krascsc@gmail.com

Abstract

In order to quantify the degree of *Ips typographus* population differentiation, 19 sites from the Carpathians were analyzed using the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI). In total 178 individuals were studied. Twelve different haplotypes were identified, where 42% were new haplotypes. While differences were observed in the haplotype distribution and diversity between the Western/Southern Carpathians (Tatra Mountains/Transylvania Alps) and Eastern Carpathians (Beskids Mountains), our results in general reflect those obtained on the European scale, where strong gene flow exists between populations. This small scale analysis reveals that the Carpathian Mountains have been an important glacial and postglacial refuge for *I. typographus*. Further, data show that the Eastern Beskidian Mountains of the Carpathians could act as barrier for some European haplotypes. This information is important for a preventive and reactive forest management.

Keywords: *COI; glacial refugia; population structure; gene flow; dispersal*

Introduction and aims of the study

The European bark beetle *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytinae) is one of the most economically important forest pests in Europe. It is considered as a monophagous species colonizing usually weakened or freshly dead Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) in Eurasia. Due to its striking ecological and economic damage in European spruce forests, *I. typographus* is the target of numerous research projects on ecological, genetic and phytosanitary aspects [1]. Molecular approaches have been used in population genetic studies of forest pests since a better understanding of population dynamics and its driving forces is crucial for establishing management. Mitochondrial and nuclear markers have been applied to analyze the phylogeography scheme and the evolutionary history of *I. typographus* populations in Europe [2]. However, the recent discovery of cryptic numts in *I. typographus* [3] and the re-analysis of key European populations with a wider sampling size [Bertheau et al. accepted] improved our knowledge in phylogeography. Overall, due to high gene flow, a low population differentiation was observed. The Carpathians are important for biodiversity and belongs to one of the major refuges for many organisms during the last glacial periods [4, 5, 6, 7]. The Norway spruce, *P. abies*, survived the last glaciations in the Carpathians [8], where it is still the dominant tree species. While the phylogeography of *I. typographus* has been relatively well investigated in Europe, there are still gaps on small scale, *i.e.* in the

Carpathians only two populations were previously studied [9, 10, Bertheau et al. accepted].

Here we aimed to study the genetic variation and structure of *I. typographus* populations in the Carpathians. In order to obtain detailed information about the genetic diversity of this particular refugial area, we have chosen the mitochondrial COI marker. These findings were compared to the data recently published by Bertheau et al. [accepted]. Besides getting a picture about the genetic structure at a small spatial scale, we aimed to unravel the amount of glacial refugia in the Carpathians and the barriers of the Carpathian mountain ranges for *I. typographus* during and after the last glaciations event.

Material and methods

From 19 populations in the Carpathian region, *I. typographus* adults were collected (Table 1, Fig.1A). Genomic DNA was extracted using the Dneasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) following manufacturer's protocol. An 875-bp fragment of COI was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) according to Stauffer et al. protocol [9]. PCR products were purified using the QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN) and the sequencing was performed externally by Macrogen service Inc. (Seoul, Korea). Sequences were edited using the programs: CHROMAS 1.45, CLUSTAL W as implemented in Bioedit version 7.1.3. The statistical analyses were performed using programs implemented by Clement et al. [12], Excoffier et al. [13], Excoffier et al. [14], Petit et al. [15] and Pons and Petit [16].

Results and discussion

DNA from 178 individuals of *I. typographus* from the 19 Carpathian populations were successfully amplified and sequenced. The final alignment of the COI sequences comprised 558-bp, with a total of 12 polymorphic nucleotides of which one was parsimony informative. All mutations were transitions and on the third codon position not affecting the amino acids. 12 different haplotypes were identified and after alignment with the *I. typographus* haplotypes detected by Bertheau et al. [3, accepted], 42% new haplotypes coded It30 to It34 could be characterized (Table 1, Fig.1).

One finding that emerged from this study was the high number of haplotypes observed in this area compared to the previous study of Bertheau et al. [accepted]. The haplotype HTI, the most widely found in Europe, was also the main haplotype in the Carpathians followed by the haplotypes It1, It19 and HTII (Fig.1B). However, it was interesting that haplotype HTII was only the fourth most commonly detected haplotype in the Carpathians with 7.8% of

individuals, whereas it was the second commonly represented on the European scale (Fig.1C).

Tab. 1: Characteristics of *Ips typographus* sampling sites. Within-population haplotypes and diversity indices. Numbers in bracket after haplotype name is the number of individuals with that haplotype. WC :Western Carpathians; EC: Eastern Carpathians; SC: Southern Carpathians; C.r.: Carpathian region; N: number of sequenced individuals; HT: number of haplotypes; *Hd*: haplotype diversity; r: allelic richness

Country	Site	Code	C. r.	N	#HT	HT	<i>Hd</i> ± SD	r [5]
Slovakia	Tichá dolina valley	S1	WC	9	3	HTI(6), It1(2), It34(1)	0.51 ± 0.16	1.278
Slovakia	Mengusovská dolina valley	S2	WC	6	2	HTI(4), HTII(2)	0.53 ± 0.17	1.000
Slovakia	Pod nechcerkom	S3	WC	11	4	It1(5), HTI(3), It19(2), HTII(1)	0.75 ± 0.10	2.048
Slovakia	Hrebienok	S4	WC	10	4	HTI(5), It1(2), It19(2), HTII(1)	0.73 ± 0.12	2.052
Slovakia	Velická dolina valley	S5	WC	9	3	HTI(6), It1(2), It32(1)	0.56 ± 0.17	1.389
Slovakia	Bielovodská dolina valley	S6	WC	11	2	HTI(7), It1(4)	0.51 ± 0.10	0.955
Slovakia	Liptovský Ján	S7	WC	21	6	HTI(11), It19(4), It1(3), HTII(1), It7(1), It33(1)	0.70 ± 0.09	1.977
Slovakia	Brezno	S8	WC	6	3	It1(3), HTII(2), HTI(1),	0.73 ± 0.16	1.833
Slovakia	Sklené	S9	WC	9	4	HTI(3), It1(3), It19(2), HTII(1)	0.81 ± 0.09	2.294
Slovakia	Blatnica	S10	WC	8	4	It1(3), HTII(2), It19(2), HTI(1),	0.82 ± 0.10	2.393
Slovakia	Široká dolina valley	S11	WC	12	5	HTI(7), HTII(2), It1(1), It19(1), It30(1)	0.67 ± 0.14	1.931
Slovakia	Ždiar	S12	WC	9	5	HTI(4), It19(2), HTII(1), It1(1), It5(1)	0.81 ± 0.12	2.492
Poland	Morskie oko	P1	WC	11	3	HTI(8), It1(2), HTII(1)	0.47 ± 0.16	1.182
Romania	Vaser-Maramures	R1	EC	8	3	HTI(6), It18(1), It31(1)	0.46 ± 0.20	1.250
Romania	Comandau-Covasna	R2	EC	11	3	HTI(8), It19(2), It18(1)	0.47 ± 0.16	1.182
Romania	Tomnatec-Cluj	R3	EC	9	1	HTI(9)	0.00 ± 0.00	0.000
Romania	Padis-Oradea	R4	EC	7	1	HTI(7)	0.00 ± 0.00	0.000
Romania	Garcin-Brasov	R5	SC	5	3	HTI(2), It1(2), It18(1)	0.80 ± 0.16	2.000
Romania	Gradiste-Hunedoara	R6	SC	6	2	HTI(4), It5(2)	0.53 ± 0.17	1.000
Total				178	12		0.62±/0.08	

Furthermore, while the total genetic diversity is similar to that obtained in Europe, a clear difference exists between the Western and Eastern Carpathians. The Western (Tatra Mountains) was richer in haplotypes than the Eastern Carpathians, with It1 and It19 highly represented and with six specific haplotypes (HTII, It7, It30, It32-34). In the Eastern Carpathians two populations presented only one haplotype and only two specific haplotypes were observed (It18, It31). Consequently, genetic diversity was highest among Western Carpathian populations and null or low within Eastern ones, which led to obvious differences. This West/East contrast was also revealed by AMOVA despite the shallow structure. The Southern Carpathians (Transylvania Alps) presented also one population with high genetic diversity and all individuals shared haplotypes found specifically either in the Tatra (It1 and It5) or Beskids Mountains (It18). Discrepancy among Carpathian Mountains was also found in other plants [17] and insect species [18]. Hence, it has been suggested that Carpathians were divided into several refugial areas showing different genetic lineages within one mountain system [19]. Despite these differences among the Carpathian Mountains, a general tendency to an absence of global genetic differentiation among *I. typographus* populations

appeared through the genetic analyses. Firstly, the AMOVA showed that the greatest genetic diversity was found within populations. Secondly, the haplotype network was star-shaped, typical for a recent demographic expansion, with HTI at the central position and the other haplotypes deriving from it by a maximum of three mutation events. In insect species exhibiting recent range expansion, it was not rare to find a large proportion of genetic variation within populations [20]. One explanation for these discrepancies could be the distribution of HTI, represented at high frequency in all populations, as well as the close relationships between haplotypes, which erase the differences between the different parts of the Carpathians. Another explanation might be the unbalanced sampling between the Western and Eastern Carpathians, which could confer higher genetic diversity and the detection of more specific haplotypes. Subject to confirmation using a larger sampling size, the lack of genetic differentiation and the occurrence of four common haplotypes (HTI, It1, It5 and It19) among the Carpathians suggest important gene flow which is consistent with previous studies using nuclear markers [9, 10]. *I. typographus* is known to have good dispersal capacities [e.g. 21] which consequently may result in low levels of genetic structure.

Further, several scenarios could be proposed regarding refugial area and colonization routes of *I. typographus* integrating haplotypes distribution and frequency from previous and current studies, as well as information related to the glacial distribution of *P. abies*. *I. typographus* appeared to have a relatively recent expansion event dating back to the Holocene (ca. 7-15 kya) from a single late-Pleistocene glacial refuge. Owing to its monophagy, *I. typographus* was necessarily restricted in one of the refugial areas of its host *P. abies* during the last glacial maximum [Bertheau et al. accepted]. The Carpathian Mountains, known to be one of the refugial areas of *P. abies* during the Quaternary ice ages, harboured several isolated refugia, two in the Northern Carpathians including Western Carpathians (Tatra Mountains) and the northern part of the Eastern Carpathians (Beskids Mountains) as well as one in the Southern Carpathians (Transylvania Alps) [8]. The presence and significant frequencies of the main European haplotypes (HTI, HTII and It1) of *I. typographus* as well as the high genetic diversity found in the Tatra and Transylvania regions suggest that these two areas may also be glacial refugia for *I. typographus*. From there, westward and northward recolonisations took place as most of the specific Carpathians haplotypes were found in the neighbouring countries such as Austria, Belarus or Finland [Bertheau et al. accepted], (Fig.1C). An interesting point to consider is that the haplotype HTII and related ones were not found in the southern and eastern Carpathians populations in this study, nor in the north-

eastern ones from Belarus to Scandinavia and Moscow [Bertheau et al. accepted]. It seems the Beskids mountains could have acted as a natural barrier for the haplotype HTII limiting its expansion further north.

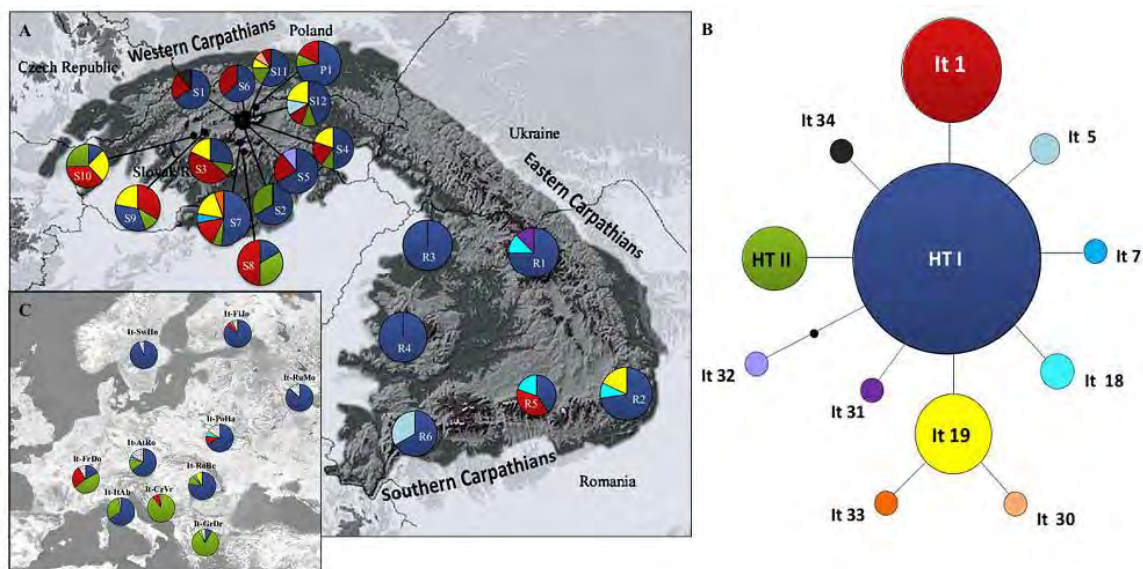


Fig. 1: Haplotype distribution and haplotype network of 178 Carpathians *Ips typographus* COI sequences. Haplotypes HTI-HTII and It1-It19 are those identical to Stauffer et al. [9] and Bertheau et al. [3, accepted] respectively, while newly identified ones are coded It30-It34. **A.** Geographic distribution of the haplotypes among the 19 sampled populations. Sites names and precise coordinates are given in Table 1. **B.** Haplotype network of the 12 haplotypes detected in Carpathians *I. typographus*. Each line corresponds to a mutational step and each empty circle to a missing intermediate. Haplotype frequencies are represented by the size of the circle. **C.** Geographical distribution of the mitochondrial COI haplotypes among the European populations from Bertheau et al. [accepted]. Only haplotypes found in this present study are represented.

Conclusion

The findings of this study clearly demonstrate that a small-scale genetic approach is crucial both to supplement results of earlier European scale phylogeographic studies on *I. typographus* population history and to provide critical information for both preventative and reactive forest management. Moreover, the observed differentiation within one mountain system and potential natural barriers for organism dispersion could help to complement the frame about the glacial refugia, since molecular studies focusing on geographical patterns of genetic structure of Carpathian populations are limiting. With better sampling and the use of nuclear markers [22, 23] we will be able to gain a clearer picture of the migration and colonisation of *I. typographus* in the Carpathian area after the last ice age.

Acknowledgments

This work is part of the PhD thesis of E. Krascenitsová and is funded by the

Operational Program of Research and Development and co-financed with the European Fund for Regional Development (EFRD). Grant: ITMS 26220220087: The development of ecological methods to control chosen forest pests in vulnerable mountainous regions of Slovakia.

References

- [1] Lieutier F., Day K. R., Battisti A., et al. (2004) Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis. Kluwer Academic Publishers, Germany.
- [2] Avtzis D. N., Bertheau C., Stauffer C. (2012) *Insects* 3, p. 453
- [3] Bertheau C., Krumböck S., Schuler H., et al. (2011) *Mol Ecol Resour* 11, p. 1056
- [4] King R. A., Ferris C. (1998) *Mol Ecol* 7, p. 1151
- [5] Magri D., Vendramin G. G., Comps B., et al (2006) *New Phytologist* 171, p. 199
- [6] Kotlik P., Deffontaine V., Mascheretti S., et al. (2006) *P Natl Acad Sci USA* 103, p. 14860
- [7] Mardulyn P., Mikhailov Y. E., Pasteels J. M. (2009) *Evolution* 63, p. 2717
- [8] Tollefsrud M. M., Kissling R., Gugerli F., et al. (2008) *Mol Ecol* 17, p. 4134
- [9] Stauffer C., Lakatos F., Hewitt G. M. (1999) *Mol Ecol* 8, p. 763
- [10] Sallé A., Arthofer W., Lieutier F., et al. (2007) *Biol J Linn Soc* 90, p. 239
- [12] Clement M., Posada D., Crandall K. (2000) *Mol Ecol* 9, p. 1657
- [13] Excoffier L., Smouse P. E., Quattro J. M. (1992) *Genetics* 131, p. 479
- [14] Excoffier L., Laval G., Schneider S. (2005) *Evol Bioinform* 1, p. 47
- [15] Petit R., El Mousadik A., Pons O. (1998) *Conserv Biol* 12, p. 844
- [16] Pons O., Petit R. J. (1996) *Genetics* 144, p. 1237
- [17] Mraz P., Gaudeul M., Rioux D., et al. (2007) *J Biogeogr* 34, p. 2100
- [18] Pauls S. U., Lumbsch H. T., Haase P. (2006) *Mol Ecol* 15, p. 2153
- [19] Schmitt T. (2009) *Front Zool* 6, p. 9
- [20] Conord C., Lempérière G., Taberlet P., et al. (2006) *Heredity* 97, p. 46
- [21] Gries G. (1985) *Z Angew Entomol* 99, p. 12
- [22] Stoeckle B. C., Kuehn R. (2011) *Eur J Entomol* 108, p. 169
- [23] Vos P., Hogers R., Bleeker M., et al. (1995) *Nucleic Acids Res* 23: 4407

Mäsožravosť rastlín – výhoda v prostredí s nedostatkom živín

Miroslav Krausko, Michaela Libiaková

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyziológie rastlín,
Mlynská dolina B2, 842 15 Bratislava, Slovensko, krausko86@gmail.com*

Abstrakt

In the present study we investigate complex carnivorous syndrome in sundew (*Drosera capensis*). We fed plants with *Drosophila melanogaster* and unfed plants served as control. We used gas exchange measurements simultaneously with detection of chlorophyll *a* fluorescence to estimate benefit from prey capture. Further we used elemental analysis to show differences in elemental composition between control and fed plants. For assessment of enzymatic activity of digestive fluid of *Drosera capensis* we used chromogenic substrates to characterize activity of four enzymes. We proved that fed plants have increased rate of photosynthesis (A_n), effective quantum yield of photosynthesis (Φ_{PSII}) and also higher levels of mineral nutrients. Enzymatic activities of acid phosphatases and phosphodiesterases significantly increased in response to prey and also after mechanical stimulation. Proteolytic activity was also higher in fed plants. Activities of β -D-glucosidases and N-acetyl- β -D-glucosaminidases were not detected.

KLúčové slová: *Mäsožravé rastliny; Drosera; hmyz; tráviace enzýmy; dusík; fosfor; fotosyntéza.*

Úvod a formulácia cieľa

Mäsožravé rastliny už celé stáročia od doby Charlesa Darwina fascinujú vedcov pre svoju schopnosť lákať, chytať a tráviť korisť. Ale aj v súčasnej dobe je o ne zvýšený záujem [1, 2, 3]. Prírodovedec Thomas Givnish bol prvý, kto si uvedomil, že mäsožravé rastliny rastú na slnečných, na živiny chudobných a vlhkých stanovištiach a v tomto prostredí zisk z mäsožravosti prekračuje investície do tohto spôsobu života a zaviedol model investície a zisku u mäsožravých rastlín [4]. Náklady na mäsožravosť predstavujú uhlík potrebný na stavbu pasce, produkciu návnady, slizu a tráviacich enzýmov vo fotosynteticky neefektívnych pasciach [5, 6, 7]. Niektorí autori dokonca zistili zvýšenú rýchlosť respirácie v pasci minimálne počas obdobia vysokej metabolickej aktivity, napr. rýchly pohyb pasce v *Dionaea muscipula* [8,9]. Hypotéza podľa Givnisha predpokladá, že primárnou výhodou mäsožravosti je zvýšená efektivita fotosyntézy [4]. Desiatky štúdií skúmali účinok kŕmenia na rast a obsah minerálnych živín v pletivách mäsožravých rastlín s výrazným pozitívnym efektom [10]. Experimentálne štúdie zaoberajúce sa prínosom trávenia koristi na rýchlosť fotosyntézy sú nepostačujúce a nejednoznačné [1]. Rozchádzajúce sa výsledky svedčia o potrebe ďalšieho výskumu v tejto oblasti. Nedávno bol modifikovaný model investície a zisku pre vodné mäsožravé rastliny [2]. Stimulácia rastového vrcholu stonky prostredníctvom zvýšeného príjmu N a P pre základné rastové procesy ako je delenie buniek, DNA replikácia a proteosyntéza bola určená ako primárny benefit z koristi [11, 12].

Vzhľadom k tomu, že syndróm mäsožravosti zahŕňa komplexnú sadu vlastností, v tejto štúdií skúmame produkciu tráviacich enzýmov, trávenie koristi, príjem živín a ich pozitívny vplyv na rastové procesy a fotosyntézu. Merali sme činnosť enzýmov v tráviacej tekutine pred a po kŕmení rastlín vínnymi muškami (*Drosophila melanogaster*) a po mechanickej stimulácii. Tiež sme kvantifikovali príjem živín z koristi a zhodnotili sme ich prínos pre rastlinu paralelným meraním výmeny plynov a fluorescencie chlorofylu *a*. Táto štúdia potvrdila pôvodnú hypotézu Givnish a kol. (1984), že prínosom trávenia koristi a príjmu živín je zvýšenie efektivity fotosyntézy.

Hlavným cieľom nášho výskumu bolo vytvoriť komplexný pohľad na spôsob získavania živín a výhod z trávenia koristi v mäsožravej rastline rosičke kapskej (*Drosera capensis*).

Materiál a metódy

Ako modelový organizmus sme použili rastlinu rosičku kapskú (*D. capensis* L.) pestovanú v skleníkových podmienkach. Ako modelovú korisť sme použili tzv. vínne mušky (*Drosophila melanogaster*).

Meraním enzymatickej aktivity sme analyzovali trávenie koristi u pokusných rastlín. Na experiment sme vybrali 30 pokusných rastlín *D. capensis*. Enzymatickú aktivitu sme indukovali tak, že sme na každý list položili 3 – 4 muchy *D. melanogaster*, pre mechanostimuláciu sme použili kúsky polystyrénu. Po 24 hodinách sme jeden kŕmený a jeden nekŕmený (kontrolný) list z každej rastliny odrezali skalpelom a vrchnú časť s tentakulami ponorili na tri minúty do 4 ml 50 mM acetátového tlmivého roztoku (pH 5,0). Rovnako sme zmerali pH aj po odobratí tekutiny. Takto nazbieraný sekrét tráviacich žliaz sme použili na analýzu štyroch enzýmov pomocou chromogénnych substrátov. Bis(4-nitrofenyl) fosfát, 4-nitrofenyl fosfát, 4-nitrofenyl β -D-glukopyranozid, 4-nitrofenyl N-acetyl- β -D-glukozamín (Sigma-Aldrich) sme použili na stanovenie aktivity fosfodiesteráz (PD), kyslých fosfatáz (AP), β -D-glukozidáz (BG) a N-acetyl- β -D-glukozaminidáz (NAG). Aktivitu každého enzýmu sme stanovovali zvlášť. Celkovú proteolytickú aktivitu sekrétu tráviacich žliaz sme stanovili iným spôsobom. 150 μ L vzorky sme zmiešali so 150 μ L 2% (w/v) albumínu hovädzieho séra (BSA) v 200 mM glycín-HCl tlmivom roztoku (pH 3,0). Inkubačný čas bol jedna hodina pri teplote 37°C. Reakciu sme zastavili pridaním 450 μ L 5 % (w/v) kyseliny trichlóroctovej. Vzorky sme vychladili v ľade 10 minút a centrifugovali pri 20 000 g, teplote 4°C, po dobu 10 minút. Absorbanciu supernatantu sme merali pri 280 nm na spektrofotometri Jenway 6705 UV/Vis (Bibby Scientific Ltd, Essex, VB). Jednotka

proteolytickej aktivity je definovaná ako vzrast absorbancie o 0,001 za 1 minútu pri vlnovej dĺžke 280 nm.

Na stanovenie zisku z trávenia koristi a absorpcie živín sme merali fotosyntetickú aktivitu v kŕmených a nekŕmených rastlinách *D. capensis*. Pre meranie sme vybrali podobné, rovnako staré rastliny strednej veľkosti. Päť rastlín sme počas desiatich týždňov prikrmovali vínnymi muškami (*D. melanogaster*) a päť rastlín slúžilo ako kontrola pričom nedostávali žiadne muchy. Mali príležitosť chytať len občasnú malú korisť v skleníku. Kŕmené rastliny dostávali 5 – 10 kusov mušiek každý týždeň. Dohromady 90 - 100 mušiek počas experimentu. Po uplynutí desiatich týždňov sme simultánne merali fluorescenciu chlorofylu *a* (Fluorcam FC1000LC, Photon Systems Instruments, Brno, Česká republika) a výmenu plynov pomocou infračerveného analyzátora (Ciras-2, PP-Systems, Hitchin, Veľká Británia) na mladých, plne vyvinutých listoch.

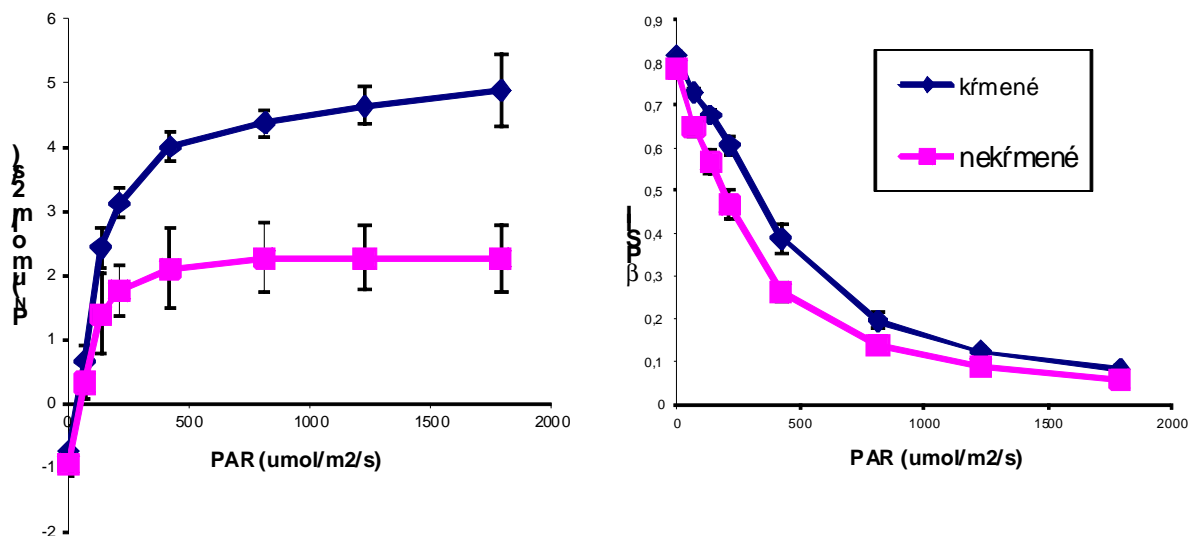
Po ukončení fotosyntetických meraní a analýzy obsahu pigmentov sme z experimentálnych rastlín pozbierali zvyšky exoskeletu mušiek *D. melanogaster*. Rastliny ako aj živočíšnu korisť sme sušili niekoľko dní pri 70°C. Vzorky boli rozomleté na jemný prášok. Jeden mg každej vzorky bol zabalený do cínovej kapsule a koncentrácia dusíka sa merala na prvkovom analyzátore Vario micro cube (Elementar, Hanau, Germany).

Vzorky zmineralizované za použitia silných kyselín boli použité na analýzu obsahu P, K, Ca a Mg [13]. Na analýzu fosforu bolo odobraných 1,8 – 2,4 mg suchej hmotnosti a materiál bol mineralizovaný HClO₄ a 6 - 7 mg bolo mineralizovaných HNO₃ na analýzu kationov kovov. Analýzy fosforu boli vyhodnocované kolorimetricky na automatickom analyzátore FIAstar 5010 Analyzer (Tecator, Švédsko). Koncentrácia kovových kationov bola určená na základe plameňovej atómovej absorpčnej spektrometrie použitím analyzátora AAS Varian AA240FS (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Päť nezávislých opakovaných meraní bolo vykonaných pre každý variant listového materiálu. Výsledky sú uvedené v % suchej hmotnosti.

Výsledky a diskusia

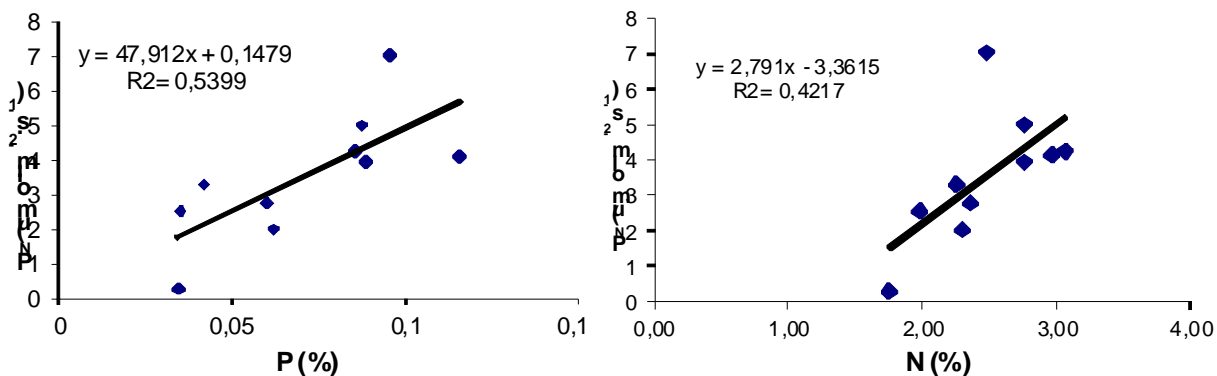
Meraním výmeny plynov a fluorescencie chlorofylu *a* sme zisťovali rozdiely medzi kŕmenými a nekŕmenými rastlinami (Obr. 1). Kŕmené rastliny mali vyššiu rýchlosť fotosyntézy (A_N), ktorá sa zvyšovala so zvyšujúcou sa intenzitou žiarenia. Nekŕmené rastliny mali fotosyntézu saturovanú pri nižšom ožiarení ako kŕmené rastliny. Efektívny kvantový výťažok fotosystému II (Φ_{PSII}), ktorý udáva aká časť fotónov absorbovaná chlorofylom *a* viazaným na fotosystém II sa využíva na fotochemickú reakciu, klesá so zvyšujúcou sa

intenzitou žiarenia. Φ_{PSII} bol nižší v kontrolných rastlinách v porovnaní s kŕmenými rastlinami.



Obr. 1 Závislosť rýchlosti fotosyntézy (vľavo) a hodnoty kvantového výťažku (vpravo) od intenzity žiarenia

Meranie obsahu prvkov N, P, K, Ca, Mg nám umožnilo spojiť tieto výsledky s príjmom živín z koristi. Korisť je dobrým zdrojom dusíka a fosforu ale nie vápnika, draslíka a magnézia (Tab. 2). Koncentrácia dusíka a fosforu výrazne stúpla v pletivách kŕmených rastlín. Tento vzostup koncentrácie je konzistentný s výkonom fotosyntetického aparátu (Obr. 2).



Obr. 2 Závislosť rýchlosti fotosyntézy od obsahu fosforu (vľavo) a dusíka (vpravo) v pletive listu

Analýza odobranej tráviacej tekutiny nám poskytla obraz o trávení koristi. Indukcia proteolytických enzýmov, kyslých fosfatáz a fosfodiesteráz koreluje so zvýšeným príjmom dusíka a fosforu z koristi. Aktivitu N-acetyl- β -D-glukozaminidáz sme nezistili. N-acetylglukozamín je monomérom chitínu ako polyméru, ktorý tvorí vonkajšiu kostru hmyzu.

Nepodarilo sa nám potvrdiť, že exoskelet slúži ako zdroj dusíka. Žiadna zistená aktivita β -D-glukozidáz naznačuje, že ani cukry z koristi neslúžia priamo ako zdroj živín.

Tab. 1 Obsah prvkov v rastlinách (hore) a koristi *Drosophila melanogaster* (dole). Štatistické významné rozdiely ($P < 0.05$) sú uvedené hrubo (t-test)

Prvok (% DW)	Nekfmená rastlina	Kfmená rastlina	<i>P</i>
N	2.128 ± 0.115	2.808 ± 0.102	0.0022
P	0.047 ± 0.006	0.094 ± 0.005	0.0004
K	1.810 ± 0.262	1.010 ± 0.061	0.0431
Ca	0.802 ± 0.120	0.572 ± 0.024	0.1332
Mg	0.752 ± 0.071	0.586 ± 0.032	0.0754

Prvok (% DW)	Muchy	Strávené muchy	Prijaté živiny (%)
N	9.860	5.880	40.4
P	0.987	0.094	90.5
K	0.991	0.271	72.7
Ca	0.071	0.293	- 312.6
Mg	0.113	0.113	0.0

Tab. 2 Enzymatická aktivita: fosfodiesteráz (PD), kyslých fosfatáz (AP), β -D-glukozidáz (BG) a N-acetyl- β -D-glukozaminidáz (NAG). Proteolytická aktivita (PA). ND-aktivita nebola detekovaná. ** - $P < 0.01$, * - $P < 0.05$, ns - nesignifikantné rozdiely v porovnaní s kontrolou (t-Studentov test)

Enzymatická aktivita	Kontrolné rastliny	Mechanická stimulácia	Kfmené rastliny
APs ($\mu\text{mol mg protein}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	24.73 ± 0.53	65.39 ± 6.01 **	296.905 ± 10.05 **
PDs ($\mu\text{mol mg protein}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	2.04 ± 0.10	4.07 ± 0.36 **	11.55 ± 0.54 **
NAGs ($\mu\text{mol mg protein}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	ND	ND	ND
BGs ($\mu\text{mol mg protein}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	ND	ND	ND
PA (U mg protein ⁻¹)	343.4 ± 68.6	360.5 ± 48.4 ^{ns}	1326.8 ± 161.6 **

Záver

Naše výsledky potvrdili indukciu enzymatickej aktivity mechanickou stimuláciou (fosfatázy, fosfodiesterázy) alebo chytaním koristi (fosfatázy, fosfodiesterázy, proteázy), účinný príjem N, P a K z koristi, ale nie Ca a Mg, zvýšenie koncentrácie N a P v listoch kŕmených rastlín a tiež zvýšenú účinnosť fotosyntézy v kŕmených rastlinách. Naše skleníkové štúdie predstavujú značné zjednodušenie a vyradenie vplyvu mnohých ekologických faktorov. Predstavujú skôr zhodnotenie potenciálnych schopností mäsožravých rastlín prijímať živiny z

koristi aj pôdy a využívať ich vo fotosyntéze a raste. Náš výskum potvrdil pôvodnú hypotézu investície a zisku, ktorú navrhol Givnish [4], že výhodou je zvýšenie účinnosti fotosyntézy ako reakcia na príjem živín z koristi.

Pod'akovanie

Naše pod'akovanie patrí Mgr. Andrejovi Pavlovičovi, PhD. za vedenie a odbornú pomoc, Maji Al Beyrouti za poskytnutie mušiek *D. melanogaster* na experimenty, Lubomírovi Adamcovi, Ladislavovi Marekovi a Jiřimu Šantrůčkovi za analýzy prvkov. Táto práca bola finančne podporená grantom VEGA 1/0520/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Ellison A. M., Gotelli N. J. (2009) J Exp Bot. 60, p. 19
- [2] Ellison A. M., Adamec L. (2011) Oikos 120, p. 1721
- [3] Król E., Płachno B. J., Adamec L., et al. (2012) Ann Bot. 109, p. 47
- [4] Givnish T. J., Burkhardt E. L., Happel R.E., et al. (1984) Am Nat. 124, p. 479
- [5] Thorén LM, Tuomi J, Kämäräinen T, et al. (2003) New Phytol. 159, p. 507
- [6] Pavlovič A, Masarovičová E, Hudák J. (2007) Ann Bot. 100, p. 527
- [7] Karagatzides J. D., Ellison A.M. (2009) Am J Bot. 96, p. 1612
- [8] Pavlovič A., Demko V., Hudák J. (2010) Ann Bot. 105, p. 37
- [9] Pavlovič A., Slovákova L., Pandolfi C., et al. (2011) J Exp Bot. 62, p. 1991
- [10] Ellison A. M. (2006).Plant Biol. 8, p. 740
- [11] Adamec L. (2008) Aq Bot. 89, p. 66
- [12] Adamec L. (2010) Cent Eur J Biol. 5, p. 121
- [13] Adamec L. (2002) New Phytol. 155, p. 92

Expresia Cx40 počas zápalu v aorte normotenzného potkana vo fáze subakútneho zápalu

Jakub Križák¹, Karel Frimmel², Ružena Sotníková³, Ľudmila Okruhlicová[~]

¹Univerzita Komenského, Prírodovedecká Fakulta, Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; jakubkrizak@gmail.com

²Slovenská akadémia vied, Ústav pre výskum srdca, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovenská republika.

³Slovenská akadémia vied, Ústav experimentálnej farmakológie a toxikológie, Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava, Slovenská republika

Abstrakt

Bacterial lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation is one of risk proatherogenic factor. To elucidate possible mechanisms involved in development of atherosclerosis, we focused on gap junction protein connexin 40 (Cx40). Its expression is disturbed during atherosclerosis, but little information is available on its expression during inflammation. Experiments were performed on adult normotensive Wistar rats. LPS was applied in a single dose (1 mg/kg, i.p.). Ten days later, Cx40 spatial distribution and expression were investigated in thoracic aorta. The results demonstrated heterogenous Cx40 localization in both endothelium and media of aorta of control and LPS rats with prominent Cx40 immunolabeling in endothelium. LPS resulted in spatial over-expression of Cx40 as well as CD68 as monocyte/macrophage marker when compared to controls. Abnormal expression of Cx40 was associated with impaired endothelium-dependent relaxation of aorta. Results indicate involvement of Cx40 in vascular wall disease development induced by LPS.

Kľúčové slová: konexín 40; lipopolysacharid; aorta; CD68.

Úvod a formulácia cieľa

Bakteriálny zápal je jedným z rizikových faktorov rozvoja aterosklerózy. Infiltrácia leukocytov z krvi do postihnutého tkaniva je dôležitý včasný krok zápalovej kaskády, spojený s narušenou integritou endotelu a následne aterosklerotickým procesom. Počas tohto procesu dochádza aj k zmenám v medzibunkovej komunikácii sprostredkovanvej komunikačnými spojeniami (KS).

KS zohrávajú dôležitú úlohu v modulácii bunkovej homeostázy a vasomotorického tonusu. KS umožňujú šírenie elektrických vzruchov a transport nízkomolekulových látok (napr. ATP, IP₃, cytokínov) do 1000 Da [1]. KS vzniká spojením hemikanálov dvoch susedných buniek. Každý hemikanál je zložený zo šiestich transmembránových konexínových (Cx) proteínov [2]. V cievach sa exprimujú štyri typy Cx izoforiem: Cx37, Cx40, Cx43 a Cx45, ale ich expresia nie je rovnaká pozdĺž celého vaskulárneho riečiska [3]. Cx40 izoforma je typická najmä pre endotel ciev. Abnormálna expresia Cx40 bola pozorovaná v bunkách endotelu a hladkého svalstva aterosklerotických ciev pacientov aj experimentálnych zvierat [4]. Okrem toho bola Cx40 expresia detekovaná aj v makrofágoch

a neutrofiloch ateriosklerotického plaku. Cieľom našej práce bolo sledovať expresiu Cx40 v aorte normotenzného potkana v subakútnej fáze zápalu vyvolaného LPS.

Materiály a metódy

V desať dňovom pokuse boli použité 3-mesačné potkany kmeňa Wistar, samce, rozdelené do dvoch skupín (n=6/skupinu): kontroly (W-K) a zápalová (W-LPS). Lipopolisacharid (LPS) z *E. coli* (Sigma Aldrich, USA) bol podaný jednorazovo v dávke 1 mg/kg, i.p.. Na konci pokusu bola z anestetizovaných zvierat odobratá hrudná aorta a krv na stanovenie C-reaktívneho proteínu (CRP). Po očistení tkaniva bola aorta narezaná na 3 mm dlhé prstence, ktoré sme použili na sledovanie distribúcie a expresie Cx40, CD68 a relaxácie aorty.

Stanovenie hs-CRP: CRP sme stanovovali v plazme použijúc komerčný Cholestech LDX System (California, USA).

Relaxácia aorty závislá od endotelu: Relaxáciu prstencov aorty sme študovali podľa Sotnikovej a kol. [5]. Očistené prstence aorty sa umiestnili do orgánovej nádobky obsahujúcej modifikovaný Krebsov roztok, uchytili sa na snímač tenzometrickej aparatúry a pasívne natiahli na optimálnu dĺžku. Po stabilizácii preparátov sa kontrakcia prstencov vyvolala fenylefrínom (FE) (1 µmol/l) a po jej ustálení sa vyvolala relaxácia acetylcholínom (Ac) (10 nmol/l – 100 µmol/l). Výsledky sú porovnávané ANOVA testom s následným Studentov Newman-Keuls testom.

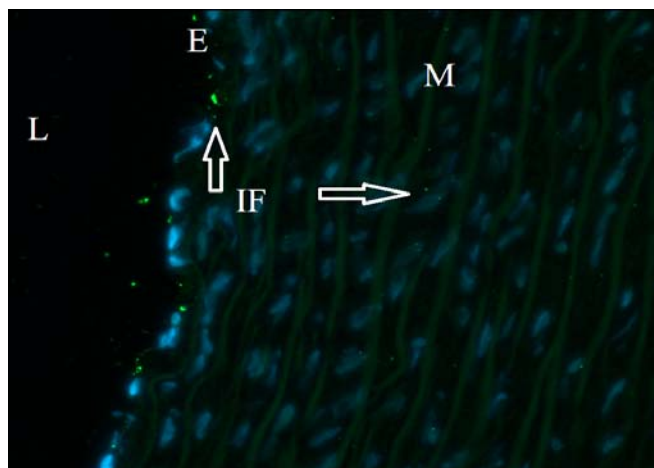
Imunoflorescencia Cx40: Zmrazené tkanivo aorty bolo rezané na 10 µm hrubé rezy v kryotome. Rezy sa premyli vo fosfátovom tlmivom roztoku (PBS), fixovali v 4% roztoku paraformaldehydu 15 min. a následne sa 10 min premývali v 12 % roztoku Tweenu. Nešpecifická väzba sa vysycovala 10% hovädzím sérom (BSA) 30 min. Cx40 sme detekovali primárnou králičou monoklonálnou protilátkou anti-Cx40 (1:500, Santa Cruz Biotechnology) s následnou inkubáciou rezov v sekundárnej anti-králičej IgG protilátke značenej fluoresceín izokyanátom (FITC) (1:500, Chemicon) 2 hod. Ako zalievacie médium sme použili Vectashield s DAPI H-1200. Imunofluorescenčný signál sme sledovali na mikroskope Zeiss Apotome 2. Imunofluorescenčný obraz sme analyzovali morfometrickou analýzou obrazu (BioCell, Olympus, Česká republika) a na štatistické vyhodnotenie sme použili Studentov T-test.

SDS-PAGE a Western blot analýza: Zmrazené tkanivo aorty bolo homogenizované pomocou sonifikátora (Dr. Hielscher, Nemecko) v 10-násobnom množstve homogenizačného

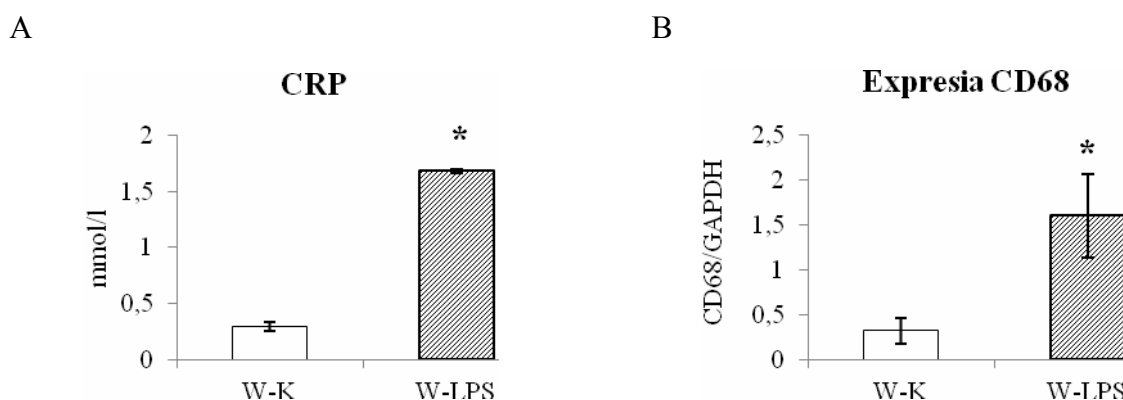
roztoku SB₂₀. Celkový obsah proteínov vo vzorke sa stanovil Bradfordovou metódou [6]. Proteíny sa separovali na 10% polyakrylamidovom géle [7]. Z gélu sa proteíny preniesli na nitrocelulóзовú membránu s veľkosťou pórov 0,2 μm (Advantec, Japonsko) pri konštantnom elektrickom prúde 200 mA počas 1,5 hod. Membrána s prenesenými proteínmi sa 2 hod. vysycovala v 5% roztoku hovädzieho sérového albumínu (Sigma Aldrich, USA) v Tris pufri (3,03g/l Tizabase – Sigma Aldrich, USA a 8,76g/l NaCl – Lachema, Česká Republika, pH=7,4-7,6). Na štúdium Cx40 expresie sme membránu inkubovali 1,5 hod. v myšej primárnej monoklonálnej protilátke anti-Cx40 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) riedenej v 1% roztoku hovädzieho sérového albumínu v TBS pufri s následnou inkubáciou 1,5 hod v kozej sekundárnej anti-myšej IgG protilátke (1:2000, GE Healthcare, Veľká Británia) s konjugovanou chrenovou peroxidázou. Na sledovanie expresie CD68 ako markera makrofágov a monocytov sme použili primárnu myšiu monoklonálnu protilátku (1:1000, Millipore, USA) a sekundárnu ovčiu anti-myšiu protilátku značenú chrenovou peroxidázou (1:2000, GE Healthcare, Veľká Británia). Detekcia prebehla chemiluminiscenčnou metódou (ECL). Svetelná reakcia bola snímaná prístrojom „Kodak In-vivo Fx“ a vyhodnocovala sa v programe „Carestream MI SE“. Na štatistické vyhodnotenie sme použili Studentov T-test.

Výsledky a diskusia

V aorte zdravých aj LPS potkanov sme fluorescenčnou metódou zistili heterogénnu distribúciu Cx40 izoformy v endoteli aj medii (Obr.1). Endotelová lokalizácia Cx40 koreluje s literárnymi údajmi a poukazuje na homocelulárne Cx40 KS. Detekcia Cx40 v medii aorty zdravého potkana môže naznačovať expresiu Cx40 bunkami hladkého svalu ako aj prítomnosť monocytov/makrofágov v súvislosti so zvyšujúcim sa vekom, pretože monocyty tiež exprimujú Cx40 [8]. Ich prítomnosť v aorte kontrolných Wistar potkanov dokazuje expresia CD68 ako markera receptorov monocytov/makrofágov (Obr.2). Predpokladáme, že rozdiely môžu závisieť od použitého kmeňa experimentálnych potkanov [9].



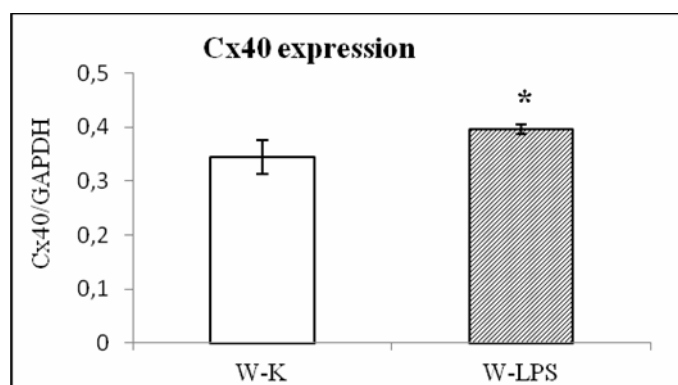
Obr. 1 Imunofluorescenčná detekcia Cx40 (zelená) a jadier (modrá). Originálne zväčšenie: 40x. E-Endotel, M-Média, L-Lumen aorty; IF- imunofluorescencia



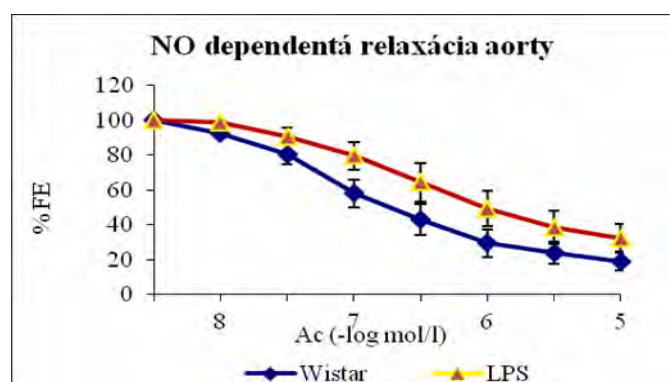
Obr. 2 Detekcia C- reaktívneho proteínu (CRP) v plazme (A) a proteínu CD68 v stene aorty (B). CRP - C-reaktívny proteín; CD68 - makrofágový receptor; GAPDH - Glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza; W-K - Wistar kontrola; W-LPS- Wistar s lipopolysacharidom; *- signifikancia voči W-K $P \leq 0,0001$; vyhodnotené Studentovým T-testom

Aplikácia LPS signifikantne zvyšovala expresiu Cx40 v tkanive aorty (Obr.3), čo bolo sprevádzané zvýšenou distribúciou izoformy v endoteli aj medii. Zvýšená distribúcia Cx40 v endoteli môže naznačovať kontakty endotelových buniek s cirkulujúcimi leukocytmi, v dôsledku čoho sa endotelové bunky môžu aktivovať, resp. môže dôjsť k ich dysfunkcii. Zvýšená lokalizácia Cx40 v medii môže súvisieť s nárastom monocytov/makrofágov v aorte LPS potkanov (Obr. 3), ktoré poukazujú na zvýšenú obrannú reakciu organizmu voči endotoxínu 10 dní po jeho aplikácii. Zvýšená hladina CRP v plazme (Obr.2) nameraná 10 dní po injekcii LPS charakterizuje subakútny zápalový proces a zvýšenú hladinu prozápalových mediátorov cytokínov a chemokínov [10], ktoré môžu modulovať expresiu Cx40 [11]. Zápalový proces sprevádza oxidačný stres a nárast tvorby kyslíkových radikálov [12]. Bolo pozorované, že tieto tiež prispievajú k zmenám expresie Cx40 [13].

KS endotelu modulujú jeho integritu a permeabilitu. Abnormality v expresii endotelovej Cx40 izoformy vyvolané LPS naznačujú zmeny v homeostáze buniek, ktoré môžu prispievať k poškodeniu mechanizmov modulovaných endotelom. K nim patrí aj relaxácia cievnej steny. Po aplikácii LPS sme zaznamenali zhoršenú relaxačnú odpoveď aorty závislej od endotelu (Obr. 4). Redukcia relaxačnej odpovede aorty pri zápalovom procese môže súvisieť aj so zvýšenou aktivitou syntázy oxidu dusnatého (NOS), predovšetkým inducibilnou (i) NOS a zvýšenou tvorbou NO (oxidu dusnatého), ktorý poškodzuje funkciu endotelu a môže modulovať aj expresiu Cx40 [14]. Navyše, iNOS produkujú aj makrofág, ktorých zvýšenú prítomnosť v aorte dokazuje upregulácia CD68.



Obr. 3 Celková expresia proteínu Cx40 aorty v pomere s GAPDH. Cx40- konexínový proteín 40; GAPDH- Glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza; W-K- Wistar kontrola; W-LPS- Wistar s lipopolysacharidom; *-signifikancia voči W-K $P \leq 0,05$; vyhodnotené Studentovým T-testom



Obr. 4 Relaxačná odpoveď aorty závislá od oxidu dusnatého. NO- oxid dusnatý; FE- fenylefrín; Ac- acetylcholín; Wistar- kontrola; LPS- Wistar s lipopolysacharidom; vyhodnotené ANOVA testom s následným Studentov Newman-Keuls testom

Záver

Zistili sme, že jednorázová aplikácia bakteriálneho lipopolysacharidu mala za následok zvýšenú expresiu Cx40 aorty normotenzného potkana, čo bolo sprevádzané

s poškodenou relaxačnou funkciou aorty. Výsledky naznačujú, že Cx40-komunikačné spojenia môžu prispievať k poškodeniu funkcie aorty pozorovanej počas subakútneho zápalu.

PodĎakovanie

Táto práca bola realizovaná s podporou grantu VEGA 2/0065/13.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Gros D. B., Jongsma H. J. (1996) *Bioessays* 18, p. 719
- [2] Unger V. M., Kumar N. M., Gilula N. B., Yeager M. (1999) *Science* 283, p. 1176
- [3] Gabriels J. E., Paul D. L. (1998) *Circ Res* 83, p. 636
- [4] Okruhlicová L., Frimmel K., Weismann P., Slezák J. (2012) The effect of hypertriglyceridemia on the integrity of endothelial monolayer structure of rat aorta: electron microscopic and immunofluorescent analysis. In: Méndez-Vilas A. (ed.) *Current microscopy contributions to advances in sciences and technology*. Formatex Research Center, Badajoz, Spain, p. 295
- [5] Sotníková R., Okruhlicová L., Navarová J., et al. (2000) *Biologia* 55(8), p. 107
- [6] Bradford M. M. (1976) *Anal Biochem* 72, p. 248
- [7] CSH Protocols; doi:10.1101/pdb.prot4540
- [8] Wong C. W., Christen T., Kwak B. R. (2004) *Cardiovasc Res* 62, p. 357
- [9] Klaunig J. E., Ruch R. J. (1987) *Cancer Lett* 36(2), p. 161
- [10] Yu Q., Li Y., Wang Y., Zhao S., et al. (2012) *Histol Histopathol* 27, p. 529
- [11] Véliz L. P., González F. G., Duling B. R., et al. (2008) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295(3), p. H1056
- [12] Ambrozova G., Pekarova M., Lojek A. (2011) *Toxicol in Vitro* 25, p. 145
- [13] Feine I., Pinkas I., Salomon Y., Scherz A. (2012) *PLoS One* 7(7), p. e41633
- [14] Looft-Wilson R. C., Billaud M., Johnstone S. R., et al. (2012) *Biochem Biophys Acta* 1818(8), p. 1895

Porovnanie antioxidačnej aktivity resveratrolu a jeho imínových analógov

Ivona Kubalová, Eliška Gálová

Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; ivona.kubalova@gmail.com

Abstrakt

Natural compounds have been used in traditional folk medicine for years. Recently, their renaissance takes place. Due to improvements in science, these compounds can be characterized in detail and their effect on different organisms can be observed, as well. Reactive oxygen species (ROS) are important source of DNA damage. Sources of ROS can be exogenous but at the same time they can rise from cell metabolism. The imbalance between the production of ROS and their elimination induces oxidative stress. It can leads to DNA damage coupled with DNA repair or it can also cause cell death. Polyphenols, including resveratrol being present in grapes, berries and peanuts, are well known for their antioxidant activity. In this study we examined antioxidation capacity of imine analogs of resveratrol. We used DPPH radical scavenging assay and reducing power assay. We used also comet assay for detection of potential genotoxic effect of resveratrol and its analogs on human lymphocytes.

Kľúčové slová: *resveratrol; imínové analógy resveratrolu; poškodenie DNA; antioxidačná kapacita*

Úvod a formulácia cieľa

Nadmerná expozícia reaktívnym zdrojom kyslíka (ROS) môže viesť k oxidácii rozličných bunkových komponentov [1]. Tento jav je často príčinou rozličných závažných ochorení ako rakovina [2], neurodegeneratívne choroby [3] a tiež kardiovaskulárne ochorenia [4]. Oxidácia DNA môže byť redukovaná látkami, ktoré sú schopné redukcie voľných radikálov. Jednou z biologických aktivít, ktorá sa pripisuje resveratrolu je antioxidačná schopnosť. Resveratrol patrí medzi vychytávače voľných radikálov a takisto je schopný antioxidant, pretože napomáha aktivácii mnohých antioxidačných enzýmov. Schopnosť polyfenolov správať sa ako antioxidanty, je založená na redoxných vlastnostiach ich fenolických hydroxy skupín a možnosti delokalizácie elektrónu cez chemickú štruktúru [5].

Za jednotlivé účinky resveratrolu je zodpovedná práve jeho štruktúra. OH skupina v pozícii 4' poskytuje antioxidačnú výhodu voči analógom, ktoré ju nemajú, no nie je rozhodujúca, pre zachovanie antioxidačných vlastností. Na druhej strane, práve 4' OH je kľúčová pre anti-proliferačný efekt resveratrolu [6]. Poznanie závislosti medzi štruktúrou a účinkami je dôležité pre syntézu nových analógov, ktoré sa budú vyznačovať zlepšenými vlastnosťami. Nahradenie atómu uhlíka z väzby C=C atómom dusíka (N) vytvorí analógy resveratrolu, ktoré sa označujú ako imínové analógy resveratrolu. Tieto analógy sa líšia v závislosti od rozdielnych (R skupín) na obidvoch aromatických kruhoch. Z antioxidačných testov sa zistilo, že OH skupina na B kruhu ovplyvňuje antioxidačné vlastnosti. Látky, ktoré

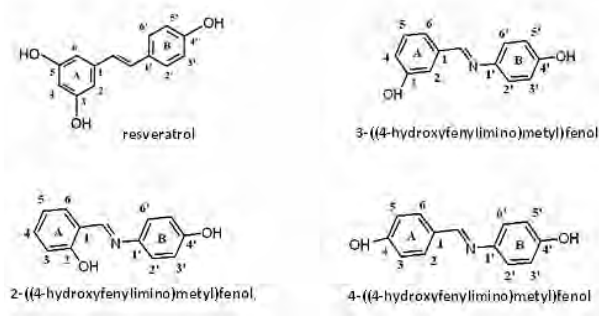
obsahovali OH v meta- a para- polohe neboli silné antioxidanty na rozdiel od látok s OH skupinou v orto- polohe. OH skupiny na A kruhu ovplyvňujú vychytávaciu schopnosť. Látky, ktoré mali OH v meta- a para- polohe boli aktívnejšie antioxidanty ako tie, ktoré niesli OH v orto- polohe [7].

Cieľom našej práce bolo pomocou rozličných antioxidačných testov preskúmať aktivitu imínových analógov resveratrolu, ktoré sa líšili polohou OH skupiny na A kruhu a porovnať ju so samotným resveratrolom. Ďalej sme sa zamerali na stanovenie koncentrácií analógov, ktoré nie sú potenciálne genotoxické pre ľudské lymfocyty. Zaujímalo nás, či inkubácia buniek s týmito koncentraciami dokáže ovplyvniť množstvo poškodenia DNA po vystavení účinku peroxidu vodíka.

Materiál a metódy

Testované látky

Resveratrol používaný pri experimentoch pochádzal z Cayman Chemical. Imínové analógy resveratrolu nám poskytol Dr. Šeršeň z Chemického ústavu UK. Pre zjednodušenie sme ich označili ako analóg A pre 2-((4-hydroxyfenylimino)metyl)fenol, B pre 3-((4-hydroxyfenylimino)metyl)fenol a C pre 4-((4-hydroxyfenylimino)metyl)fenol (obr. 1.).



Obr. 1 Vzorce resveratrolu a jeho imínových analógov

DPPH test

Test je založený na schopnosti bioaktívnych látok odovzdať protón vodíka (H^+) DPPH (1,1-difenyl-2-pikryl-hydrazyl) radikálu (DPPH \cdot), ktorý zmení svoje zafarbenie z fialovej na žltú. Atóm dusíka prijme H^+ , čím dôjde k zmene radikálu na DPPH-H (2,2-difenyl-1-pikryl-hydrazín). Farebná zmena sa prejaví zmenou absorbancie pri vlnovej dĺžke 517 nm. Vychádzali sme z protokolu Zhao et al. (2009) [8]. K 950 μ l 100 μ M DPPH radikálu sme pridali 50 μ l z nariadenej koncentrácie skúmanej látky, následne sme túto zmes inkubovali 30

minút v tme a odmerali absorbanciu. Ako blank sme použili rozpúšťadlo DPPH radikálu. Pri výpočte % vychytenia DPPH sme vychádzali zo vzťahu

$$[(A_B - A_A) / A_B] \times 100 \quad [I.]$$

kde A_B je absorbancia radikálu a A_A absorbancia radikálu s pridaním našej skúmanej látky.

Redukčná sila

Pomocou tejto metódy sme sledovali potenciálnu schopnosť sledovanej látky redukovať Fe^{3+} ferikyanidové komplexy na Fe^{2+} ferokyanidové komplexy. Pri redukcii dochádza k farebnej zmene našej vzorky zo žltej na modrozelenú (berlínska modrá), intenzita zafarbenia závisí od redukčnej schopnosti látky. Ako kontrolu sme použili kyselinu askorbovú. Vychádzali sme z protokolu podľa Zhao et al. (2009) [8]. Do tlmivého fosfátového roztoku sme si nariesili požadované koncentrácie sledovanej látky a kontrolnej látky, v našom prípade to bola kyselina galová. Z týchto riedení sme odobrali 200 μ l do mikroskúmaviek, v prípade blanku 200 μ l tlmivého roztoku a pridali sme 500 μ l tlmivého fosfátového roztoku a 500 μ l ferikyanidu draselného. Vzorky sme inkubovali 20 minút pri 50°C. Po skončení inkubácie sme pridali do každej skúmavky 500 μ l kyselinu trichlóroctovú a centrifugovali 10 minút pri 3000 rpm. Následne sme odobrali 500 μ l vrchnej vrstvy a pridali 500 μ l dH₂O a 100 μ l FeCl₃. V prípade redukcie sme pozorovali farebnú zmenu.

Comet assay na stanovenie genotoxického účinku

Po izolácii lymfocytov sme do každej skúmavky pridali 1 ml skúmanej koncentrácie testovanej látky a hodinu inkubovali pri 37°C. Potom sme postupovali podľa štandardného protokolu pre *comet assay* [9].

Comet assay na sledovanie vplyvu inkubácie testovaných látok na množstvo DNA poškodenia

Po izolovaní lymfocytov a ich inkubácii (1 hodina) s testovanou látkou, prípadne s 1 x PBS pri kontrole, sme bunky ukotvili na sklíčko a vystavili účinkom H₂O₂ po dobu piatich minút. Ďalej sme postupovali ako pri *comet assay* [9].

Výsledky a diskusia

Pomocou DPPH testu sme sledovali schopnosti resveratrolu a jeho analógov redukovať DPPH radikál. Na obr. 2 sú znázornené percentá redukcie radikálu jednotlivými látkami od koncentrácie 50 μ M až 2400 μ M. Ako kontrolu sme použili kyselinu askorbovú (KA), ktorá je známy antioxidant. So znižujúcimi sa koncentraciami klesala schopnosť

všetkých sledovaných látok redukovať DPPH. Resveratrol v porovnaní s analógmi bol lepší antioxidant. S klesajúcou koncentráciou sme zaznamenali menší rozdiel v redukcii medzi KA a Res. Z analógov sme len pri C a koncentrácii 2400 μM zaznamenali 50% redukciu radikálu. Analógy A a B vykazovali nízku schopnosť redukcie.

Testom na schopnosť redukcie Fe^{3+} ferikyanidových komplexov na Fe^{2+} ferokyanidové komplexy (obr. 3) sme zistili, že analógy A a B sa výrazne nelíšia v schopnosti redukovať Fe^{3+} na Fe^{2+} . Ich aktivita, v porovnaní s kyselinou galovou, ktorú sme použili ako kontrolu, klesala výrazne pri nižších koncentráciách. Nízku redukciu sme zaznamenali pri C analógu, na rozdiel od DPPH testu, kde bol tento analóg najaktívnejší. Z pomedzi všetkých použitých látok spôsoboval resveratrol najnižšiu redukciu, v porovnaní s kontrolou redukoval menej ako polovicu Fe^{3+} .

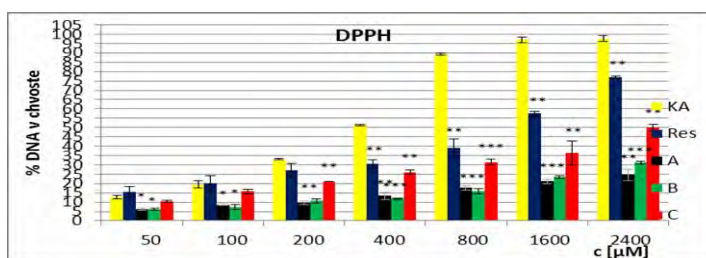
Metódou *comet assay* sme sa snažili nájsť koncentrácie analógov a dĺžku ovplyvňovania lymfocytov tak, aby ani jeden parameter nemal negatívny vplyv na mieru DNA poškodenia. Keďže sme v literatúre nenašli žiadne predchádzajúce experimenty s danými analógmi, vychádzali sme z koncentracii pre resveratrol používaných pri *comet assay* [10]. Ako pozitívnu kontrolu sme použili 100 μM peroxid vodíka. Pracovali sme s vysokými koncentraciami testovaných látok 200, 400 a 1000 μM a s nízkymi 50 a 100, μM (obr. 4). Keďže sme pracovali s čerstvo vyizolovanými lymfocytmi, ktoré môžu byť citlivé na podmienky pri experimente, opakovali sme každý test danej látky a koncentrácie minimálne trikrát. Extrémne hodnoty v oboch smeroch sme vylúčili zo spracovania. Krvné vzorky boli vždy od rovnakého darcu.

Pri vysokých dávkach látok sme v prípade resveratrolu zaznamenali pri všetkých koncentráciách zvýšené % zlomov DNA nad 10%, čo je bazálna hranica. Pri škále nižších dávok sme nezaznamenali genotoxický efekt. Na druhej strane, analógy B a C neboli genotoxické pri žiadnej použitej koncentrácii. Analóg A bol genotoxický len ako 1000 μM a 400 μM .

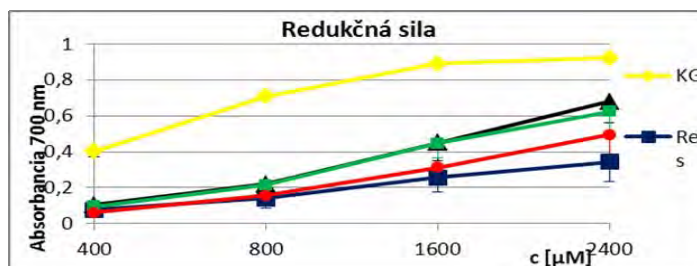
Na základe získaných údajov sme sa rozhodli pre ďalšie experimenty používať len koncentrácie, ktoré neboli genotoxické v prípade resveratrolu a ani analógov. Zvolili sme si preto 50 μM a 100 μM dávky.

Aby sme zistili, či majú testované látky nejaký vplyv na poškodenie DNA vyvolané peroxidom vodíka inkubovali sme vyizolované lymfocyty 60 minút pri 37°C s resveratrolom/analógmi (50 μM respektíve 100 μM). Po ukotvení na sklíčko sme vzorky vystavili na 5 minút účinkom H_2O_2 . V prípade resveratrolu sme zaznamenali mierne zvýšenie

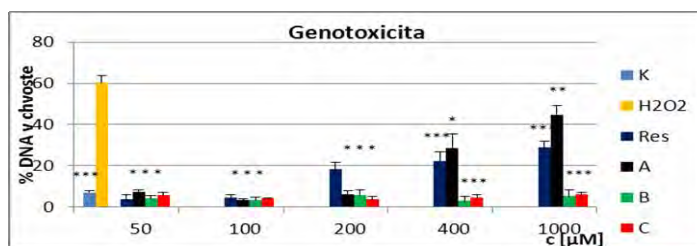
poškodenia (100 μM) alebo sme nepozorovali výraznú zmenu (50 μM) v porovnaní s pozitívnou kontrolou (bunky vystavené len účinkom H_2O_2). Na druhej strane, analógy v oboch použitých koncentráciách výrazne znížili poškodenie DNA. Pozorovali sme pokles blízko k bazálnej hladine poškodenia DNA (obr. 5). Štatisticky preukazné výsledky na hladine $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$; $+p < 0,05$ (zvýšenie DNA zlomov oproti kontrole) sa vzťahujú na rozdiely medzi pozitívnou kontrolou a sledovanými koncentraciami látok.



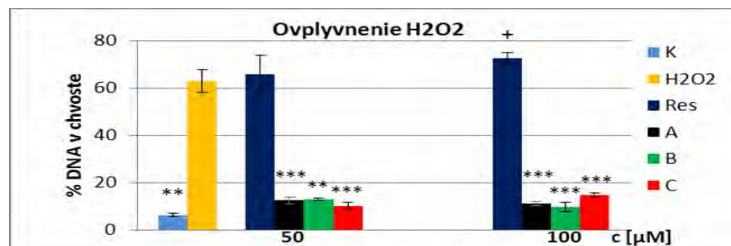
Obr. 2 DPPH test, KA – pozitívna kontrola kyselina askorbová; Res – resveratrol; A – analóg A; B – analóg B; C – analóg C



Obr. 3 Redukčná sila, ako pozitívna kontrola kyselina gálová KG, Res – resveratrol; A – analóg A; B – analóg B; C – analóg C. Štatistické vyhodnotenie pre nízku prehľadnosť nie je uvedené



Obr. 4 K-negatívna kontrola; H_2O_2 – 100 μM pozitívna kontrola, Res-resveratrol; A – analóg A; B – analóg B; C – analóg C



Obr. 5 Hodinová inkubácia s resveratrolom/analógmi a následné vystavenie buniek 100 µM H₂O₂ na 5 minút, K- negatívna kontrola; H₂O₂ –100 µM; Res – resveratrol; A – analóg A; B – analóg B; C – analóg C

Záver

Na základne antioxidantných testov sme zistili, že imínové analógy resveratrolu pri dostatočne vysokých koncentráciách sú schopné antioxidanty. V porovnaní s resveratrolom vykazujú pri koncentráciách 50 µM, 100 µM a 200 µM nižšiu genotoxicitu voči ľudským lymfocytom. Hodinová inkubácia s 50 µM a 100 µM analógmi výrazne znižuje genotoxický efekt peroxidu vodíka. Na druhej strane samotný resveratrol nedokázal bunky ochrániť pred poškodením, ale čiastočne zvýšil negatívny účinok peroxidu vodíka.

PodĎakovanie

Táto práca bola finančne podporená grantmi APVV-0040-10, VEGA 1/0025/11, SK-BG-0006-10, BK SK/206.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Valko M., Leibfritz D., Moncol J. (2007) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, p.44
- [2] Huang X. (2003) *Mutat. Res.* 533, p. 153
- [3] Mamelak M. (2007) *Neurobiol. Aging.* 28, p. 1340
- [4] Vokurkova M., Xu S., Touyz R. M. (2007) *Future Cardiol.* 3(1), p. 53
- [5] Lastra C. A., Villegas I. (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35, p. 1156
- [6] Stivala L.A., Savio M., Carafoli F., et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, p. 22586
- [7] Lu J., Li Ch., Chai, Y-F., et al. (2012) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, p. 5744
- [8] Zhao J., Liu T., Ma L., et al. (2009) *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2011, p. 1
- [9] Collins A. R., Dušinská M., Horváthová E., et al. (2001) *Mutagenesis.* 16(4), p. 297
- [10] Azmi A. S., Bhat S. H., Hanif S., et al. (2006) *FEBS Lett.* 580, p.533

Rozsivky jako indikátor kvality vody v řece Rokytné

Monika Kudrnová, Bohuslav Uher, Barbora Chattová

Masarykova univerzita, Ústav botaniky a zoologie, Terezy Novákové 62, 621 00, Brno-Řečkovice, Česká republika, monika.kudrn@gmail.com

Abstrakt

This article presents an experiment focused on diatoms as a dominant microorganisms in benthic habitats the running water. Presents the design and analyse of the experiment. This experiment is the basic part of my bachelor's thesis.

Klíčová slova: *Rozsivky, bioindikace, fyto bentos, tekoucí vody.*

Úvod a formulace cílů

Rozsivky jsou jednobuněčné řasy patřící do oddělení Heterokontophyta. Jejich buňky jsou kryty dvoudílnou schránkou z polymerizovaného oxidu křemičitého, nazývanou frustula, která díky své pevnosti udržuje jejich tvar a zajišťuje jim ochranu před nežádoucími vnějšími vlivy [1].

Rozsivky se vyskytují ve všech typech vodních biotopů a jako dominantní složka jsou zastoupeny především v bentických společenstvech. V souladu s Evropskou rámcovou směrnicí o vodách (2000/60/ES) jsou ve vodohospodářství využívány pro stanovování kvality vody a to především díky úzké ekologické valenci některých rozsivek pro určité faktory prostředí, krátkému životnímu cyklu v důsledku čehož jsou schopny rychle odrážet změny prostředí a také díky trvanlivosti frustul jakožto nositele určovacích znaků a tím možnosti časově neomezeného uchování pro pozdější determinaci [2, 5].

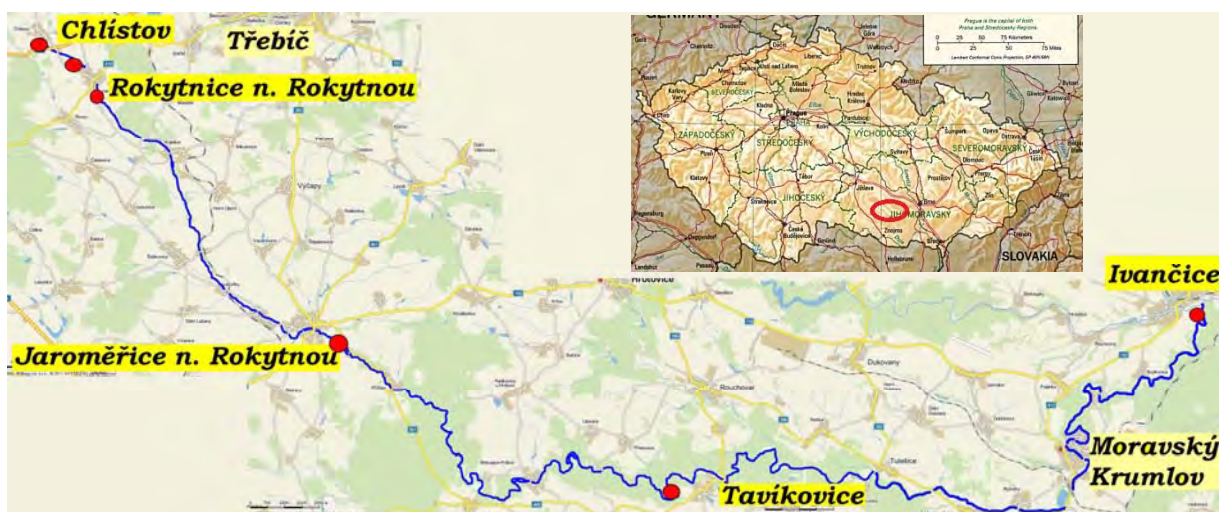
V rámci bakalářské práce byla nasbírána data pro výzkum, který si klade za cíl zjistit druhovou bohatost bentických rozsivek na jednotlivých lokalitách v rámci jednoho toku, změny v druhovém zastoupení v průběhu roku a využít bioindikačních vlastností rozsivek pro odhad kvality vody za pomoci rozsivkových indexů. Dále vyhodnotit vliv fyzikálních faktorů prostředí na druhové složení rozsivek. Tento článek má za cíl seznámit s výzkumem, s metodikou sběru a vyhodnocování dat.

Materiál a metody

Sběr dat probíhal na řece Rokytné. Rokytná je 88,2 km dlouhá řeka pramenící v nadmořské výšce 587 m n. m u obce Chlístlov v kraji Vysočina, dále protéká

Jihomoravským krajem, kde se v městě Ivančice vlévá do řeky Jihlavy jako její pravostranný přítok (201 m n. m.).

Pro postihnutí změn v rámci toku bylo vytipováno 6 lokalit (viz Obr. 1 a Tab. 1).



Obr. 1 Odběrová místa na řece Rokytné

Tab. 1 Popis lokalit na řece Rokytné

Lokalita	slovní popis lokality	nadmořská výška	N: E:	
			N:	E:
Lokalita 1	Pramen	578 m n. m.	49°11'52,2''	15°44'28,3''
Lokalita R	"referenční tok"	540 m n. m.	49°11'20.981"	15°46'4.000"
Lokalita 2	za první vesnicí (Rokytnice n. Rokytnou)	531 m n. m.	49°10'54,6''	15°46'30,3''
Lokalita 3	za prvním městem (Jaromeřice n. Rokytnou)	413 m n. m.	49°05'24,3''	15°54'11,9''
Lokalita 4	přírodní park Rokytná, Vilimův mlýn	318 m n. m.	49° 01' 52.3"	16° 05' 30.5"
Lokalita 5	před soutokem (Ivančice)	201 m n. m.	49° 05' 41"	16° 22' 56"

Odběry probíhaly každý měsíc od března do prosince v roce 2012 a to 22. března, 27. května, 21. června, 17. července, 20. srpna, 23. září, 24. října, 21 listopadu a 21. prosince.

Na lokalitě bylo vybráno dobře přístupné místo s kameny, byly vytaženy 3 zcela ponořené kameny o průměru větším nebo rovným 10 cm, z nichž byly skalpelem zcela oškrabány a vodou z řeky spláchnuty epilitické nárosty do fotografické misky, ze kterých se odebral do 50 ml vzorkovnic homogenizovaný vzorek. Kvůli nepřítomnosti kamenů na lokalitě 1 – pramen, byl odebrán vzorek z epipsamonu a na lokalitě 5 – před soutokem, vzorek z epipelonu. V obou případech opatrným ponořením 50 ml vzorkovnice, jemným zvířením a nabráním sedimentu. Tyto lokality nebudou zahrnuty do statistického vyhodnocování.

Zároveň byla konduktometrem měřena teplota, salinita, konduktivita a odpor vody.

Zpracování vzorků

Takto nasbírané vzorky byly v zchlazeném prostředí termonádooby do 48 hodin transportovány do laboratoře k nativnímu mikroskopování. Při nativním mikroskopování byly

pozorovány a foceny vyskytující se druhy řas a sinic a odhadnuty nejčastěji se vyskytující druhy rozsivek. Poté byl vzorek nafixován Lugolovým roztokem.

Rozsivky se určují především podle znaků na frustule. Některé však přes organický materiál přítomný v buňkách nelze rozlišit, proto je pro determinaci rozsivek potřeba vytvořit trvalý preparát. [3] Ty byly získány vařením 15 ml vzorku s 12 ml kyseliny dusičné, do té doby, než se odpařila nejméně polovina objemu. Poté se roztok po dobu 5 minut centrifugoval, odebral se supernatant, získaná suspenze se doplnila destilovanou vodou a znovu centrifugovala. Centrifugace se opakovala celkem 5 krát a po posledním odebrání supernatantu se kapka suspenze vyčištěných rozsivkových schránek rozprostřela na krycí sklíčko, nechala se vyschnout a nakonec se na plotýnce zatavila na podložní sklíčko do kapky Naphraxu.

Z trvalých preparátů se dále bude zjišťovat druhové zastoupení Rozsivek a jejich relativní početnosti. Z relativních početností se budou počítat hodnoty rozsivkových indexů, ze kterých se stanoví kvalita vody.

Výsledky a diskuze

Jedná se o předběžné výsledky ze sběru z 22.4.2012.

Na lokalitě 1 – pramen se nejčastěji vyskytovaly druhy *Meridion circulare* var. *constrictum* (obr. 2), *Achnantheidium minutissimum*, *Planothidium frequentissimum*, *Psammothidium helveticum* a také *Gomphonema angustatum* (obr. 2).

Lokalita R, nacházející se na řece v místě před vtokem do první vesnice, nebyla při prvním sběru 22. 4. ještě zavedena. Tato lokalita by měla reprezentovat referenční stav vody v řece Rokytné, to znamená stav, který ještě není primárně ovlivněn lidskou činností.

Dominantní druhy vyskytující se na lokalitě 2 – za první vesnicí byly: *Meridion circulare* var. *circulare*, *Fistulifera pelliculosa*, *Gomphonema parvulum*, *Navicula gregaria*, *Planothidium lanceolatum*. Pozorovaná byla také např. *Navicula rhynchocephala* (obr. 2) nebo *Craticulla accomoda*.

Lokalita 3 – za prvním městem, měla dominantní rozsivky nejvíce z rodu *Navicula*: *Navicula lanceolata*, *N. viriduacalcis*, *N. gregaria*, *N. tripunctata*. Nalezena byla také např. *Fallacia pygmaema* (obr. 3) nebo *Frustulia vulgaris*.

Na lokalitě 4 – v Přírodním parku Rokytná dominovaly tyto druhy rozsivek: *Navicula lanceolata*, *N. tripunctata*, *N. gregaria*, *Diatoma vulgaris*, ale také např. *Nitzschia dissipata* (obr. 4).

Poslední lokalita 5 – před soutokem, se vyznačovala nejčastějším výskytem rozsivek rodu *Nitzschia*, např. *Nitzschia sigmoidea*, *N. sigma*, *N. acicularis* nebo *N. tennis*, ale také byl nalezen druh *Amfora ovalis* (obr. 5).

Na základě předběžných výsledků je zřetelný výskyt taxonů rozsivek, které indikují mesosabrobní vody a které jsou tolerantí ke střední až zvýšené trofii vody, především rozsivky jako: *Navicula lanceolata*, *Navicula tripunctata*, *Diatoma vulgare*, *Nitzschia sigmoidea*, *Nitzschia acicularis* [4].



Obr. 2 *Navicula rhynchocephala* (50,5 x 12 μm)



Obr. 3 *Fallcia pygmaea* (23 x 9 μm)



Obr. 4 *Nitzschia dissipata* (17 x 3,5 μm)



Obr. 5 *Amphora ovalis* (44 x 12 μm , jedna buňka)

Závěr

Od dubna do prosince roku 2012 bylo na šesti lokalitách nasbíráno téměř 50 vzorků (ne vždy bylo možné provést odběr, z důvodu buď vyschnutí, nebo zamrznutí vody), které se nyní vyhodnocují.

Výše uvedené předběžné výsledky studie potvrdili význam výzkumu rozsivek jako citlivých bioindikátorů na změny v prostředí, kde už při monitoringu a mikroskopickém vyhodnocení rozsivkových preparátů se jednotlivé lokality v rámci jedné řeky liší kvalitativně i kvantitativně. Zjištění zástupci patří mezi běžně se vyskytující v tekoucích vodách střední Evropy [1, 3].

Použitá literatura

- [1] Kalina T., Váňa J. (2005) Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum Praha, p.199
- [2] Hlúbiková D., (2000) Výber vhodných hodnotiacich metrick ekologickeho stavu toku Slovenska založených na bentických rozsievkach (Bacillariophyceae). (Dizertačná práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p. 12
- [3] Hindák, F. (ed.) (1978) Sladkovodné riasy. SPN Bratislava, p.180
- [4] Hofmann G., Werum M., Lange-Bertalot H. (2011) Diatomeen im Süßwasser-Benthos von Mitteleuropa. A. R. G. Gantner Verlag K.G., Rugell, p. 15
- [5] Stevenson Jan R., Bothwell Max L., Lowe Rex L. (1996) Algal Ecology Freshwater Benthic Ecosystems. Academic Press, p. 31

Heterologická expresia génu *CgPDR16* v nepatogénnych kvasinkách

Eva Kurilová, Jana Perželová, Vladimíra Džugasová

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky,
Mlynská dolina B1, 842 15 Bratislava, Slovensko; kurilova.evka@gmail.com*

Abstrakt

Constantly increasing incidence of fungal infections leads to increased use of antifungal drugs. As a result of intensive therapy, there is the natural selection of strains resistant to these drugs. For this reason, scientists are now focusing on the molecular mechanisms of multidrug resistance in yeasts. This phenomenon is in uncertain relation with *PDR16* gene identified in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, where its deletion led to increased susceptibility to azole antifungals and change the lipid composition of cell membranes. Orthologous gene was identified in the pathogenic yeast *Candida glabrata*. This work is focused on heterologous expression of *CgPDR16* gene in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which would reveal interspecies conservation of this gene. As *PDR16* gene makes yeasts resistant to antifungal agents, it may represent a potential target for new drugs increasing the susceptibility of resistant pathogenic yeasts.

Kľúčové slová: *CgPDR16*; heterologická expresia; mnohonásobná rezistencia; kvasinky

Úvod a formulácia cieľa

Fenomén mnohonásobnej rezistencie proti cytotoxickým látkam je úzko spätý so sieťou PDR proteínov, ktorej súčasťou sú aj transkripčné regulátory Pdr1p a Pdr3p [1]. Do regulónu Pdr1p/Pdr3p kvasinky *S. cerevisiae* patria mnohé gény, vrátane tých, ktoré sa zúčastňujú metabolizmu lipidov a ovplyvňujú lipidové zloženie cytoplazmatickej membrány buniek [2]. Jedným z takýchto génov je gén *PDR16*, ktorého úloha v tejto súvislosti zatiaľ nie je objasnená. Delécia génu *PDR16* spôsobuje v kvasinkách *S. cerevisiae* zmenu v biosyntéze a distribúcii sterolov a zvyšuje citlivosť buniek na azolové antimykotiká [3].

Transpozónovou mutagénzou boli v kvasinkách *C. glabrata* identifikované gény, u ktorých mala inzercia transpozónu za následok zvýšenie citlivosti buniek na antimykotikum flukonazol. Medzi tieto gény patril aj gén *CgPDR16*, ortológ génu *PDR16* [4]. Transformáciou mutantov *Cgpd16* plazmidom nesúcim štandardnú alelu génu *CgPDR16* došlo v týchto bunkách k homologickej komplementácii mutácie $\Delta Cgpd16$ a získané transformanty vykazovali fenotyp štandardného kmeňa [5]. Preto nás zaujímalo, či dôjde aj k heterologickej expresii génu *CgPDR16* v bunkách *S. cerevisiae*, a či štruktúra a funkcia génu *PDR16* je konzervovaná u týchto evolučne príbuzných druhov. Z tohto dôvodu sme sledovali komplementáciu mutácie $\Delta pd16$ kvasinky *S. cerevisiae* štandardnou alelou *CgPDR16*.

Materiál a metódy

Mikroorganizmy: Štandardný kmeň *S. cerevisiae* FY1679-28C (*MATa*; *ura3-52*; *leu2Δ1*; *his3Δ200*; *trpΔ63*; *GAL2⁺*) a jeho izogénny derivát FY1679-28C *Δpdr16* (*MAT a*; *ura3-52*; *leu2Δ1*; *his3Δ200*; *trpΔ63*; *GAL2⁺*; *Δpdr16*) (zbierka EUROSCARF, Frankfurt, Nemecko); štandardný kmeň *C. glabrata* BG2 [6]. Kmeň baktérií *Escherichia coli* DH5α (*F*, Φ 80*dlacZΔM15*, Δ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(r_k^- , m_k^+), *phoA*, *supE44*, λ^- , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*) (Takara Bio INC., Japonsko).

Kultivačné médiá: Pre bežnú kultiváciu kvasinkových kmeňov a pre testy citlivosti kvasiniek na antifungálne látky bolo použité komplexné glukózové YPD médium (2% glukóza, 2% peptón, 1% kvasničný autolyzát). Pre selekciu kvasinkových transformantov bolo použité minimálne glukózové YNB médium (0,67 % yeast nitrogen base without amino acids (Sigma, USA), 2% glukóza). Na kultiváciu baktérií *E. coli* bolo použité LB médium a pri selekcii transformantov baktérií LB médium s ampicílinom (100 μ g/ml). Pre stužené médiá bol použitý 2% bakteriologický agar.

Plazmidy: pCR[®]2.1-TOPO[®] (pUC *ori*, *lacZα*, *f1 ori*, Kan^R, Amp^R) (Invitrogen, USA); pRS306K-KIPDR16 (2 μ m, *URA3*, *ARS1*, *KARS2*, *lacZα*, *f1⁽⁺⁾*, *ori*, Amp^R) [7]; YCp-*lac111-ScPDR16* (*LEU2*, Amp^R, centroméry) a YE

-*lac195-ScPDR16* (*URA3*, Amp^R, multikópiový) (dr. P. Griač, ÚBGŽ SAV).

Primery: Pre amplifikáciu génu *CgPDR16* metódou PCR boli použité špecifické primery: *CgPDR16_F* (forward) 5' TCGTTATCAGTATCGAACACCT 3' a *CgPDR16_R* (reverse) 5' TTCCCAGATAAACTAGAGGGAC 3'.

Príprava hybridného plazmidu: Gén *CgPDR16*, amplifikovaný z genomickej DNA kmeňa *C. glabrata* BG2 metódou PCR, bol klonovaný do komerčného vektora pCR[®]2.1-TOPO[®] podľa protokolu výrobcu. Následne bol gén *CgPDR16* z tohto plazmidu vyštiepený prostredníctvom restričných endonukleáz *SpeI* a *NotI* a klonovaný do plazmidu pRS306K-KIPDR16 štiepeného rovnakou kombináciou enzýmov. Vzniknutým plazmidom pRS306K-*CgPDR16* bol transformovaný štandardný aj mutantný kmeň kvasiniek *S. cerevisiae*.

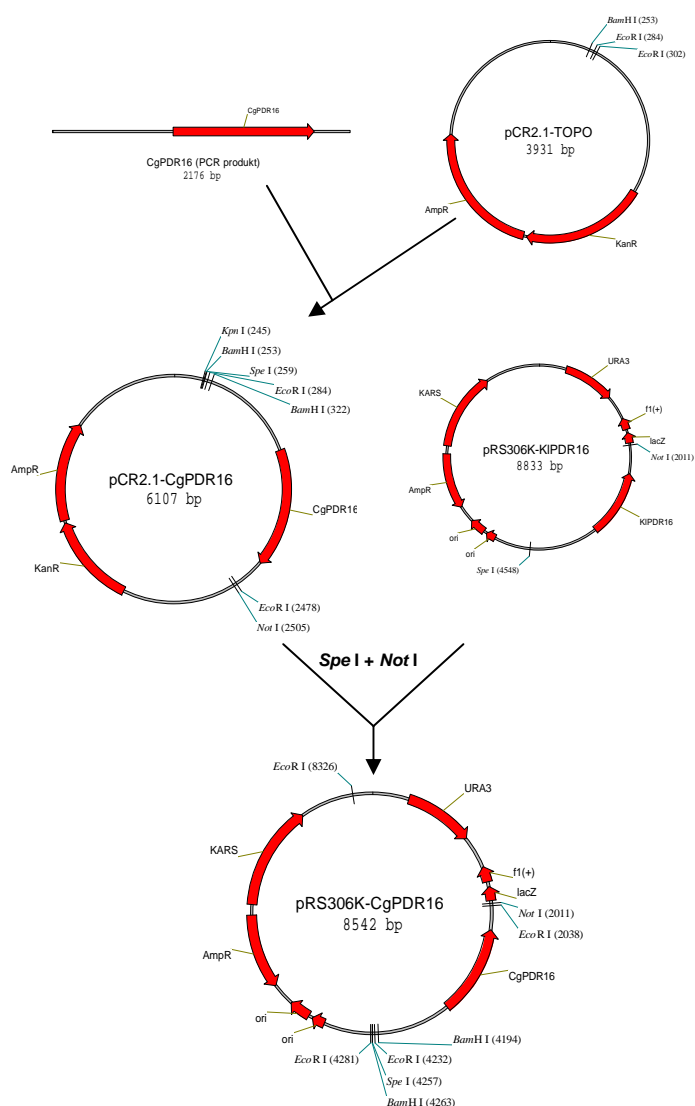
Transformácia kvasiniek: Bunky kvasiniek opracované octanom lítym boli transformované elektroporáciou. Transformanty boli selektované na minimálnom YNB médiu bez uracilu [8].

Stanovenie citlivosti kvasiniek k antifungálnym látkam: bolo vykonané kvapkovým testom na pevnom YPD médiu s obsahom rôznych koncentrácií antifungálnej látky. Testovanými látkami boli flukonazol, itrakonazol, ketokonazol a mikonazol. Minimálna

inhibičná koncentrácia (MIC) použitých inhibítorov bola stanovená po 72 hod. kultivácie pri teplote 28 °C [4].

Výsledky a diskusia

S cieľom študovať gén *CgPDR16* a analyzovať jeho schopnosť expresie v heterologickom systéme kvasiniek, bolo v prvej fáze práce potrebné klonovať gén *CgPDR16* vo vektore pRS306K vhodnom na transformáciu kvasiniek *S. cerevisiae*. Stratégia prípravy konštruktu pRS306K-*CgPDR16* je uvedená na Obr. 1.



Obr. 1 Schéma prípravy konštruktu pRS306K-*CgPDR16* vhodného pre transformáciu kvasiniek *S. cerevisiae*

Za účelom sledovania expresie génu *CgPDR16* v heterologickom systéme kvasiniek *S. cerevisiae* a konzervovanosti jeho štruktúry a funkcie u tohto evolučne príbuzného druhu bola sledovaná komplementácia mutácie $\Delta pdr16$ kvasinky *S. cerevisiae* štandardnou alelou génu *CgPDR16*.

Do experimentov boli zvolené nasledovné kmene a transformanty *S. cerevisiae* (Tab. 1; Obr. 2):

1. FY 1679-28C (wt; štandardný kmeň)
2. FY 1679-28C $\Delta pdr16$
3. FY 1679-28C $\Delta pdr16$ nesúci plazmid pRS306K-CgPDR16 ($\Delta pdr16$ + pRS306K-CgPDR16)
4. FY 1679-28C $\Delta pdr16$ nesúci plazmid YCp-ScPDR16 ($\Delta pdr16$ + YCp-ScPDR16)
5. FY 1679-28C $\Delta pdr16$ nesúci plazmid YEp-ScPDR16 ($\Delta pdr16$ + YEp-ScPDR16)
6. FY 1679-28C $\Delta pdr16$ nesúci plazmid pRS306K-KIPDR16 ($\Delta pdr16$ + pRS306K-KIPDR16)

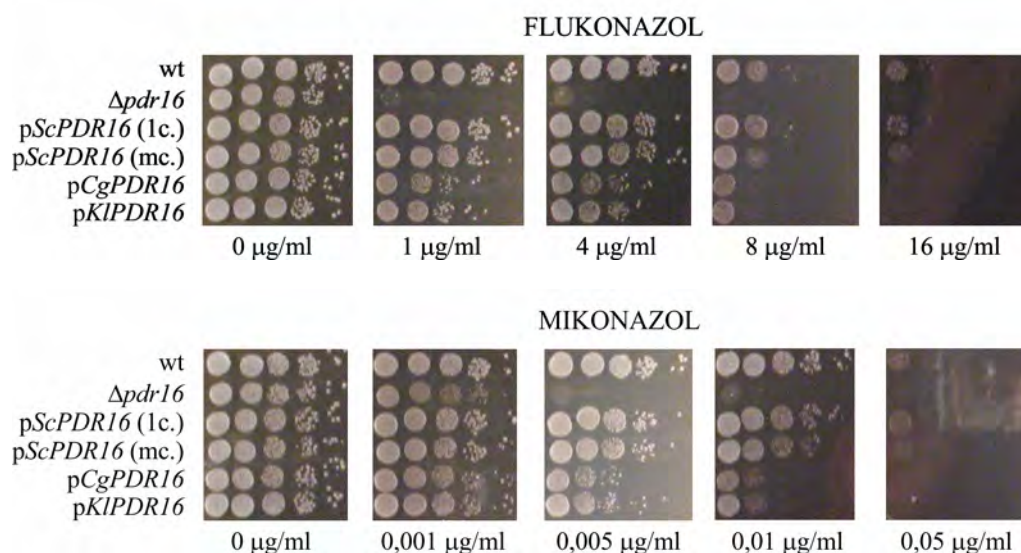
Stanovenie citlivosti testovaných kmeňov na azolové antimykotiká bolo uskutočnené kvapkovým testom na komplexnom YPD médiu. Sledovaná bola citlivosť kvasinkových buniek na azolové preparáty mikonazol, ketokonazol, itrakonazol a flukonazol, na ktoré v porovnaní so štandardným kmeňom vykazoval mutant $\Delta pdr16$ zvýšenú citlivosť [3]. Ako vyplýva z našich výsledkov (Tab. 1, Obr. 2), potvrdili sme, že zavedenie mutácie $\Delta pdr16$ do buniek kvasiniek *S. cerevisiae* FY1679-28C zvyšuje ich citlivosť k testovaným azolom v porovnaní s citlivosťou buniek štandardného kmeňa.

Tab. 1 Minimálne inhibičné koncentrácie (MIC) azolov stanovené kvapkovým testom u štandardného kmeňa (wt), mutanta $\Delta pdr16$ a jeho transformantov kvasiniek *S. cerevisiae* FY 1679-28C. Bunky boli kultivované na komplexnom glukózovom YPD médiu. MIC boli stanovené po 72 hod. kultivácie pri 28°C

Kmeň / transformant	Minimálna inhibičná koncentrácia (µg/ml)			
	FLU	MIK	KET	ITR
wt	16	0,05	2	25
$\Delta pdr16$	1	0,005	< 0,1	< 0,5
$\Delta pdr16$ + YCp-ScPDR16 (1c.)	16	0,05	NT	NT
$\Delta pdr16$ + YEp-ScPDR16 (mc.)	16	0,05	NT	NT
$\Delta pdr16$ + pRS306K-CgPDR16	8	0,01	0,1	0,5
$\Delta pdr16$ + pRS306K-KIPDR16	8	0,01	NT	NT

FLU – flukonazol, MIK – mikonazol, KET – ketokonazol, ITR – itrakonazol; NT – netestované

V prípade, že sme do buniek mutanta *Δpdr16* vniesli na plazmide štandardnú alelu *CgPDR16*, dokázala táto len parciálne komplementovať jeho citlivý fenotyp. Takúto čiastočnú komplementáciu sme pozorovali u všetkých azolových derivátov. Podobnú, čiastočnú komplementáciu mutácie *Δpdr16* vykazovala aj štandardná alela *KIPDR16*, ktorú sme použili pre porovnanie, nakoľko aj kvasinka *K. lactis* je evolučne príbuzným druhom kvasiniek *C. glabrata* a *S. cerevisiae*. Ako pozitívne kontroly sme použili transformanty buniek *Δpdr16*, ktoré niesli štandardnú alelu *ScPDR16* kvasinky *S. cerevisiae*, a to buď na centromérom (YCp-*ScPDR16*; 1c.) alebo na multikópiovom (YEpl-*ScPDR16*; mc.) plazmide. Transformanty so štandardnou alelou *PDR16* úplne komplementovali fenotyp mutácie *Δpdr16* v porovnaní s fenotypom buniek štandardného kmeňa FY1679-28C (Tab. 1, Obr. 2).



Obr. 2 Profil susceptibility testovaných kmeňov a transformantov kvasiniek *S. cerevisiae*. Bunky štandardného kmeňa (wt), mutantného kmeňa *Δpdr16* a mutanta *Δpdr16* transformovaného štandardnou alelou *ScPDR16* na jednokópiovom (1c.) a multikópiovom (mc.) plazmide, a heterologickými alelami *CgPDR16* a *KIPDR16* boli predrastené v YPD médiu a nariedené do série riedení ($2 \cdot 10^7$, $2 \cdot 10^6$, $2 \cdot 10^5$, $2 \cdot 10^4$ a $2 \cdot 10^3$ buniek/ml). Po 5 μ l každého riedenia bolo vykvapkaných na YPD médiu s rôznou koncentráciou testovaných azolov (ako príklad je uvedený flukonazol a mikonazol). Minimálne inhibičné koncentrácie (MIC) azolových antimykotík boli zaznamenané po 48 hod. kultivácie pri teplote 28 °C.

Záver

Naša práca spadá do štúdia génu *PDR16* v patogénnych a nepatogénnych kvasinkách. Experimentálne sme sa zamerali na gén *CgPDR16* patogéna *C. glabrata*, a sledovali jeho expresiu v heterologickom systéme mutanta *pdr16* kvasinky *S. cerevisiae*, ktorá potvrdila jeho evolučnú konzervovanosť u týchto príbuzných druhov kvasiniek.

Pod'akovanie

Za poskytnutie plazmidov ďakujeme dr. Petrovi Griačovi z Ústavu biochémie a genetiky živočíchov SAV. Prof. RNDr. Júliusovi Šubíkovi, DrSc. a prof. RNDr. Yvette Gbelskej, CSc. ďakujeme za ich cenné rady a pripomienky pri realizácii práce. Práca vznikla s finančnou podporou grantových projektov APVV-0282-10 a VEGA 1/0867/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Gulshan K., Moye-Rowley W. S. (2007) Eukaryot. Cell 6(11), p. 1933
- [2] Schüller C., Mamnun Y. M., Wolfger H., et al. (2007) Mol. Biol. Cell 18(12), p. 4932
- [3] van den Hazel H. B., Pichler H., do Valle Matta M. A., et al. (1999) J. Biol. Chem. 274(4), p. 1934
- [4] Kaur R., Castaño I., Cormack B. P. (2004) Antimicrob. Agents Chemother. 48(5), p. 1600
- [5] Perželová J. (2012) Vplyv mutácie *Cgpd16* na susceptibilitu a virulenciu kvasiniek *Candida glabrata*. (Diplomová práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava
- [6] Fidel P. L., Cutright J. L., Tail L., et al. (1996) J. Infect. Dis. 173(2), p. 425
- [7] Goffa E., Hušeková B., Perželová J. (2011) Študentská vedecká konferencia, Zborník recenzovaných príspevkov, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p. 226
- [8] Thompson J. R., Register E., Curotto J., et al. (1998) Yeast 14(6), p. 565

Sledovanie vplyvu potencionálnych rastových faktorov asociovaných s MHV na replikáciu vírusu chrípky typu A

Veronika Lachová¹, Darina Svetlíková², Petra Švančarová², Lucia Škorvanová², František Golais¹, Tatiana Betáková²

¹*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie, Mlynská dolina 842 15 Bratislava, Slovenská republika; veronyxlach@gmail.com*

²*Slovenská akadémia vied, Virologický ústav, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava Slovenská republika*

Abstrakt

Influenza virus causes yearly about 3 to 5 million illnesses worldwide and about 250 000 to 500 000 of them end with death. The use of antiviral drugs available for treatment of influenza is limited by development of resistance among virus strains. There is therefore a constant need to find or develop new antiviral agents for treatment of influenza. In this work we tested the influence of compounds resembling growth factors, produced by herpes virus on the replication of influenza virus. All compounds inhibited IAV replication and inhibition was observed in a dose-dependent manner. 3M compound was more potent than 1M and 2M. Our results suggest that there is no specific interaction between these compounds and virus, but they have effect on the cells. We observed positive effect of compounds 1M and 2M on growth of MDCK cells, compound 3M decreased the growth. The cells were also morphologically changed.

KLúčové slová: *vírus chrípky typu A; antivirotiká; rastové faktory*

Úvod a formulácia cieľa

Vírusy chrípky typu A spôsobujú infekcie respiračného traktu, ktoré väčšinou prebiehajú s miernymi symptómami (kašeľ, zvýšená telesná teplota, bolesť hrdla, atď). Vážne komplikácie, končiace smrťou môžu nastať ak je infekciou zasiahnutý nervový, svalový alebo kardiovaskulárny systém[1]. Vírus chrípky ročne spôsobí 3 až 5 miliónov vážnych ochorení, ktoré končia v 250 000 až 500 000 prípadoch smrťou[2]. Na liečbu ochorení zapríčinených vírusom chrípky typu A sa v súčasnosti používajú dve skupiny liečiv s antivírusovým účinkom, inhibítory neuraminidázy (napr. oseltamivir, zanamivir) a inhibítory M2 iónového kanála (amantadín a rimantadín). Ich použitie je obmedzené rezistenciou, ktorá vzniká mutovaním cieľových vírusových proteínov[3]. Frekvencia výskytu rezistencie voči inhibítorom M2 iónového kanála je u sezónnych vírusov až 99% [4]. Pre profylaxiu sa dnes využívajú dva typy vakcín: inaktivovaná a živá atenuovaná, ich nevýhodou je potreba každoročnej aktualizácie[1].

V bunkách infikovaných herpetickými vírusmi bola opísaná tvorba nízkomolekulových látok vírusového pôvodu s funkciou rastových faktorov. Medzi ich účinky patrí schopnosť transformovať bunky *in vitro* alebo naopak potláčať transformovaný fenotyp rakovinových buniek [5, 6, 7]. Naším cieľom bolo otestovať či tieto látky nejako ovplyvňujú replikáciu vírusu chrípky v bunkách MDCK.

Materiál a metódy

Bunková línia a vírusy:

- MDCK (Madin Darby canine kidney) - stabilizovaná bunková línia pochádzajúca z obličiek psa. Na kultiváciu buniek bolo použité médium DMEM (Dulbeccom modifikované Eaglovo médium) s 10% FCS (Foetal Calf Serum), $40 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ penicilínu/streptomycínu a $2 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ L-glutamínu.
- A/PR/8/34 (H1N1) - kmeň vírusu chrípky typu A, izolovaný v roku 1934 v Puerto Rico.

Testovanie vplyvu látok 1M, 2M a 3M na replikáciu vírusu chrípky typu A

MDCK bunky sme spasázovali na 24 jamkové titračné platničky. K jednej sme pridali látky 1M, 2M a 3M v koncentráciách 0 , 10^{-3} , 10^{-4} a 10^{-5} . Bunky sme kultivovali 24 hodín v termostate pri 37°C a 5% CO_2 . Následne sme ich infikovali vírusom A/PR/8/34 v koncentrácii 1:3000. Po hodinovej inkubácii v termostate pri 37°C , sme bunky premyli fyziologickým roztokom s pH 7,2 a pridali bezsérové médium DMEM. K bunkám, ktoré neboli kultivované v prítomnosti skúmaných látok sme pridali látky 1M, 2M a 3M v koncentráciách 0 , 10^{-3} , 10^{-4} a 10^{-5} . Bunky sme po 24 hodinovej kultivácii zoškrabali. Titer vírusu chrípky sme stanovili na MDCK bunkách založených na 96 jamkovej mikrotitračnej platničke pričom sme použili 5-kové riedenie. Po 24 hodinovej inkubácii sme vírus vo vzorkách detegovali ELISA testom.

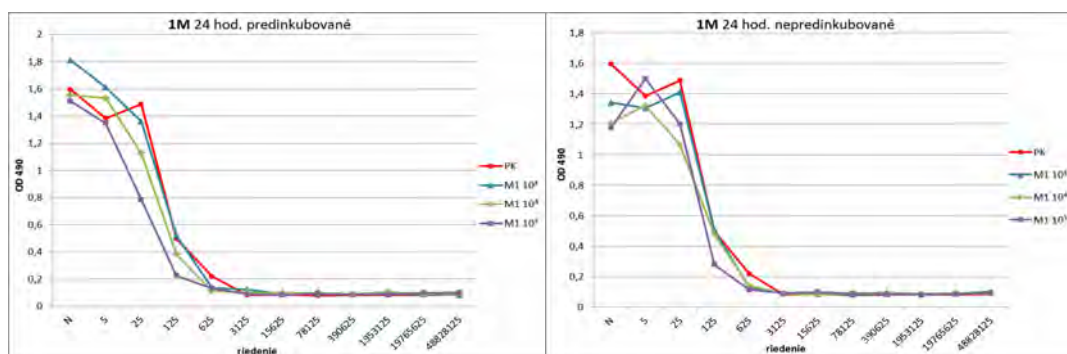
Testovanie vplyvu látok 1M, 2M a 3M na rast MDCK buniek

Bunky sme spasázovali na 24 jamkové titračné platničky v hustote 80 000 buniek na jamku. Pridali sme látky 1M, 2M a 3M v koncentráciách 0 , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} a 10^{-8} kultivovali-v médiu DMEM s 5% FCS pri teplote 37°C a 5% CO_2 . Množstvo buniek sme počítali v Bürkerovej komôrke po 24, 48, 72 a 96 hodinách a z výsledkov zostavili rastové krivky.

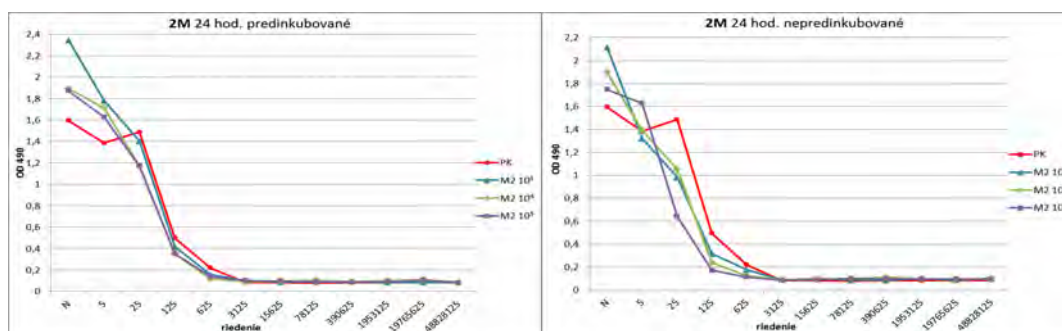
K 24 hodinovej kultúre MDCK buniek vyrastenej na 96 jamkovej mikrotitračnej platničke sme pridali látky 1M, 2M a 3M v koncentráciách 0, 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . Po 24 hodinovej kultivácii v bezsérovom médiu DMEM pri 37°C a 5% CO₂ sme pozorovali morfológické zmeny buniek.

Výsledky a diskusia

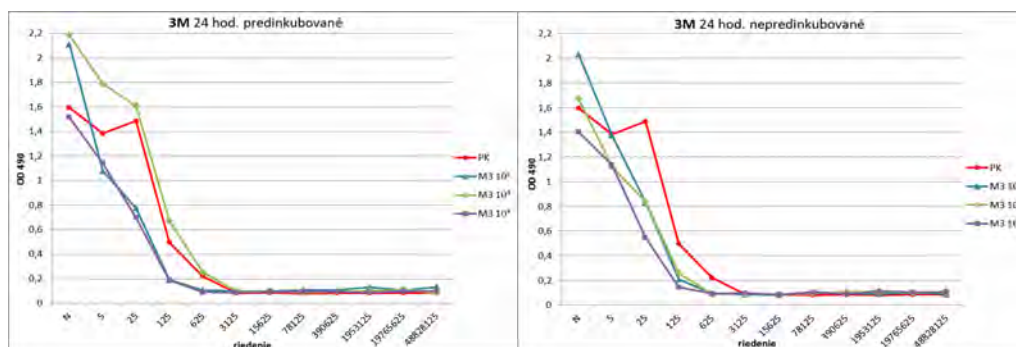
Vplyv látok 1M, 2M a 3M na replikáciu vírusu chrípky typu A sme testovali na MDCK bunkách dvomi spôsobmi. MDCK bunky sme predinkubovali s týmito látkami a po 24 hodinách sme tieto bunky nainfikovali vírusom chrípky. V druhom experimente sme bunky najskôr nainfikovali vírusom chrípky a až po adsorpcii vírusu sme pridali testované látky v rôznych koncentráciách. Po 24 hodinovej inkubácii sme bunky zoškrabali a titer vírusu vo vzorkách určili ELISA testom. Vplyv testovaných látok na replikáciu vírusu A/PR/8/34 je zobrazený na Obr. 1-3.



Obr. 1 Účinok látky 1M na replikáciu vírusu A/PR/8/34 v bunkách MDCK, ktoré boli predinkubované s látkou a ku ktorým bola látka pridaná až po infekcii. PK – pozitívna kontrola vírusu bez pridaní 1M.

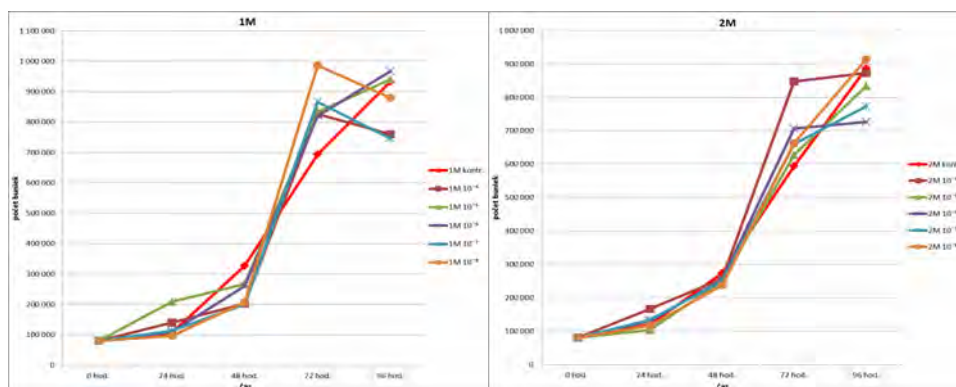


Obr. 2 Účinok látky 2M na replikáciu vírusu A/PR/8/34 v bunkách MDCK, ktoré boli predinkubované s látkou a ku ktorým bola látka pridaná až po infekcii. PK – pozitívna kontrola vírusu bez pridaní 2M.

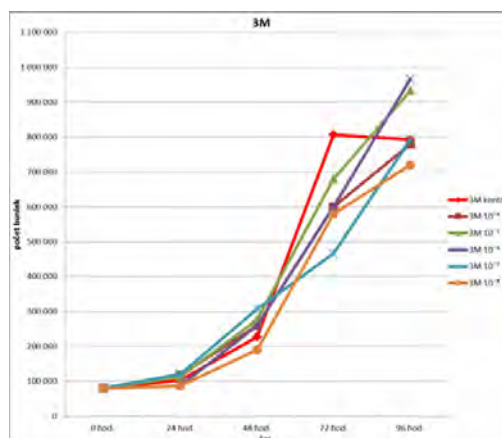


Obr. 3 Účinok látky 3M na replikáciu vírusu A/PR/8/34 v bunkách MDCK, ktoré boli predinkubované s látkou a ku ktorým bola látka pridaná až po infekcii. PK – pozitívna kontrola vírusu bez pridania 3M.

Na replikáciu vírusu mala najvýraznejší inhibičný účinok látka 3M (Obr.3), pričom titer vírusu klesol z 1:3125 na 1:625. Najvyšší účinok dosiahla táto látka pri koncentrácii 10⁻⁵. Prejavil sa rovnako u buniek ktoré boli s látkou predinkubované ako aj u buniek, ku ktorým bola pridaná až po infekcii. Z toho sme usúdili, že testované látky neinteragujú priamo s vírusom, ale ovplyvňujú bunky, v ktorých sa vírus replikuje. Ďalší pokus bol preto orientovaný na pozorovanie rastu bunkovej kultúry MDCK v prítomnosti látok 1M, 2M a 3M. Vzhľadom na najvyššiu účinnosť látok pri koncentrácii 10⁻⁵ sme testovali aj nižšie koncentrácie (10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ a 10⁻⁸). Najvyšší účinok testovaných látok sa prejavil po 72 hodinách, následne sa rast buniek spomalil. Látka 1M mala na rast buniek pozitívny efekt, ktorý sa najvýraznejšie prejavil pri koncentrácii 10⁻⁸. Pričom po 72 hodinách počet buniek vzrástol oproti kontrole o 2,9.10⁵. Podobný účinok sa prejavil aj u látky 2M pri koncentrácii 10⁻⁴ (Obr. 4). Na rozdiel od predošlých látok mala látka 3M negatívny vplyv na rast buniek, pričom pri koncentrácii 10⁻⁷ bol počet buniek v porovnaní s kontrolou o 3,4.10⁵ nižší (Obr.5).

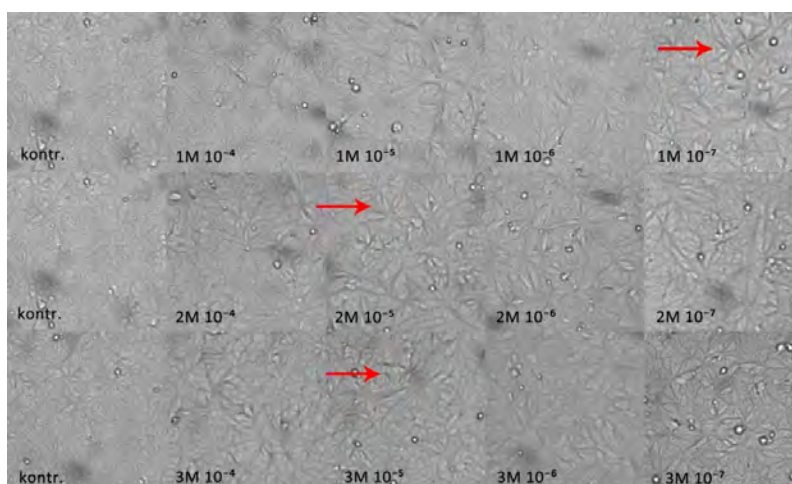


Obr. 4 Vplyv látok 1M a 2M na rast buniek MDCK. PK – pozitívna kontrola, bunky bez pridania 1M a 2M.



Obr. 5 Vplyv látky 3M na rast buniek MDCK. PK – pozitívna kontrola, bunky bez pridania 3M.

Na bunkách, ktoré rástli v prítomnosti látok 1M, 2M a 3M sme pozorovali aj morfológické zmeny. Bunky boli väčšie a tvorili tzv. „kvetinkové“ vzory (Obr.6).



Obr. 6 Bunky MDCK 24 hod. kultivované v prítomnosti látok 1M, 2M a 3M (zväčšenie 20x), šípky ukazujú na morfológicky zmenené bunky tvoriace „kvetinkový“ vzor.

Záver

Testované látky ovplyvnili replikáciu vírusu chrípky A/PR/8/34 v bunkách MDCK. Pozorované zníženie titra vírusu bolo pravdepodobne spôsobené ich pôsobením na bunky a nie špecifickou interakciou s vírusom. Pozorovali sme vplyv látok na rast buniek, kde látky 1M a 2M preukázali pozitívny efekt a látka 3M mala negatívny vplyv na rast buniek s čím je pravdepodobne spojené aj zníženie titra vírusu. Bunky kultivované v

prítomnosti látok 1M, 2M a 3M mali zmenenú morfológiu. Na špecifickejšie určenie interakcií medzi látkami 1M, 2M a 3M a bunkami je potrebné vykonať ďalšie štúdie.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt TRANSMED 2, ITMS 26240120030, spolufinancovaného zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a projektu VEGA 2/0005/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Lamb R. A. (2010) Influenza. In: Mahy B. W. J., Van Regenmortel M. H. V.(eds.) Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology. Elsevier, San Diego, USA, p. 642
- [2] World Health Organization [Citované: 24.2.2013]
< <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>>
- [3] Ison M.G. (2011) Curr .Opin. Virol. 1(6), p. 563
- [4] World Health Organization [Citované: 24.2.2013]
<http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/antiviral_susceptibility/m2inhibitor/en/index.html>
- [5] Konvalina I., Gašperík J., Golais F. (2002) Acta Vet. Brno 71, p. 29
- [6] Staňová A., Marák J., Šupolíková M., Číková L., Koiš P., Golais F.(2012) Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal, Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal 2012: Book of Abstracts and Program: 11th-14th June 2012, Olomouc, ČR, p. 160
- [7] Číková L., Šupolíková M., Marák J., Staňová A., Koiš P., Golais F.(2012) Študentská vedecká konferencia PriF UK 2012. Zborník recenzovaných príspevkov, Bratislava, SR, p. 101

Kvalitatívno-quantitatívna charakteristika ornitocenóz alúvia stredného toku Váhu (Piešťany - Nové Mesto nad Váhom)

Jozef Lacko¹, Ján Topercer²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra ekológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika; jozef.lacko217@gmail.com

²Botanická záhrada UK v Bratislave, pracovisko Blatnica, Blatnica 315, 038 15 Blatnica pri Martine, Slovenská republika

Abstrakt

The research focuses on the analysis of structure and dynamics of bird communities in two transects on the Vah river alluvium between cities Piešťany and Nove Mesto nad Vahom. The research is aimed on the analysis of species composition, distribution and multitude of aquatic and wetland birds, on the analysis of their seasonal dynamics, interannual variability in species composition, diversity and others indicators of birds in these transects. The secondary aim is to find out the main types of disturbances, their intensity, antropogenous effects and others chosen environment variables in these transects of Vah river alluvium. We will utilize statistical analyses from these environmental variables and explain their impact on bird communities of this area. From these findings suitable management measures for the conservation or improvement of conservation status of target species will be derived.

Kľúčové slová: ornitocenózy, alúvium, Váh, disturbance

Úvod a formulácia cieľa

Stredný tok Váhu (úsek Piešťany – Nové Mesto nad Váhom) predstavuje z prírodného hľadiska veľmi zaujímavé a cenné územie. Vytvára rozsiahle alúvium s pôvodným, málo dotknutým lužným lesom, ktorý je obklopený orografickými celkami Považského Inovca z východnej strany a Malými Karpatmi zo západnej. Členitosť a rozmanitosť prírodného prostredia zaujala mnohých prírodovedcov. Boli to najmä botanici takých významných mien ako Domin [1] a Silinger [2], ktorí vyzdvihli prírodné hodnoty tohto územia.

Toto územie neuniklo pozornosti ani ornitológom. Avifauna stredného toku Váhu sa začala systematicky skúmať až od roku 1950. Ťažiskom výskumu bola údolná niva Váhu.

Medzi prvých ornitologických priekopníkov patril V. Kubán, ktorý už v roku 1959 začal vtáky v Piešťanoch krúžkovať. V širšom okolí Piešťan okružkoval v rokoch 1960 – 1999 vyše stotisíc vtákov. Získal celý rad spätných hlásení, a tak prispel rozhodujúcou mierou k poznaniu migrácie vtáctva v okolí Piešťan a Nového mesta nad Váhom. Publikoval viacero článkov s rôznou problematikou, ktoré sa týkajú ornitofauny tohto územia [3].

Ťahové pomery vtákov na Považí si všímal J. Darola [4].

V roku 1970 začal vtáky krúžkovať †M. Šnajdar (1938 – 1998) a podieľal sa aj na sledovaní vtákov okolia Piešťan a Nového Mesta nad Váhom. Krúžkoval najmä bahenné vtáctvo, skúmal nidobiológiu strakoša červenohlavého a získal niekoľko cenných spätných odchytov [5]. Najväčšiu zásluhu na výskume tejto lokality a najviac údajov a prác pochádza od Piešťanského ornitológa Pavla Kaňuščáka, ktorý vo svojom diele Vtáky širšieho okolia Piešťan podáva sumár doposiaľ zmapovaných druhov a ornitologických prác na tomto území. Ťažiskom jeho ornitologických prác bolo prevažne Piešťanské letisko a vodná nádrž Sĺňava [6].

Predkladané výsledky sú zatiaľ iba predbežné. Do budúca je našim cieľom zrealizovať a zdokumentovať výskum ornitocenóz tejto lokality so zreteľom na pôsobenie rôznych ekologických faktorov, disturbancií a antropických vplyvov ktoré môžu mať relevantný dosah na tamojšiu ornitofaunu, na ostatné biotické a abiotické zložky krajiny a na fungovanie celého ekosystému. Na základe účinku pôsobenia týchto faktorov a ich následných štatistických prevedení stanovíme vhodné manažmentové opatrenia pre ochranu, zachovanie a zlepšenie stavu ornitocenóz tohto hodnotného územia.

Materiál a metódy

Ornitocenózu stredného toku Váhu sme začali systematicky skúmať od jesene 2012. Doposiaľ bolo uskutočnených 8 návštev za obdobie jesennej migrácie a zimného výskytu v rokoch 2012/2013. Ako hlavnú výskumnú metódu sme zvolili metódu bodového sčítania vtáctva a v zimnom období pásovú metódu. Sčítavanie prebieha po pravej strane Váhu. Úsek toku Váhu medzi Piešťanmi a Novým Mestom na Váhom sme si rozdelili na dva transekty. Prvý transekt smeruje od Nového Mesta nad Váhom k Piešťanom a je dlhý cca 4 km. Transekt sme si rozdelili na 20 bodov (stanovišť), vzdialených od seba 200 m. Na každom bode zotrvávame presne 5 min, a za tento čas registrujeme akusticky i vizuálne všetky vtáčie druhy – akvatické aj terestrické. Obdobne, túto výskumnú metódu aplikujeme aj na druhom transekte v smere z Piešťan do Nového Mesta nad Váhom. V zimnom období využívame metódu pásového sčítania vodného vtáctva, kedy sa z počiatočného bodu transektu súvisle pohybujeme priamym smerom pozdĺž toku Váhu až na konečný bod transektu, pričom zaznamenávame všetky akvatické druhy avifauny.

Enumeráciu druhov registrujeme vizuálne pomocou ďalekohľadu (zväčšenie 7x50) a akusticky [7]. Sledované druhy a stanovištia dokumentujeme aj fotografiami, ktoré sú nasnímané fotoaparátom značky BenQ (4x10 zoom) a pri determinácii druhov si pomáhame

určovacím kľúčom „Collins Bird Guide: The Most Complete Guide to the Birds of Britain and Europe“ [8]. Slovenské názvy, zaradenie do systému a autorov opisu sme uviedli podľa „Kovalik Peter a kol. - Slovenské mená vtákov sveta [9].“

Zistené druhy klasifikujeme základnými kvantitatívnymi charakteristikami vtácej populácie a s využitím viacerých štatistických metód [10]. Z kvantitatívnych charakteristík ornitocenóz hodnotíme:

1. abundancia (N_{max})
2. denzita (ex/10ha)
3. dominancia (D):
 - viac ako 10% - eudominantný druh
 - 5 – 10% - dominantný druh
 - 2 – 5% - subdominantný druh
 - 1 – 2% - recedentný druh
 - menej ako 1% - subrecedentný druh
4. frekvencia (F):
 - 0 – 25% - akcidentálne druhy
 - 25 – 50% - akcesorické druhy
 - 50 – 75% - konštantné druhy
 - 75 – 100% - eukonštantné druhy
5. Shannonov-Weanerov index diverzity (H')
6. Index ekvitability (E)
7. Sörensenov index podobnosti dvoch transektov (QS)

Výsledky a diskusia

Výskum sme začali realizovať od 18.10.2012 a od tohto dátumu sme na lokalite zaznamenali celkovo 49 druhov, z toho 15 akvatických. Zistené druhy patrili do 12 radov a 24 čeľadí. 7 druhov patrilo medzi transmigrantov a hibernantov a 42 druhov bolo sedentárnych.

Prehľad zistených druhov za obdobie jesennej migrácie a zimného výskytu v rokoch 2012/2013 interpretuje „tab.1.“

Tab. 1 Prehľad všetkých doposiaľ zistených druhov vtákov na Váhu v úseku Nové Mesto nad Váhom - Piešťany s ich ekologickými metrikami (N – abundancia, H' – index diverzity, E – index ekvitability, QS – Sörensenov index podobnosti, D – dominancia, Den – denzita, F – frekvencia, K – konštantnosť, \bar{x} - priemer, Σ - suma. Migranti sú vyznačení sivými pruhmi.

Druh	N	H'	E	QS	D (%)	D	Den	F (%)	K
------	---	----	---	----	-------	---	-----	-------	---

						(ex/10h a)			
<i>Anas platyrhynchos</i>	75				12,90	ED	7,5	75	VS
<i>Chroicocephalus ridibundus</i>	62				10,67	ED	6,2	37,5	P
<i>Carduelis carduelis</i>	50				8,61	D	5	62,5	S
<i>Turdus pilaris</i>	50				8,61	D	5	87,5	VS
<i>Fulica atra</i>	45				7,74	D	4,5	25	P
<i>Larus canus</i>	40				6,89	D	4	12,5	N
<i>Columba livia</i>	30				5,16	D	3	12,5	N
<i>Larus argentatus</i>	26				4,48	SD	2,6	62,5	S
<i>Bucephala clangula</i>	23				3,96	SD	2,3	12,5	N
<i>Passer montanus</i>	20				3,44	SD	2	50	S
<i>Phalacrocorax carbo</i>	20				3,44	SD	2	87,5	VS
<i>Parus major</i>	15				2,58	SD	1,5	100	VS
<i>Emberiza citrinella</i>	15				2,58	SD	1,5	50	S
<i>Cygnus olor</i>	12				2,07	SD	1,2	62,5	S
<i>Aegithalos caudatus</i>	10				1,72	R	1	87,5	VS
<i>Aythya fuligula</i>	10				1,72	R	1	37,5	P
<i>Fringilla coelebs</i>	8				1,38	R	0,8	75	VS
<i>Corvus corone</i>	8				1,38	R	0,8	62,5	S
<i>Corvus frugilegus</i>	5				0,86	SR	0,5	25	P
<i>Garrulus glandarius</i>	5				0,86	SR	0,5	37,5	P
<i>Corvus cornix</i>	5				0,86	SR	0,5	25	P
<i>Coccyzus erythrophthalmus</i>	4				0,69	SR	0,4	25	P
<i>Cyanistes caeruleus</i>	3				0,52	SR	0,3	50	S
<i>Erithacus rubecula</i>	3				0,52	SR	0,3	25	P
<i>Sitta europaea</i>	3				0,52	SR	0,3	87,5	VS
<i>Buteo buteo</i>	3				0,52	SR	0,3	62,5	S
<i>Pica pica</i>	3				0,52	SR	0,3	62,5	S
<i>Mergus merganser</i>	3				0,52	SR	0,3	12,5	N
<i>Turdus merula</i>	2				0,34	SR	0,2	100	VS
<i>Dendrocopos major</i>	2				0,34	SR	0,2	87,5	VS
<i>Alcedo atthis</i>	2				0,34	SR	0,2	100	VS
<i>Chloris chloris</i>	2				0,34	SR	0,2	75	S
<i>Dryocopus martius</i>	2				0,34	SR	0,2	62,5	S
<i>Nannus troglodytes</i>	1				0,17	SR	0,1	62,5	S
<i>Spinus spinus</i>	1				0,17	SR	0,1	12,5	N
<i>Remiz pendulinus</i>	1				0,17	SR	0,1	12,5	N
<i>Ardea cinerea</i>	1				0,17	SR	0,1	50	P
<i>Ardea alba</i>	1				0,17	SR	0,1	25	P
<i>Picus viridis</i>	1				0,17	SR	0,1	62,5	S
<i>Fringilla montifringilla</i>	1				0,17	SR	0,1	12,5	N
<i>Tachybaptus ruficollis</i>	1				0,17	SR	0,1	12,5	N
<i>Motacilla cinerea</i>	1				0,17	SR	0,1	25	P
<i>Periparus ater</i>	1				0,17	SR	0,1	12,5	N
<i>Poecile palustris</i>	1				0,17	SR	0,1	12,5	N
<i>Prunella modularis</i>	1				0,17	SR	0,1	12,5	N
<i>Turdus viscivorus</i>	1				0,17	SR	0,1	12,5	N
<i>Picus canus</i>	1				0,17	SR	0,1	12,5	N
<i>Aythya ferina</i>	1				0,17	SR	0,1	25	P
<i>Phasianus colchicus</i>	1				0,17	SR	0,1	25	P
	$\Sigma =$ 582	$H' =$ 1,34	$E =$ 0,79	$QS =$ 1,35	$\bar{x} =$ 2,04		$\bar{x} =$ 1,19	$\bar{x} =$ 45,4	

Jednotlivé druhy patria do týchto radov: *Anseriformes*, *Charadriiformes*, *Passeriformes*, *Gruiformes*, *Columbiformes*, *Phalacrocoraciformes*, *Accipitriformes*,

Ardeiformes, *Podicipediformes*, *Piciformes*, *Galliformes* a *Coraciiformes*. Najpočetnejší rad zastupoval *Passeriformes* s 27 druhmi, nasledoval rad *Anseriformes* so 6 druhmi, rad *Piciformes* reprezentovali 4 druhy. Minoritný počet druhov patrilo do ostatných radov: *Charadriiformes* s 3 druhmi, *Ardeiformes* s 2 druhmi a rady *Galliformes*, *Coraciiformes*, *Gruiformes*, *Columbiformes*, *Accipitriformes*, *Phalacrocoraciformes* a *Podicipediformes*, ktoré zahŕňali jeden druh.

V období jesennej migrácie a zimného výskytu sme na lokalite zastihli 7 transmigrantných a hibernujúcich druhov. Boli to: *Bucephala clangula*, *Mergus merganser*, *Spinus spinus*, *Remiz pendulinus*, *Fringilla montifringilla*, *Motacilla cinerea* a *Prunella modularis*. Ostatné sledované druhy patrili medzi bežné sedentárne druhy.

Z migrujúcich a prezimujúcich druhov, stojí za zmienku výskyt hlaholiek severských (15♂ a 8♀), ktoré sme sledovali 28.2.2013 v početnom kompaktnom krdli, zloženom z 23 jedincov a pasúcich sa netradičnom mieste, kde Váh preteká cez mesto a kde je oblasť viac vyrušovaná. Už Kaňuščák [6] spomína výskyt tejto kačice v pomerne početných krdľoch hlavne na Piešťanskej Sĺňave, ale bežne i na vodách Váhu v okolí Piešťan. V rokoch 1980 – 2006 celkovo zaznamenal 46 525 exemplárov.

Z ďalších našich vzácnejších zimných pozorovaní možno spomenúť výskyt potápačov veľkých 1.2.2013 (2 ♂ a 1 ♀), v úseku Váhu pri Piešťanoch, kde sa pohybovali spolu v krdli lysiek čiernych a kačíc divých. Kaňuščák [6] spomína výskyt tohto druhu v širšom okolí Piešťan pravidelne počas ťahu a v zimnom období. Zmieňuje sa o jeho výskyte na rovnakých miestach ako potápač biely, avšak v menšom početnom zastúpení. V rokoch 1980 – 2006 zastihol celkom 3537 exemplárov.

Záver

Na skúmanom území sme v období jesennej migrácie a zimného výskytu (18.10.2012 – 1.3.2013) výskytu doposiaľ zistili 49 druhov avifauny, z toho z 15 akvatických druhov. Celkovo zaznamenali 582 exemplárov.

Z kvantitatívnych charakteristík ornitocenóz sme zisťovali ornitocenologické indexy, a to konkrétne index diverzity s hodnotou 1,34, index ekvitability s hodnotou 0,79 a Sörensenov index podobnosti transektov s hodnotou 1,35. Priemerná dominancia spoločenstva bola 2,04 %, priemerná denzita 1,19 ex/10ha a frekvencia 45,4 %.

Zistené druhy patrili do 12 radov a 24 čeľadí. Najpočetnejší rad bol *Passeriformes* s 27 druhmi, nasledovali rady *Anseriformes* (6 druhov), *Piciformes* (4 druhy), *Charadriiformes* (3

druhy), *Ardeiformes* (2 druhy) a rady *Galliformes*, *Coraciiformes*, *Gruiformes*, *Columbiformes*, *Accipitriformes*, *Phalacrocoraciformes* a *Podicipediformes*, ktoré zahŕňali po jednom druhu. Zmapovali sme 7 druhov patriacich medzi transmigrantov a hibernantov a 42 druhov bolo sedentárnych.

Zo vzácnějších pozorovaní sme doposiaľ zaznamenali výskyt 23 hlaholiek severských 28.2.2013 a 3 potápačov veľkých 1.2.2013 v úseku toku Váhu pri Piešťanoch.

PodĎakovanie

Práca bola vypracovaná v rámci grantu VEGA 1/0176/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Domin K. (1931) Piešťanská květena. Praha, p. 268
- [2] Silinger P. (1931) Rozp. Čes. Akad. Věd, Tř. 2(40), p. 1
- [3] Kubán V. (1993) Tichodroma, 6, p. 121
- [4] Darola J. (1953) Váh ako ťahová cesta vtáctva. Diplomová práca, p. 159
- [5] Šnajdar M., Kaňuščák P. (1977b.) Príspevok k rozšíreniu hniezdnej biológie strakoša červenohlavého (*Lanius senator L.*) v širšom okolí Piešťan. Správy Moravského ornitologického združenia, Přešov, 1997: 49 – 82
- [6] Kaňuščák P. (2007) Vtáctvo širšieho okolia Piešťan. Balneologické múzeum, Piešťany, p. 176
- [7] Janda J., Řepa P. (1986) Metódy kvantitatívneho výskumu v ornitológii. SZN, Okresní vlastivědné muzeum J. A. Komenského, Praha, p. 157.
- [8] Svenson L., Grant P. J., Mullarney K., et al. (2001) Collins bird guide: the most complete guide to the birds of Britain and Europe. Collins, Great Britain, p. 400
- [9] Kovalík P., Pečeňovský S., Čapek M., et al. (2010) Slovenské mená vtákov sveta. SOS/Birdlife, Bratislava, Slovensko, p. 396
- [10] Tischler W. (1949) Grundzuge der terrestrischer Tierökologie. F. Vieweg und Sohn, Braunschweig, p. 220

Transport a translokácia kadmia v rastline s kontraktilnými koreňmi

Andrej Lackovič, Alexander Lux

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyziológie rastlín, Mlynská dolina B2, 842 15 Bratislava, Slovenská Republika; lackovic.andrej@gmail.com

Abstrakt

Local influence of cadmium on roots of *Tritonia gladiolaris* show different absorption characteristics of contractile roots in contrast to what is known about ordinary roots. Specialized anatomy of tissues of the basal part of the contractile root allows enhanced radial transport of ions. This is due to the retarded maturation of apoplasmic barriers: lower depositions of lignin and suberin into the cell walls of endodermis and absence of sclerenchyma in basal parts of these roots. It represents the necessary adaptation allowing the process of root contraction. The plants for cadmium uptake experiments were grown in split containers; in control medium in one of the two compartments and in medium with added cadmium in the other compartment. Two variants were set up for comparison: with cadmium in basal and in apical part of the roots and the plants were analyzed for cadmium content.

Kľúčové slová: *Koreň; kontraktilný koreň; cadmium.*

Úvod a formulácia cieľa

Špecializované kontraktilné korene dokážu zabezpečiť pohyb rastliny v pôde. Vznikli ako adaptácia na nepriaznivé podmienky prostredia a skracovaním svojej dĺžky zaťahujú nadzemnú časť rastliny hlbšie do pôdy, kde je rastlina lepšie chránená adekvátnou vrstvou pôdy. [1, 2]

Predpokladom pre proces kontrakcie je špeciálna anatomická stavba týchto koreňov. Keďže bazálna časť koreňa pri tomto procese mení svoju dĺžku, musí mať fyzikálne vlastnosti umožňujúce vyššiu plasticitu. To je dosiahnuté spomalením vývinu endodermis, mechanických pletív a zníženou depozíciou lignínu a suberínu, ktoré tvoria bariéry apoplazmatického transportu práve v bazálnej časti bežného koreňa. Keďže v bežných koreňoch sú tieto depozity relatívne rigidné a pevné, nedokázali by sa skrútiť a boli by prekážkou pre proces kontrakcie. [2, 3, 4]

Špecifická anatómia zároveň mení transport látok v koreni. Absencia bariér v bazálnej časti koreňa umožňuje teoreticky transport látok, ktorý v bežných koreňoch s plne vyvinutými endodermálnymi bariérami nie je možný. Publikované experimenty naznačujú, že kontraktilná časť koreňa je viac priepustná pre vodu ako stredná nekontraktilná časť koreňa. [4]

Cieľom práce je zistiť, či nastáva zvýšený príjem iónov kadmia bazálnou časťou kontraktilných koreňov a porovnať príjem a translokáciu bazálnou a apikálnou časťou kontraktilného koreňa.

Materiál a metódy

Ako experimentálne rastliny sme použili *in vitro* kultúru rastliny druhu *Tritonia gladiolaris* udržovanú na Chemickom ústave SAV a získanú z University of KwaZulu-Natal, Juhoafrická republika.

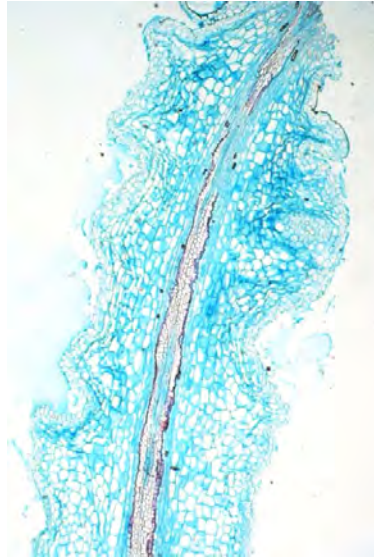
Pre svetelnú mikroskopiu sme pripravili trvalé parafínové preparáty, pozorované v mikroskope Zeiss Axioscope 2+.

Vplyv rozdielnej koncentrácie kadmia na jednotlivé časti koreňa sme dosiahli pestovaním v Petriho miskách na agarovom médiu. Použili sme Murashige & Skoog médium a Murashige & Skoog médium s koncentráciou kadmia $c=100\mu\text{M}$. Zväšť pripravené médiá sme preniesli do Petriho misiek a predpestované rastliny sme implantovali tak, aby polovica koreňa smerom k apexu rástla v jednom médiu a polovica koreňa smerom k báze v druhom médiu. Pripravili sme dva varianty: V1 s vplyvom kadmia na bazálnu časť koreňa a V2 s vplyvom kadmia na apikálnu časť koreňa. V každom variante bolo 9 rastlín rodu *Tritonia* z *in vitro* kultúry. Kultivácia trvala 10 dní v kultivačnej komore.

Vzorky listov a koreňov z oboch kompartmentov v oboch variantoch boli zvlášť analyzované na prítomnosť kadmia na Ústave laboratórneho výskumu geomateriálov (ULVG) na Prírodovedeckej fakulte Univerzity Komenského.

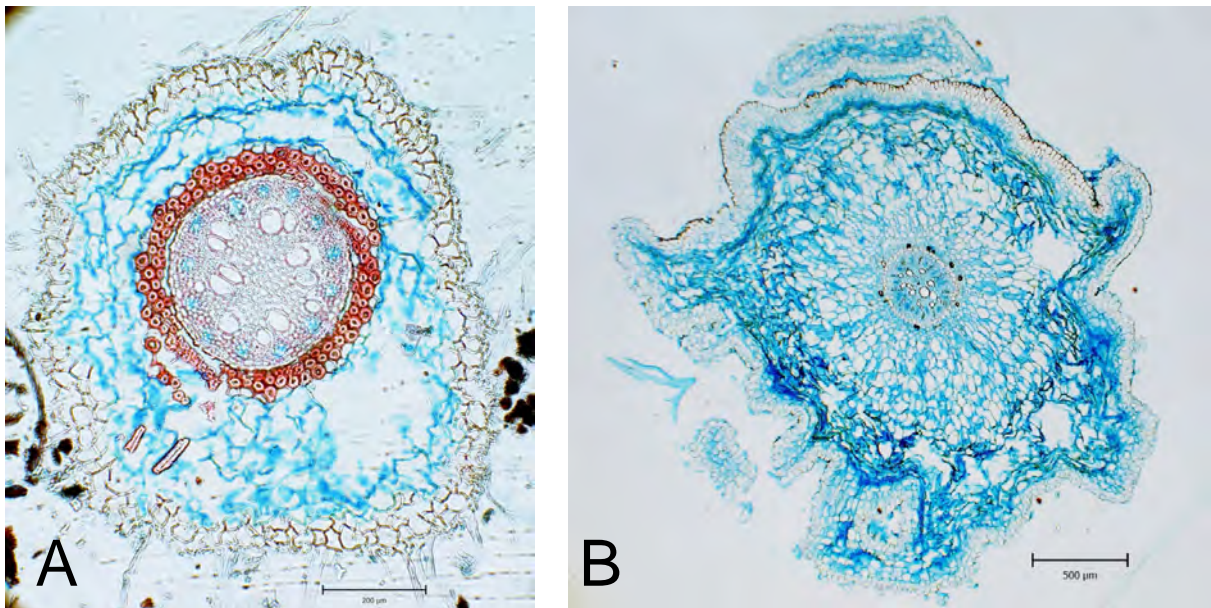
Výsledky a diskusia

Rastliny druhu *Tritonia gladiolaris* tvoria v *in vitro* podmienkach zhľuky adventívnych koreňov jedného typu, z ktorých asi polovica v určitej fáze prechádza do procesu kontrakcie. Na báze sú tieto korene viditeľne zvrásnené, čo je prejav pokročilého štádia kontrakcie. Na pozdĺžnom reze sa kontrahovaná časť koreňa javí ako zvlhnutý povrch. Vnútoraná časť kortexu vplyvom kontrakcie kolabuje.



Obr. 1 Pozdĺžny rez bazálnou časťou kontraktilného koreňa rastliny *Tritonia gladiolaris*

Na priečnom reze je koreň v apikálnej časti normálne vyvinutý. Endodermálne bariéry sa zakladajú vo vzdialenosti niekoľko milimetrov od apexu a vo vzdialenosti 1 cm je plne vyvinutý výrazný sklerenchým. Bazálna časť koreňa však na rozdiel od nekontraktilných druhov má vývin spomalený a sklerenchým sa tu nevyskytuje.

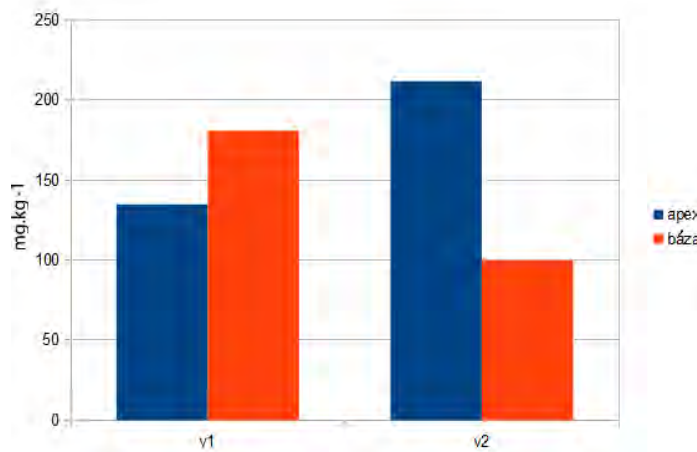


Obr. 2 Priečny rez (A) apikálnou a (B) bazálnou časťou kontraktilného koreňa rastliny *Tritonia gladiolaris*

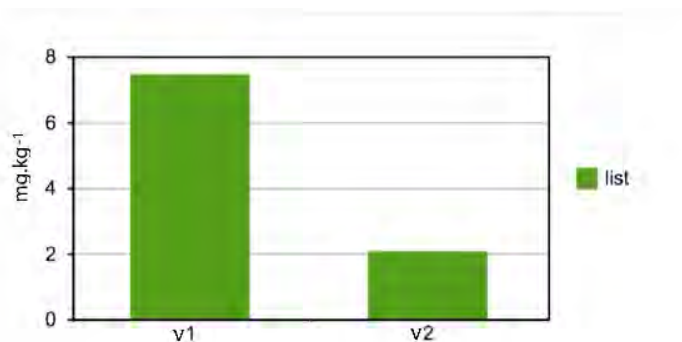
Variant 1 predstavuje rastliny rastúce bazálnou časťou koreňa v agare s obsahom kadmia a s apikálnou časťou v kontrolnom agare. Variant 2 predstavuje rastliny rastúce s bazálnou časťou v kontrolnom agare a s apikálnou časťou v agare s obsahom kadmia.

Obsah kadmia bol u experimentálnych rastlín prvého variantu (s vplyvom kadmia na

bázu) vyšší v bazálnej časti. Predpokladáme príjem kadmia vďaka absencii endodermálnych bariér. V druhom variante (vplyv kadmia na apex) prebiehal príjem kadmia normálnym spôsobom v absorpčnej zóne apexu. Do bazálnej časti sa však translokovalo menšie množstvo kadmia. Najvyšší obsah kadmia sme zaznamenali v apikálnej časti koreňa, ktorá rástla v prítomnosti kadmia, paradoxne však v nadzemnej časti tohoto variantu sme zaznamenali najnižší obsah kadmia.



Obr. 3 Obsah kadmia v jednotlivých častiach koreňa v oboch variantoch experimentu



Obr. 4 Obsah kadmia v listoch v jednotlivých variantoch pokusu

V prvom variante sme zaznamenali vysoký obsah kadmia v nadzemnej časti rastliny ($7,5 \text{ mg.kg}^{-1}$). Potvrďuje to hypotézu o vyššom prijme iónov z pôdneho roztoku v bazálnej kontraktilnej časti koreňa. Kadmium z média bolo prijaté koreňmi a priamo translokované do ďalších orgánov rastliny. V druhom variante bolo kadmium apexom síce prijaté, translokáciou do nadzemnej časti rastliny však prešlo menšie množstvo iónov (obsah kadmia v nadzemnej časti bol $2,04 \text{ mg.kg}^{-1}$).

Záver

Bazálna časť kontraktilného koreňa je vďaka svojej anatomickej stavbe viac permeabilná nielen pre vodu, ale aj pre toxické ióny kadmia v porovnaní s apikálnou časťou kontraktilného koreňa. Rastliny s kontraktilnými koreňmi sú preto schopné príjmu kadmia vo vrchných vrstvách pôdy a sú schopné ho translokovať do nadzemných častí.

Pod'akovanie

Práca bola vypracovaná na Katedre fyziológie rastlín Prírodovedeckej fakulty UK v Bratislave v spolupráci s Chemickým ústavom Slovenskej akadémie vied a Research Centre for Plant Growth and Development, School of Biological and Conservation Sciences, University of KwaZulu-Natal, South Africa a bola podporená grantami Agentúry na podporu výskumu a vývoja Nr. APVV-0140-10, COST 0004-06, VEGA 1/0817/12 a COST FA 0905.

Zoznam použitej literatúry

- [1] North G. B., Brinton E. K., Garrett T. Y. (2008) *Plant, Cell & Environment* 31, p. 1179
- [2] Wilson K., Honey J. N. (1966) *Ann. Bot.* 30, p. 47
- [3] Pütz N., Hüning G., Froebe H. A. (1995) *Ann. Bot.* 75, p. 633
- [4] North G. B., Nobel P. S. (2000) *Ann. Bot.* 85, p. 247

Influence of different culture condition on store-operated calcium entry and membrane potential in HT22 hippocampal neuronal cell line

Lucia Lapínová¹, Lucia Lichvárová², Michaela Pavlovičová², Jana Hlinková¹, Ľubica Lacinová²

¹*Comenius University in Bratislava, Faculty of Science, Department of Animal Physiology and Ethology, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovak Republic;*
lapinova.lucia@hotmail.com

²*Slovak Academy of Science, Institute of Molecular Physiology and Genetics, Department of Transport Proteins, Vlárská 5, 833 34 Bratislava, Slovak Republic*

Abstract

Calcium flux is important action for cell survival. Many cellular processes are activated by changes in intracellular calcium concentration. Calcium influx occurs from extracellular sources, but also from intracellular storage (e.g., from endoplasmic reticulum). When intracellular storage is depleted, activation of store-operated calcium entry (SOCE) is observed. Expression of stromal interaction molecule 1 (STIM1) and ORAI1 channel, which are responsible for SOCE occurs in HT22 hippocampal cell line. We have shown that expression of STIM1 and ORAI1 gene depends on culture conditions of HT22 cells and is modulated by glutamate. Further, different culture conditions and treatment with glutamate affected the resting membrane potential of these cells.

Keywords: HT22 cell line, STIM1, ORAI1, membrane potential.

Introduction and formulation of objective

HT22 murine hippocampal cell line is a sub-line cloned from HT4 cells immortalized from primary mouse hippocampal neurons using a temperature-sensitive small virus-40 T antigen. These cells have some essential properties of functional cholinergic neurons hence they can be used as an *in vitro* model for studies related to hippocampal cholinergic function [1]. HT22 cells are an excellent model for studying of oxidative stress. After glutamate treatment intracellular calcium is depleted from endoplasmic reticulum, the main intracellular calcium store. To refill this storage plasma membrane calcium channels, so-called store-operated calcium entry (SOCE) need to be activated. One of these calcium channels is ORAI1, which is activated by binding of stromal interaction molecule 1 (STIM1) [1].

In our research we investigate effects of different culture condition and a glutamate treatment on a resting membrane potential of HT22 cells and STIM1 and ORAI1 gene expression.

Materials and methods

HT22 cells used for experiment were a generous gift from Univ.-Prof. Dr. Axel Methner (Department of Neurology Universitätsmedizin Johannes-Gutenberg-Universität

Mainz). The cells were cultivated in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) with 5% fetal bovine serum (FBS) and 1% streptomycin and penicillin in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% air at 37°C. Cells were on Petri dishes in a density of 100 000 cells/ml. HT22 cells were either unconditioned or cultivated with 50 ng/ml NGF, 500 µM cAMP or 1x N2 supplement. After one day of unconditioned HT22 cells and half of conditioned HT22 cells were treated with 5 mM glutamate for 5 hours before they were either used for electrophysiological experiment or frozen for analyses of gene expression. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich.

Isolation of RNA with TriReagent method was followed by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) with specific pairs of primers (HWS). Total RNA was isolated by TRI Reagent (Sigma Aldrich). Total RNA was extracted by chloroform/isopropanol precipitation (SERVA). After centrifugation RNA pellet was washed with 70% ethanol and stored in 96% ethanol (SERVA) at -20°C overnight. The purity and integrity of isolated RNA was checked spectrophotometrically on nanophotometer (IMPLEN). Reverse transcription was performed using 1.5 µg of total RNAs and Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare) with Random Hexamer Primer (Fermentas) [4]. PCR specific for the STIM1 was carried out using following primers: mSTIM1for: 5'-GCT CTC AAT GCC ATG CCT TCC AAT-3' and mSTIM1rev: 5'-TCT AGG CCA TGG TTC AAC GCC ATA-3'. ORAI1 was carried out using following primers: mORAI1for: 5'-GCT CTG GGT CAA GTT CT-3' and mORAI1rev: 5'-AAC TGC CGG TCC GTC TTA TG-3'. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was amplified with primers GAPDHfw: 5'-AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3' and GAPDHre: 5'-TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3'. GAPDH was used as a housekeeper gene for semi-quantitative evaluation of PCR. Each PCR program started with initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 36 (for ORAI1), 32 (for STIM1) or 30 (forGAPDH) cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 60°C (for GAPDH and ORAI1) and 65°C (for STIM1) for 1 min, and polymerization at 72°C for 1 min. PCRs were terminated by final polymerization at 72°C for 7 min. All PCR products were analysed on 2% agarose gels. Signals were evaluated by PCBAS 2.08e software.

The resting membrane potential was measured by current-clamp configuration of the patch-clamp technique with HEKA-10 patch-clamp amplifier (HEKA Electronic, Lambrecht, Germany). The extracellular solution contained (in mM): NaCl 109.51, KCl 5.36, HEPES 10, CaCl₂ 1.36, MgO₄S*H₂O 0.81, NaHCO₃ 44.04, pH7.41 (with NaOH). Composition of the

extracellular solution mimicked ionic composition of the culture medium. The intracellular solution contained (in mM): MgATP 3, HEPES 10, EGTA 10, KCl 130, NaGTP 0.4, pH 7.41 (with KOH). All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. The osmolarity of the internal solution was approximately 300 mOsm; the osmolarity of the external solution was 2-3 mOsm lower than the osmolarity of the internal solution. Patch pipettes were manufactured from borosilicate glass (Sutter Instrument, Novato, CA) with input resistance from 1.6 to 2.0 M Ω . The cell capacitance ranged between 22 and 26 pF.

HT22 cells were photographed on Olympus X71 microscope and actual size of photographed field was 920 μm \times 680 μm .

Statistical analyses were made in Origin 8.1. In analyses of STIM1 and ORAI1 expression each value represents the average of 20 samples. In analyses of the membrane potential each value represents the average of 16 measured cells. Results are presented as a mean \pm S.E.M. Statistical differences among groups were determined by one-way analysis of variance (ANOVA). Probability $p < 0.05$ and $p < 0.01$ was considered to be significant.

Results and discussion

Morphology of HT22 cells did not change upon different culture conditions (Fig. 1). In agreement with previously published results [3].

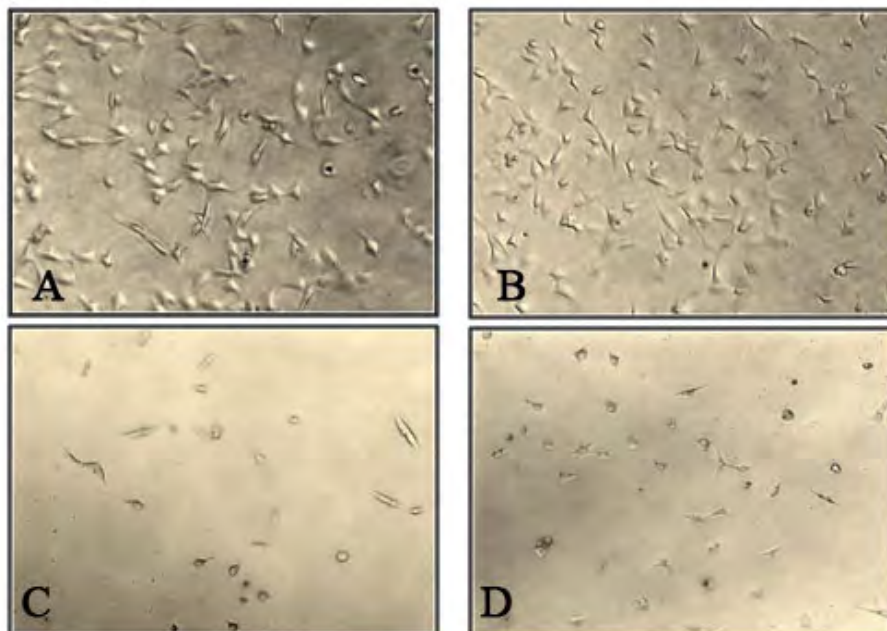


Fig. 1 HT22 cells cultivated under different conditions. **A** Unconditioned HT22 cells without glutamate. **B** HT22 cells conditioned with neuronal growth factor, cyclic adenosine monophosphate and N2 supplement without glutamate. **C** Unconditioned HT22 cells treated 5 hours with glutamate. **D** HT22 cells cultivated with neuronal growth factor, cyclic adenosine monophosphate and N2 supplement treated 5 hours with glutamate. Actual size of photographed field was 920 μm \times 680 μm

The resting membrane potential of HT22 cells after conditioning with NGF, cAMP and N2 supplement decreased, but this decrease was not significant. Further, treatment with glutamate for 5 hours resulted in additional decrease of the resting membrane potential, which was significant compared with control cells (Fig 2).

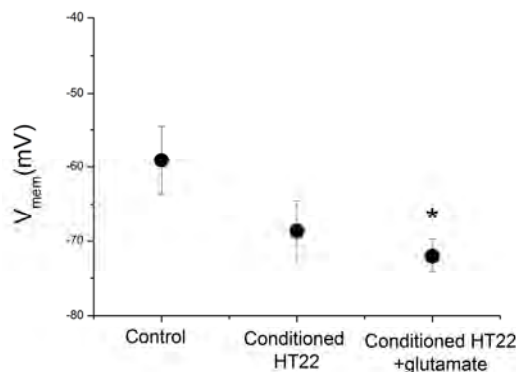


Fig. 2 Comparison of the resting membrane potential of HT22 cells under different conditions: unconditioned HT22 cells without glutamate (control); conditioned HT22 cells without glutamate and a conditioned HT22 cells treated with glutamate. Cells were conditioned with neuronal growth factor, cyclic adenosine monophosphate and N2 supplement. Treatment with glutamate lasted 5 hours. Each value represents an average of 15 measurements and is expressed as mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ versus control

Conditioning of HT22 cells suppressed expression of the STIM1 gene. Treatment with glutamate increased the expression of the STIM1 gene in control cells but decreased the expression of the same gene in conditioned cells (Fig 3). None of these effects was statistically significant.

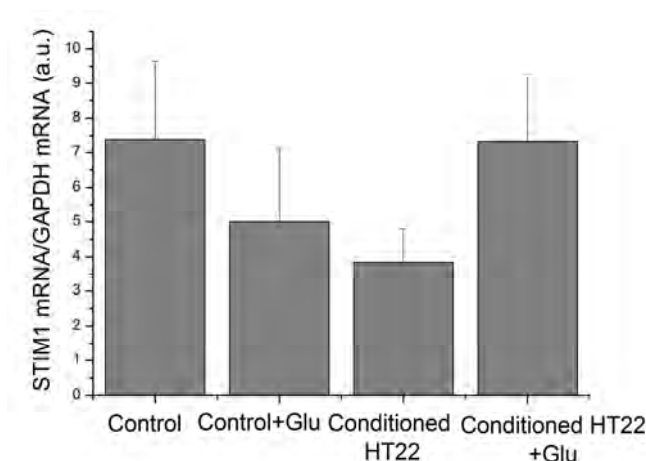


Fig. 3 Relative expression of STIM1 gene in HT22 cells under different conditions: unconditioned HT22 cells without glutamate (control); unconditioned HT22 cells treated with glutamate (control + glutamate); conditioned HT22 cells without glutamate and conditioned HT22 cells treated with glutamate. Cells were conditioned with neuronal growth factor, cyclic adenosine monophosphate and N2 supplement. Treatment with glutamate lasted 5 hours. Concentration of mRNA for STIM1 was evaluated relative to the concentration of mRNA for housekeeping glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene. Each value represents an average of 5 measurements and is expressed as mean \pm S.E.M

Effects of conditioning and glutamate treatment on the expression of ORAI1 gene were similar to effects on STIM1 expression, but less pronounced (Fig 4). This time effect of conditioning was statistically significant.

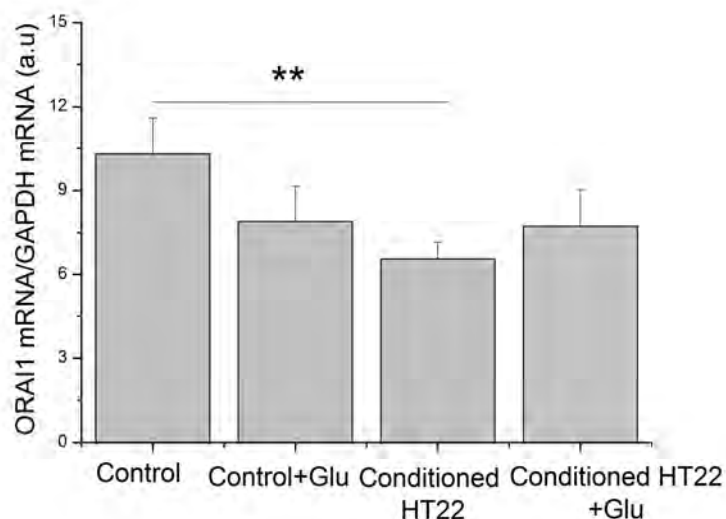


Fig. 4 Relative expression of ORAI1 gene in HT22 cells under different conditions: unconditioned HT22 cells without glutamate (control); unconditioned HT22 cells treated with glutamate (control + glutamate); conditioned HT22 cells without glutamate and conditioned HT22 cells treated with glutamate. Cells were conditioned with neuronal growth factor, cyclic adenosine monophosphate and N2 supplement. Treatment with glutamate lasted 5 hours. Concentration of mRNA for ORAI1 was evaluated relative to the concentration of mRNA for housekeeping glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene. Each value represents an average of 5 samples and is expressed as mean \pm S.E.M. ** $p < 0.01$

In control HT22 cells minimal calcium current was observed, but in conditioned cells after 5 hours incubation with glutamate an inward current with properties of SOCE was observed (Fig 5).

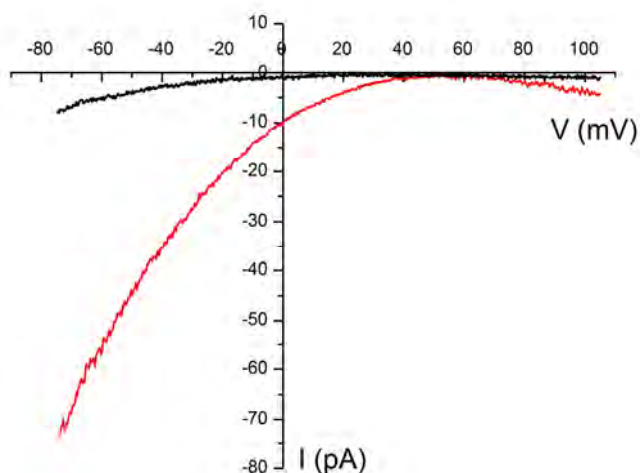


Fig. 5 Amplitudes of calcium currents observed just after break (black line) and after 200 s later (red line) in cells incubated 5 hours with glutamate. Current was activated by a voltage ramp from -80 mV to +100 mV

Conclusion

Our results point to explicit involvement of glutamate in changes of the resting membrane potential, amplitude of calcium current and expression STIM1 and ORAI1 gene, proteins connected to SOCE. STIM1 and ORAI1 gene expression was dependent on the culture conditions, in which HT22 cells were grown, but only ORAI1 expression was affected significantly. Expression was also influenced by glutamate treatment, but this effect was not significant. Further, our data point to possible involvement of glutamate in changes of electrophysiological properties of HT22 cells.

Acknowledgement

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV- 0212- 10 and VVCE- 0064- 07.

References

- [1] Liu J., Li L., Suo Z. W. (2009) *Life Sci.* 84, p. 267
- [2] Henke N., Albrecht P., Bouchachia I, et al. (2013) *Cell Death Dis.* 4, e470. doi:10.1038/cddis.2012.216
- [3] Zhao Z., Lu R., Zhang B., et al. (2012) *Neurol. Res.* 34, p. 38
- [4] Jurkovicova D., Kopacek J., Stefanik P, et al. (2007) *Pflügers Arch.* 454, p. 415

Diferenciálna diagnostika zmiešaných herpetických infekcií v klinických materiáloch

Barbora Lapuníková¹, Ján Košovský², Michaela Vrbová¹, Marcela Kúdelová²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra Molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, SR; *barbora.lapunikova@gmail.com*

²Slovenská akadémia vied, Virologický ústav, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, SR

Abstrakt

Herpes simplex virus 1 and 2 (HSV-1; HSV-2; HHV-1; HHV-2), Epstein-Barr virus (EBV; HHV-4) and Human cytomegalovirus (HCMV; HHV-5) are among major human pathogens. The hallmark of all herpesviruses is ability to remain in infected hosts in latent asymptomatic state during lifetime. Under certain conditions (stress various diseases, immunosuppression) viruses can reactivate. Within human population high-risk groups include HIV positive patients, transplant patients, when virus reactivation can lead to graft rejection, and pregnant women when congenital infection can cause abnormalities of fetal development. For these viruses is characteristic frequent transmission via sputum but also occurrence of co-infection with several herpesviruses. We applied newly developed duplex nested PCR for differential diagnostics of 18 clinical materials (sputa) of 5 immunodeficient patients to detect EBV/HCMV and HSV-1/HSV-2. We tested 12 materials for the presence of EBV and HCMV and 6 ones for the presence of HSV-1 and HSV-2. Eight from twelve samples were positive for both EBV and HCMV. From six samples 3 were positive for HSV-2 and 3 for both HSV-1 and HSV-2.

Kľúčové slová: HCMV, EBV, HSV-1, HSV-2, polymerázová reťazová reakcia, diferenciálna diagnostika

Úvod a formulácia cieľa

Čeľaď *Herpesviridae* pozostáva z veľkého počtu dvojvláknových DNA vírusov. Je známe, že infikujú široký hostiteľský okruh, od mäkkýšov cez plazy, ryby, obojživelníky, až po vyššie stavovce, vrátane človeka. Ich charakteristickou vlastnosťou je schopnosť navodiť u hostiteľa latentnú infekciu, počas ktorej nedochádza k formovaniu infekčného potomstva, no vplyvom určitých faktorov, ako je únava, stres, rozličné ochorenia či imunosupresia spojená napríklad s transplantáciou, dochádza k reaktivácii vírusu z latencie a k navodeniu rekurentnej infekcie. Je známe, že osem vírusov z tejto čeľade je schopných infikovať človeka, HSV-1, HSV-2, Vírus varicely zoster (VZV; HHV3), EBV, HCMV, HHV-6, HHV-7 a vírus asociovaný s Kaposiho sarkómom (KSHV; HHV-8), z toho sú HSV-1, HSV-2, EBV a HCMV známe ako vírusy najčastejšie sa vyskytujúce v ľudskej populácii (Tab. 1).

HSV-1 a HSV-2 sú geneticky podobné alfaherpesvírusy. Replikujú sa v pokožke a na mukózných membránach v mieste vstupnej brány vírusu (orofarynx alebo genitálie), kde môžu spôsobiť vezikulárne lézie na epiderme a infikovať neuróny inervujúce príslušnú oblasť [1]. HSV-1 sa prenáša kontaktom s infekčnými léziami alebo sekrétmi. HSV-2 sa prenáša orálno-genitálnym kontaktom a pri nedostatočnej hygiene, no rovnako, ako HSV1, môže byť prenesený perinatálne pri súčasnej reaktivácii vírusu. V tomto prípade môže dôjsť k vzniku

generalizovanej herpetickej infekcie sprevádzanej infekčnými léziami rozšírenými po celom tele alebo encefalitídou [2]. Takáto forma infekcie býva zvyčajne fatálna, možno jej však predchádzať cisárskym rezom.

HCMV, ktorý patrí do podčeláde *Betaherpesvirinae*, je v ľudskej populácii veľmi rozšírený. V súčasnosti je klinicky najvýznamnejším pôvodcom oportúnnych infekcií u imunodeficientných pacientov. Infekcia s HCMV u imunokompetentných jedincov prebieha väčšinou inaparentne, menej často je spojená s príznakmi infekčnej mononukleózy. Prenáša sa slinami, močom, sekrétmi pohlavných orgánov, slzami a krvou. Primoinfekcie tehotných žien môžu viesť k transplacentárnemu prenosu vírusu na plod. Možná je i perinatálna nákaza novorodenca. Do podčeláde *Gammaherpesvirinae* sa zaraďuje aj **EBV** [3]. Infikuje úzky okruh hostiteľov a pretrváva v latentnom stave v B lymfocytoch počas celého života. EBV vstupuje do tela cez mukózne povrchy. Replikuje sa v epiteliálnych bunkách orofarynxu a spôsobuje infekčnú mononukleózu. K závažnejším chronickým ochoreniam asociovaných s EBV patrí nazofaryngeálny karcinóm, Hodgkinov lymfóm a Burkittov lymfóm

Cieľom práce bolo aplikovať nami vyvinuté metódy diferenciálnej diagnostiky HSV-1/HSV-2 a EBV/HCMV na detekciu týchto vírusov v klinických materiáloch pacientov trpiacich rôznymi formami imunodeficiencie.

Materiál a metódy

Bunky, vírusy, pozitívna kontrola

-bunková línia Vero, Raji (ATCC-CCL-86, obsahuje 40-50 kópií genómu EBV na bunku); bakteriálne bunky *E. coli* JM 109 (Promega); HCMV kmeň AD-169 (ATCC VR-538); HSV-1 kmeň 17 a klinický izolát HSV-2 (zbierka VÚ SAV)

Pozitívne kontroly

Ako kontroly sme použili rekombinantné plazmidy pGEMT HSV-1, pGEMT HSV-2, pGEMT HCMV a pGEMT EBV obsahujúce špecifické sekvencie vybraných génov týchto vírusov (HSV-1-gp061, HSV-2-gp56, HCMV-US14, EBV-BALF5) pripravené podľa Lapuníková (2011) [4] a Iškyová (2012) [5]. Amplifikáciou v duplexnej nestovanej PCR sme vírus špecifickými primermi identifikovali prítomnosť 229 bp (HCMV), 172 bp (EBV), 377 bp (HSV-1) a 484 bp (HSV-2) dlhého PCR produktu.

Klinické materiály

-spútum (sliny, cca 1 ml) 5 pacientov (odoberané 1-3 krát v 7 dňových intervaloch),

Taxón	Názov taxónu	Názov vírusu	Skratka	Triviálny názov	Zaužívaná skratka
Rad	Herpesvirales				
Čeľaď	Herpesviridae				
Podčeľaď	Alphaherpesvirinae				
Rod	Simplexvirus				
Druh		Human herpesvirus 1	HHV1	Herpes simplex virus type 1	HSV-1
		Human herpesvirus 2	HHV2	Herpes simplex virus type 2	HSV-2
Rod	Varicellovirus				
Druh		Human herpesvirus 3	HHV3	Herpes simplex virus type 3	VZV
Podčeľaď	Betaherpesvirinae				
Rod	Cytomegalovirus				
Druh		Human herpesvirus 5	HHV5	Human cytomegalovirus	HCMV
Rod	Roseolovirus				
Druh		Human herpesvirus 6	HHV6	Human herpesvirus 6	
		Human herpesvirus 7	HHV7	Human herpesvirus 7	
Podčeľaď	Gammaherpesvirinae				
Rod	Lymphocryptovirus				
Druh		Human herpesvirus 4	HHV4	Epstein-Barr virus	EBV
Rod	Rhadinovirus				
Druh		Human herpesvirus 8	HHV8	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus	KSHV

Tab. 1 Taxonómia ľudských herpetických vírusov

Duplexná nestovaná PCR

Na amplifikáciu cieľových úsekov DNA (EBV, HCMV, HSV-1 a HSV-2) pomocou dvoch párov špecifických primerov na templáte DNA izolovanej z klinického materiálu a pozitívnych kontrol sme používali duplexnú nestovanú PCR. Prvá aj nestovaná PCR prebiehala v reakčnej zmesi s objemom 20-25 μ l, v 35 alebo 40 cykloch. Podmienky všetkých duplexných PCR reakcií boli stanovené podľa Lapuníková (2011) [4] a Iškyová (2012) [5]. Denaturácia prebiehala pri 95°C/1-2 minúty, annealing pri 52-60°C/30-60 sekúnd a polymerizácia pri 72°C/30 sekúnd. Reakčná zmes obsahovala 0,5-2U GoTaq polymerázy, 1x reakčný pufoer pre PCR, 1,5- 4 mM MgCl₂, 0,2 mmol každého zo štyroch dNTP a 200 μ M každého zo štvorice primerov a templát DNA, pričom templátom v nested PCR bol 1-2 μ l z prvej PCR. Sekvencie primerov používaných v nested PCR sú predmetom duševného vlastníctva.

Výsledky a diskusia

Vyšetrovali sme spúta na prítomnosť **EBV a HCMV** piatich pacientov (č. 1, 2, 3, 4 a 5) trpiacich rôznymi formami imunodeficiencie s rekurentnými špecifickými a nešpecifickými symptómami herpetickej infekcie kože a slizníc úst. Vzorky boli odoberané v troch sériách v týždňových intervaloch. 8/12 vzoriek pacientov bolo pozitívnych na prítomnosť EBV a HCMV (Obr. 1-4A).

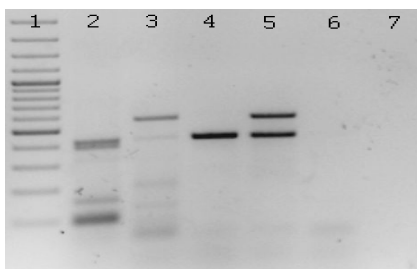
Pacient č. 4 bol dlhodobo monitorovaný počas 10 mesiacov vždy v troch intervaloch: pred liečbou, po liečbe Isoprinozínom (na podporu imunitného systému) a po liečbe s antivírusovým liečivom (intravenózne podávaným). Výsledky testov potvrdili, že pacient č. 4 zostal po liečbe Isoprinozínom pozitívny na EBV aj HCMV (Obr. 4A, dráha 2 a 3), no liečba s antivírusovým liečivom bola úspešná (Obr. 4B, dráha 1-3) a došlo k potlačeniu reaktívacie oboch vírusov.

Spútum 1 pacienta (č.5), odoberané v troch 7-dňových intervaloch, sme vyšetrovali na prítomnosť **HSV-1 a HSV-2** pred liečbou a po krátkodobej liečbe Herpesínom (v najnižšej z doporučených dávok) (v PCR reakcii bolo testovaných 100ng a 300ng DNA). Pred liečbou bol pacient vo všetkých troch odberoch pozitívny na HSV-2 (Obr. 5A dráhy 1 a 3-6). Test prvého odberu v 300ng DNA bol negatívny (Obr. 5A, dráha 2), pravdepodobne v dôsledku inhibície detekcie vírusovej DNA veľkým množstvom chromozomálnej DNA. Dva týždne po ukončení liečby Herpesínom sme spútum pacienta č. 5 opäť diagnostikovali na prítomnosť HSV-1 a HSV-2, opäť v troch 7 dňových intervaloch, (v množstve 100ng a 300ng DNA). Vo všetkých odberoch sme zistili znížené hladiny HSV-2 (Obr. 5B, dráhy 1-6), ale aj prítomnosť HSV-1. Zvolená dávka a dĺžka liečby Herpesínom síce znížila hladinu vírusu v spúte, ale nebola dostatočná na to, aby úplne potlačila reaktíváciu vírusu. Prítomnosť oboch vírusov HSV-1 a HSV-2 v klinických materiáloch pacienta č. 5 po liečbe sme potvrdili vírus-špecifickými PCR (nedokumentované).

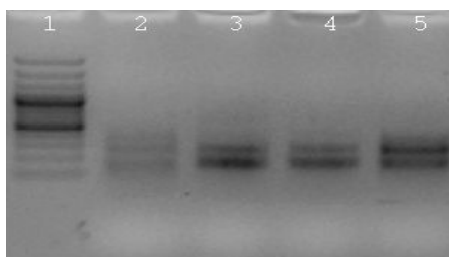
Záver

Diferenciálna diagnostika EBV/HCMV a HSV-1/HSV-2 umožňuje efektívne diagnostikovať prítomnosť týchto vírusov (najčastejšie prenášaných slinami) v jedinom klinickom materiáli v duplexnej PCR reakcii, čo je významným prínosom najmä z hľadiska úspory financií ako aj času, najmä pri požadovanej urgentnej diagnostike rizikových skupín pacientov, ktorými sú napríklad gravidné ženy prípadne pacienti po transplantáciách/transfúziách. Táto metóda tiež poskytuje možnosť sledovania úspešnosti liečby najčastejšie využívanými antivírusovými liečivami. Výsledky diagnostiky klinických

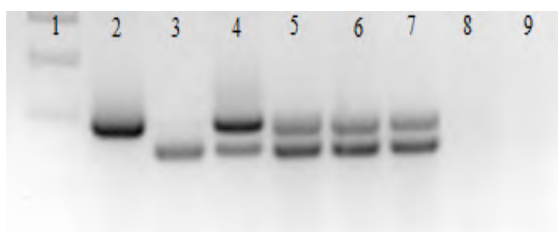
materiálov prezentované v tejto práci okrem toho ukázali, že u pacientov s imunodeficienciou sú zmiešané herpetické infekcie častejšie než sa doteraz všeobecne predpokladalo.



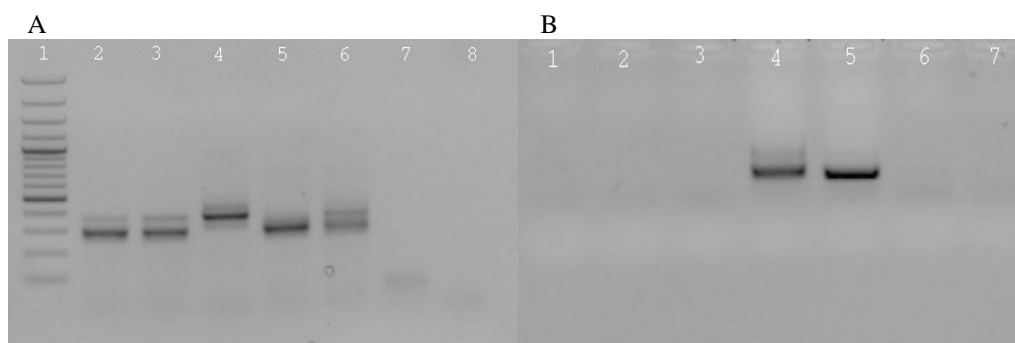
Obr. 1 Diferenciálna diagnostika EBV a HCMV v spúte pacienta č. 1 pomocou duplexnej nested PCR-1-HyperLadder (Bioline), 2- vzorka 1, 3- pGEMT HCMV, 4- pGEMT EBV, 5- pGEMT HCMV+pGEMT EBV, 6- H₂O z 1.PCR, 7- nested H₂O



Obr. 2 Diferenciálna diagnostika EBV a HCMV v spúte pacienta č. 2 pomocou duplexnej nested PCR. 1-HyperLadder (Bioline), 2-4- vzorka 1-3, 5- pGEMT HCMV+pGEMT EBV

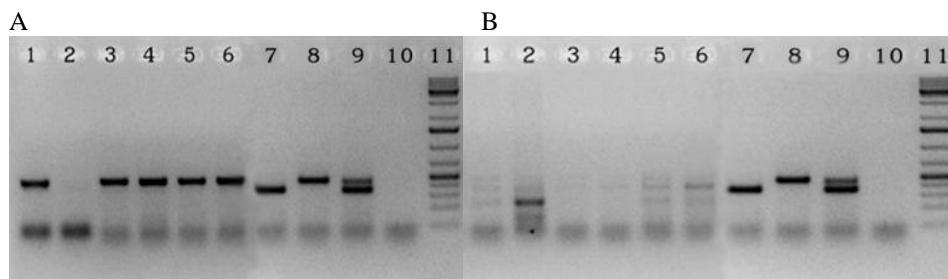


Obr. 3 Diferenciálna diagnostika EBV a HCMV v spúte pacienta č. 3 pomocou duplexnej nested PCR. 1-HyperLadder (Bioline), 2- pGEMT EBV, 3- pGEMT HCMV, 4- pGEMT HCMV+ pGEMT EBV, 5-7- vzorka 1-3, 8- H₂O z 1. PCR, 9- nested H₂O



Obr. 4 Diferenciálna diagnostika EBV a HCMV v spúte pacienta č. 4 po liečbe s Isoprinozínom (A) a diagnostika EBV po liečbe s antivírusovým liečivom (B) pomocou duplexnej nested A 1- HyperLadder

(Bioline), 2-3- vzorka 1-2, 4- pGEMT HCMV, 5- pGEMT EBV, 6- pGEMT HCMV+pGEMT EBV, 7- H₂O z 1. PCR, 8- nested H₂O; **B** 1-3- vzorka 1-3, 4-5 pGEMT EBV (10⁴ a 10⁵ kópií), 6- H₂O z 1. PCR, 7- nested H₂O



Obr. 5 Diferenciálna diagnostika HSV-1 a HSV-2 v spúte pacienta č. 5 pred liečbou Herpesínom (**A**) a po liečbe (**B**) pomocou duplexnej nested PCR. 1- odber 1, 100 ng, 2- odber 1, 300ng, 3- odber 2, 100 ng, 4- odber 2, 300 ng, 5- odber 3, 100 ng, 6- odber 3, 300 ng, 7- pGEMT HSV-1, 8- pGEMT HSV-2, 9- pGEMT HSV-1+ pGEMT HSV-2, 10- H₂O, 11- Gene Ruller 1kb DNA ladder plus (Fermentas)

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Diagnostika spoločensky závažných ochorení na Slovensku, založená na moderných technológiách, ITMS:26240220058, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Kúdelová M., Rajčáni J., (2013). Herpes simplex virus. In: *Neuroviral infection*, /Singh, S. K., Ruzek D. eds./ Taylor & Francis Group/CRC Press I L1c, ISBN-10: 1439868522, Chapt 7, p. 169
- [2] Rajčáni J, Čiampor F.(2006). *Lekárska virológia*. Prvé vydanie. Bratislava: Veda, 2006, p. 582
- [3] Pellett P.E., *et al.*, (2012), In: *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses*, 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, King A. M. Q., Adams M.J., Lefkowitz E. J. /eds/ , Academic Press USA, ISBN : 978-0-12-384684-6, p. 103
- [4] Lapuníková B. (2011) Diferenciálna diagnostika herpetických vírusov. (Diplomová práca), Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p. 25
- [5] Iškyová M. (2012) Diferenciálna diagnostika ľudských alfaherpesvírusov. (Diplomová práca), Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p. 53

L-type calcium channels isoforms during neurogenesis of PC12 cells

Lucia Lichvárová, Ľubica Lacinová

Slovak Academy of Sciences, Institute of Molecular physiology and genetics, Department of transport protein, Vlárská 5, 844 43 Bratislava, Slovakia; lucia.lichvarova@savba.sk

Abstract

L-type calcium channels play fundamental role in many cellular processes including neurogenesis and synaptic plasticity. Research of L-type calcium channels was stimulated by the discovery that known L-type calcium channels isoforms possess different biophysical properties. However, no isoform-selective drug have yet been identified. Using specific siRNA we discriminate between individual isoforms $Ca_v1.2$ and $Ca_v1.3$ of the L-type calcium channels. We analyzed electrophysiological parameters of PC12 cells using patch clamp methods and expression of protein encoding the main $\alpha1$ subunit of $Ca_v1.2$ calcium channels before and after silencing transcription of specific genes by transfection with siRNA.

Key words: *voltage dependent calcium channels; $Ca_v1.2$; $Ca_v1.3$; PC12 cells; neurogenesis; siRNA;*

Introduction and aim formulation

Voltage dependent calcium channels (VDCC) are heterooligomeric complexes, which open upon membrane depolarization and conduct Ca^{2+} through cellular membranes. By mediating plasmalemmal Ca^{2+} influx they control membrane potential changes and directly regulate intracellular Ca^{2+} concentration, which serves as important intracellular signal. Three classes of VDCC are known. L-type calcium channels have four different isoforms $Ca_v1.1$ to $Ca_v1.4$. Expression of $Ca_v1.1$ to $Ca_v1.4$ is mainly restricted to skeletal muscle and the retina, respectively. $Ca_v1.2$ and $Ca_v1.3$ isoforms are expressed ubiquitously [1]. $Ca_v1.2$ and $Ca_v1.3$ channels share approximately 75% sequence homology [2]. Our aim was to analyze the contribution of $Ca_v1.2$ and $Ca_v1.3$ channels to total calcium current in differentiated PC12 cells.

Material and methods

PC12 cells were purchased from DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany) and grown in DMEM with L-glutamin, 20% fetal bovine serum and 100 U/ml penicillin/streptomycin in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% air at 37°C. After plating out into 35 mm Petri dishes (day 0) cell differentiation was initiated by supplementing the culture medium with 50 ng/ml of NGF. Transcription and expression of LTCCs and neurite outgrowth was evaluated on the day 4, 6, 9, 12 and 15 of the

NGF treatment. Expression of functional calcium channel proteins was assessed by measuring of inward calcium currents. Whole-cell configuration of the patch-clamp technique with the HEKA-10 patch-clamp amplifier (HEKA Electronic, Lambrecht, Germany) was used. The extracellular solution contained (in mM): NaCl 130, KCl 4, BaCl₂ 20, MgCl₂ 1, HEPES 10, glucose 10, pH 7.4 (with NaOH). The intracellular solution contained (in mM): CsCl 100, EGTA 14, NaCl 10, TEA-Cl 20, Mg-ATP 5, Na-GTP 0.3, HEPES 20, pH 7.4 (with CsOH). Patch pipettes were manufactured from borosilicate glass (Sutter Instrument, Novato, CA) with input resistance ranging from 1.6 to 2.0 MΩ. Expression of the *CACNA1C* gene encoding the α₁ subunit of the Ca_v1.2 channel was evaluated by RT-PCR analysis from total cell lysates of PC12 cells harvested on indicated days. Total RNA was isolated by phenol-chloroform extraction. The purity and integrity of isolated RNAs was checked spectrophotometrically on nanophotometer (IMPLEN). Reverse transcription was performed using 1.5 μg of total RNAs and Ready-To-Go-You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare) with Random Hexamer Primer (Fermentas). For subsequent PCR amplification following primers were used: *CACNA1C* forward primer 5′-GAC CGG GGA GGA CTG GAA TT-3′ and reverse primer 5′-GGC CAG CTT CTT CCT CTG CTT-3′. Forward primer for GAPDH: 5′-AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3′, reverse primer: 5′-TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3′ were used to amplify a housekeeper gene for semi-quantitative evaluation of PCR products. Each PCR program started with initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 33 (for Ca_v1.2) or 20 (for GAPDH) cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 61°C for 1 min (60°C for GAPDH) and polymerization at 72°C for 1 min. PCRs were terminated by a final polymerization at 72°C for 5 min. All PCR products were analyzed on 2% agarose gels.

Results and discussion

PC12 cells conditioned by neuronal growth factor represent a standart model of neuronal differentiation. After addition of 50 ng/ml of neuronal growth factor (NGF) at day 0 cells started morphologically differentiate into neuron-like phenotype (Figure 1).

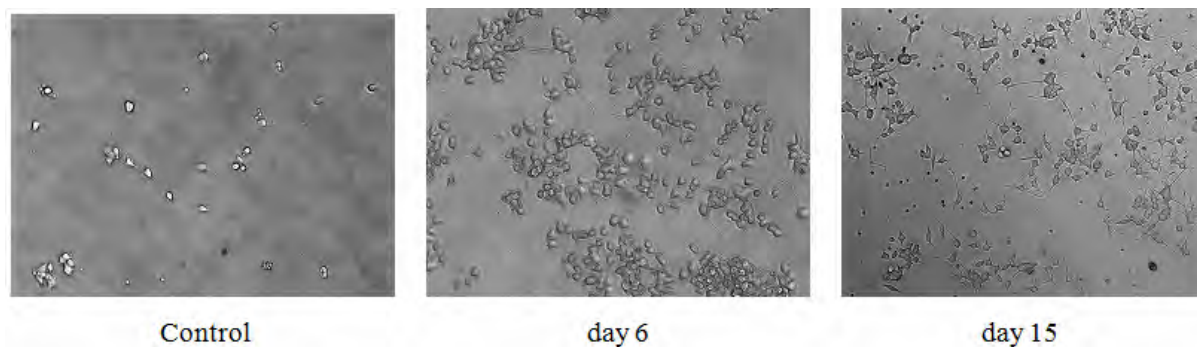


Fig. 1 Example of photographs taken from cell culture dishes maintained for control cells and cell cultivated 6 and 15 days in the presence of 50 ng/ml NGF. Photographs are representatives for 3 independent experiments. Actual size of photographed field was $920 \mu\text{m} \times 680 \mu\text{m}$

Addition of NGF caused increase in a cell size measured as a cell capacity, ($1 \mu\text{F} \approx 1 \text{cm}^2$). The average cell capacitance increased from 15 to 40 pF (Figure 2A). Expression of functional calcium channel proteins was assessed by measuring of inward calcium currents. Amplitudes of total calcium current increased sigmoidally during cell differentiation with the same time course as the cell capacity (Figure 2B and 2C).

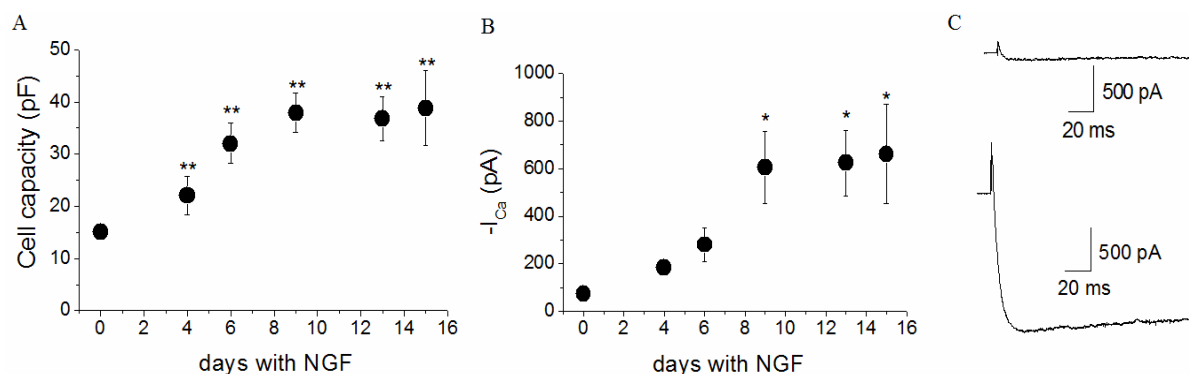


Fig. 2 A. Cell capacity measured from cells not treated with 50 ng/ml NGF (day 0; $n = 23$) and cells cultured for 4 ($n = 4$), 6 ($n = 9$), 9 ($n = 11$), 13 ($n = 11$) and 15 ($n = 9$) days with NGF. Each point represents a mean \pm SEM. ** significantly different from the day 0, $p < 0.01$. B. Total calcium current amplitude measured from cells not treated with NGF (day 0; $n = 23$) and cells cultured for 4 ($n = 4$), 6 ($n = 9$), 9 ($n = 11$), 13 ($n = 11$) and 15 ($n = 9$) days in presence of 50 ng/ml NGF. Each point represents a mean \pm SEM. * significantly different from the day 0, $p < 0.05$. C. Examples of current traces recorded at experimental days 0 and 15

Proportion of L-type calcium current in total calcium current was determined by blocking it with dihydropyridine channel blocker ($10 \mu\text{M}$ nimodipine). Proportion of L-type calcium current (Figure 3) increased with the same time course as the total calcium current.

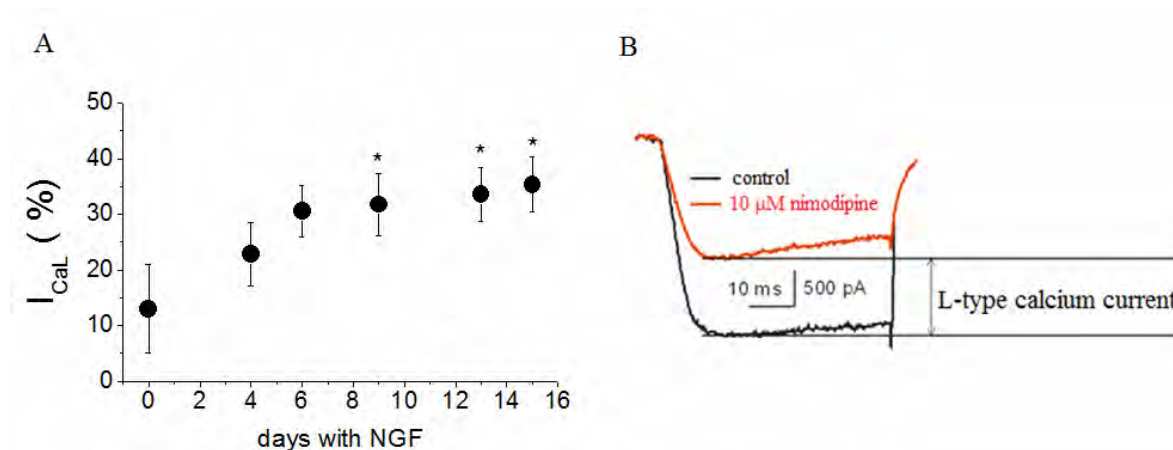


Fig. 3 A. Percentage of L-type calcium current in the total calcium current was evaluated as a percentage of total calcium current blocked by 10 μ M nimodipine. Percentage of L-type calcium current in the total calcium current. Each point represents a mean \pm SEM. Number of individual experiments at each day was (day 0; $n = 23$) and cells cultured for 4 ($n = 4$), 6 ($n = 9$), 9 ($n = 11$), 13 ($n = 11$) and 15 ($n = 9$). * significantly different from the day 0, $p < 0.05$. B. Examples of current traces recorded at experimental days as marked are shown on the right, current traces measured under the control conditions (black lines) and in equilibrium with 10 μ M nimodipine (red line). Common scale bars represent 50 ms and 500 pA

Reverse transcript PCR (RT-PCR) method for evaluation of relative amount of mRNA for specific proteins was used. Concentration of the mRNA for CACNA1C gene encoding the α_1 subunit of the $Ca_v1.2$ channel followed sigmoidal time course reaching a plateau after the day 8 (Figure 4). The same time course followed the expression of functional calcium channel proteins as is documented by sigmoidal increase of a calcium current amplitude (Figure 3).

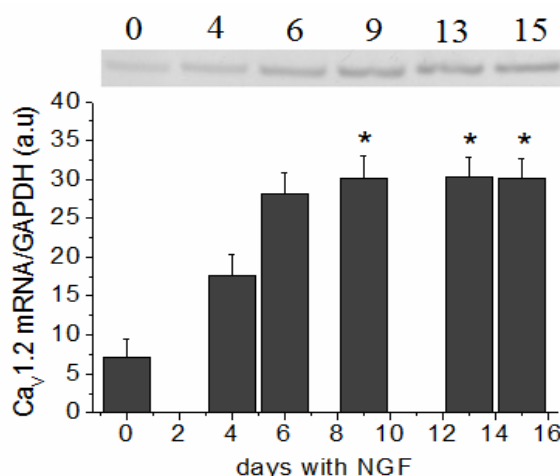


Fig.4 Concentration of mRNA for the CACNA1C gene encoding was evaluated relative to the concentration of mRNA for housekeeping GAPDH gene. An example of a gel with bands corresponding to an amplified fragment of CACNA1C mRNA is shown on the top. Day 0 represents PC12 cells not treated with NGF. Axis x represents time of cell culture in the presence of 50 ng/ml NGF. Each point represents a mean \pm SEM from 5 independent experiments. * significantly different from the day 0, $p < 0.05$

We used a mixture of three specific siRNA primers for downregulation of transcription of the *CACNA1C* gene encoding the principal subunit of the $Ca_v1.2$ channel. Transfection was done after 9 days conditioning with NGF. Relative mRNA concentration decreased with increasing siRNA concentration (Figure 5A). Downregulation of the *CACNA1C* gene was accompanied by upregulation of the *CACNA1D* gene (Figure 5B).

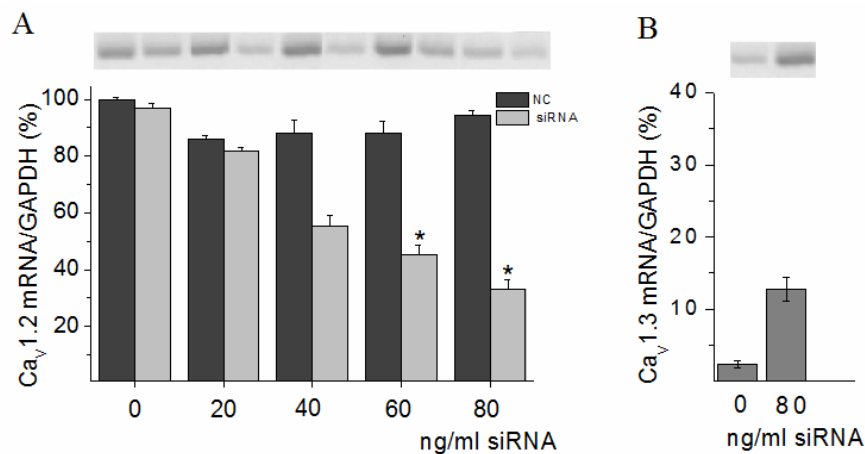


Fig. 5 A. Concentration of mRNA gene *CACNA1C* after transfection with specific siRNA primers for *CACNA1C* gene. Concentration of mRNA *CACNA1C* gene was evaluated relative to the concentration of mRNA for housekeeping *GAPDH* gene. An example of a gel with bands corresponding to fragment of *CACNA1C* mRNA is shown on the top. Control represents cells without any treatment; NC represents negative control, i.e. cells transfected with random mixture siRNA. Concentration of siRNA/transfection reagent are shown on the axis x. Each value represents a mean \pm SEM from 5 independent experiments. * significantly different from the day 0, $p < 0.05$. B. Concentration of mRNA for the *CACNA1C* gene encoding was evaluated relative to the concentration of mRNA for housekeeping *GAPDH* gene

Conclusion

NGF-driven differentiation of PC12 cells is accompanied by enhanced expression of $Ca_v1.2$ channel. The same time course followed the expression of functional calcium channel proteins as is documented by sigmoidal increase of calcium current amplitude. Downregulation of $Ca_v1.2$ mRNA was compensated by upregulation of $Ca_v1.3$ mRNA. These results confirm the importance of L-type calcium current in differentiation of PC12 cells.

Acknowledgements

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-0212-10 and VVCE-0064-07.

References

- [1] Catterall W. A. Perez-Reyes E., Snutch P. T., Striessnig J. (2005) *Pharmacol. Rev.* 57, p. 411
- [2] Singh A., Gebhart M., Fritsch R. et al. (2008) *J. Biol. Chem.* 283, p. 20733

Štúdia vplyvu metanolu a etanolu na T-typ vápnikových kanálov

Lucia Lichvárová¹, Helena Jánošíková², Ľubica Lacinová¹

¹*Slovenská akadémia vied, Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Oddelenie transportných proteínov, Vlárská 5, 844 43 Bratislava, Slovenská republika; lucia.lichvarova@savba.sk*

²*Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava*

Abstrakt

We tested the effect of ethanol and methanol on the Ca_v3.1 and Ca_v3.3 T-type calcium channels. Ethanol and methanol are used as solvents for testing effects of different water-insoluble substances on calcium channels. We used dilutions 1:1000 and 1:100, which are common in laboratory practice. Both compounds inhibited Ca_v3.1 and Ca_v3.3 channel at similar concentrations. At a dilution 1:100 ethanol inhibited 15 ± 1% of current amplitude through the Ca_v3.1 channel and methanol blocked 6 ± 1% of the current amplitude through the Ca_v3.1 channel and 9 ± 1% current amplitude through the Ca_v3.3 channel. Methanol dilution 1:1000 blocked 2.0 ± 0.5% of the Ca_v3.1 channel and 6 ± 1% of the Ca_v3.3 channel. Such a minor effect may be acceptable for electrophysiological experiment.

KLúčové slová: *napätovo závislé vápnikové kanály; Ca_v3.1 kanál; Ca_v3.3 kanál; etanol, metanol*

Úvod a formulácia cieľa

Ióny vápnika sú esenciálne pre väčšinu procesov, ktoré prebiehajú či už na úrovni bunky alebo celého organizmu. Vstup vápnika do vnútra bunky cez napätovo závislé vápnikové kanály je aktivovaný zmenou transmembránového napätia a riadi mnohé životne dôležité funkcie. V súčasnosti je známych 10 typov VDCC, ktoré sa navzájom líšia svojimi elektrofyziologickými a farmakologickými vlastnosťami a sekvenciou aminokyselín. Štúdium farmakologických vlastností, permeability jednotlivých kanálov a ich kinetických vlastností bolo umožnené rozvinutím metódy patch clamp [1,2], ktorá zároveň zjednodušila klasifikáciu napätovo závislých kanálov. Napätovo závislé vápnikové kanály rozdeľujeme na dve základné skupiny: kanály aktivované vysokým napätím a aktivované nízkym napätím [3]. Nízkonapätové vápnikové kanály sa aktivujú už pri -70mV, čo je o 30 – 40 mV nižšie, ako je prah aktivácie HVA vápnikových kanálov.

Kanály aktivované nízkym napätím dostali pomenovanie T-typ podľa slov tiny (maličký) a transient (prechodný) [4]. T-typ vápnikových kanálov sa vyznačuje rýchlou inaktíváciou, pomalou deaktiváciou a nízkou jednotkovou vodivosťou [5]. V súčasnosti používané blokátory vápnikových kanálov predstavujú veľmi rôznorodú skupinu látok, zaradenú do širokého spektra ATC skupín, ako napr.: antihypertenzíva, antiepileptiká, antipsychotiká, anestetiká, barbituráty, benzodiazepíny. Voči toxínom pôsobiacich na N-typ

VACC sú kanály T-typu úplne rezistentné, blokátory L-typu ich blokujú len čiastočne. Sú špecificky inhibované kurtoxínom, izolovaným zo škorpióna, a čiastočne mibefradilom. Ako jediný organický blokátor navrhnutý pre klinické využitie sa používal mibefradil. Mibefradil inhibuje okrem LVA aj HVA, ale s menšou afinitou [6]. Tieto látky nie sú rozpustné vo vode, a preto sú rozpúšťané v metanole, etanole alebo dimetylsulfoxide.

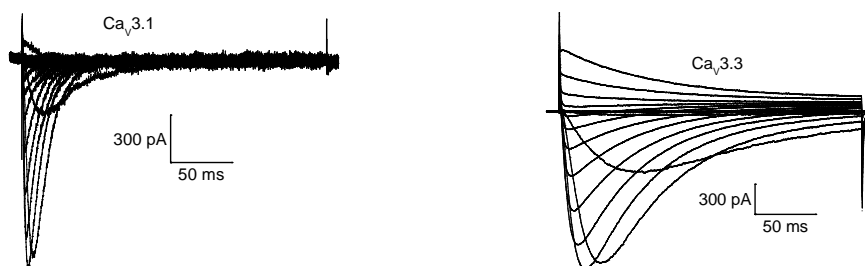
Cieľom našej práce bolo porovnať vplyv rozpúšťadiel metanolu a etanolu na T typ vápnikových kanálov, určiť jeho maximálnu bezpečnú koncentráciu a určiť, aká koncentrácia rozpúšťadla obsiahnutá vo finálnej koncentrácii testovanej látky môže spôsobovať artefakty na meraných vápnikových prúdoch.

Materiál a metódy

Bunková línia HEK 293 permanentne transfektovaná plazmidom obsahujúcim cDNA, kódujúcim α 1I 40. podjednotku (Cav3.3) T-typu nízkonapäťového vápnikového kanálu predstavuje expresný systém izolovaný z epitelu ľadvín ľudského embrya („human embryonic kidney“). Línia bola zakúpená z DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH) a uchovávaná pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rozmrazené bunky sme kultivovali v kultivačných fľašiach v rastovom médiu EMEM (Eagle's modified essential medium), ktoré obsahuje 10% fetálneho hovädzieho sérového albumínu, 100 U/ml penicilínu a streptomycínu spolu s 0,04% antibiotika G-418 v inkubátore pri teplote $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 5% atmosfére oxidu uhličitého a 95% vzduchu. Pred vysadením buniek na krycie sklíčka boli bunky disociované trypsínom a triturované. Na elektrofyziologické experimenty sme používali bunky 1-2 dni po vysadení na sklíčka pokryté poly-L-lyzínom. Pred samotným meraním sme presunuli sklíčko s bunkami z rastového média do experimentálnej Petriho misky, ktorá obsahovala kúpeľový roztok s obsahom 130 mM CsCl, 5 mM Na-ATP, 10 mM TEA-Cl, 10 mM HEPES, 10 mM EGTA, 5 mM MgCl₂. pH 7,4 (NaOH). Zloženie pipetového roztoku bolo 135 mM NaCl, 10 mM HEPES, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM CsCl. pH 7,4 pipetového roztoku bolo upravené pomocou CsOH. Osmolarita roztokov bola meraná osmometrom Gonotec – Osmomat030 a upravená na hodnoty blízke 300 mosm pomocou glukózy. Vápnikové prúdy boli zaznamenávané metódou whole cell, prostredníctvom amplifikátora HEKA 10 (HEKA Electronic, Lambrecht, Nemecko). Pipety z borosilikátové sklo (Sutter Instrument, Novato, CA) sme pripravovali na horizontálnom dvojhlavom elektromagnetickom puleri (Zeitz Instruments GmbH, München).

Výsledky a diskusia

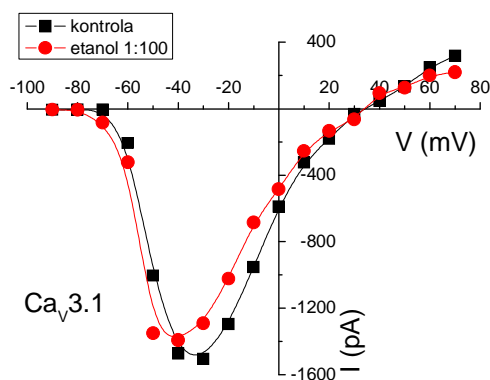
Prúd v bunkách, exprimujúcich $Ca_v3.1$ a $Ca_v3.3$ kanály sme aktivovali sériou 250 ms dlhých depolarizačných pulzov s amplitúdami od -90 mV do $+70$ mV z pokojového napätia -100 mV (Obr. 1). Časový interval medzi jednotlivými pulzmi bol 5 s.



Obr 1 Ukážky prúdových stôp nameraných z $Ca_v3.1$ (vľavo) a $Ca_v3.3$ (vpravo) vápnikového kanála. Prúd sme aktivovali každých 5 s 250 ms dlhými depolarizačnými pulzami z pokojového napätia -100 mV na napätia -90 mV do $+70$ mV

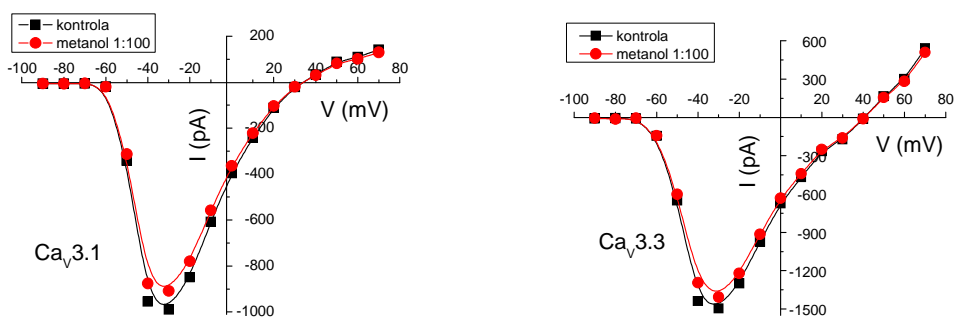
Kapacita meraných $Ca_v3.1$ buniek bola v rozmedzí od 13 do 17 pF. Kapacita meraných $Ca_v3.3$ buniek bola v rozmedzí od 11 do 13 pF. Vyhodnocovali sme prúdovo-napät'ové závislosti (I-V) merané podľa protokolu charakterizovaného na Obr. 1 v prítomnosti a neprítomnosti etanolu alebo metanolu. Pre jednotlivé IV krivky sme vyhodnocovali amplitúdy vstupných prúdov aktivovaných jednotlivými depolarizačnými pulzami.

Etanol v riedení 1:100 inhiboval 15 ± 1 % amplitúdy prúdu cez $Ca_v3.1$ kanál a mierne posúval IV závislosť doľava (Obr. 2).



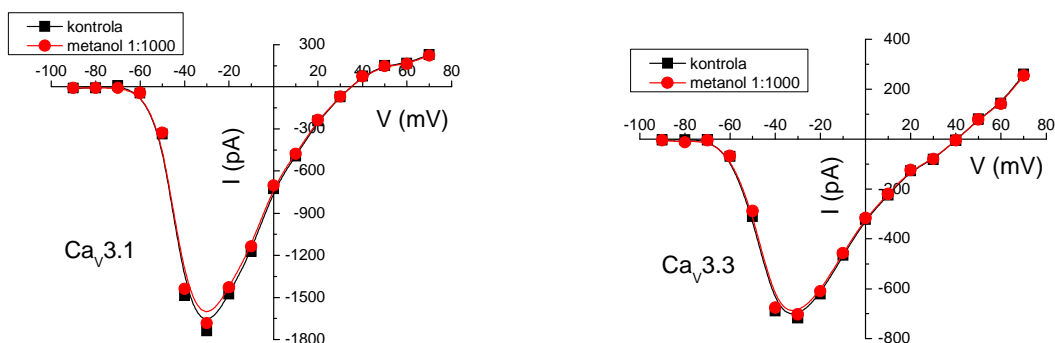
Obr. 2. IV krivka nameraná podľa protokolu z Obr. 1 z bunky exprimujúcej $Ca_v3.1$ kanál v kontrolných podmienkach (čierne kolieska) a v prítomnosti etanolu riedeného 1:100 (červené kolieska)

Metanol v rovnakom riedení 1:100 blokoval 6 ± 1 % amplitúdy prúdu cez $Ca_v3.1$ kanál a 9 ± 1 % amplitúdy prúdu cez $Ca_v3.3$ kanál (Obr. 3).



Obr. 3. Vľavo: IV krivka nameraná podľa protokolu z Obr. 1 z bunky exprimujúcej $Ca_v3.1$ kanál v kontrolných podmienkach (čierne kolieska) a v prítomnosti metanolu riedeného 1:100 (červené kolieska). Vpravo: IV krivka nameraná podľa protokolu z Obr. 1 z bunky exprimujúcej $Ca_v3.3$ kanál v kontrolných podmienkach (čierne kolieska) a v prítomnosti metanolu riedeného 1:100 (červené kolieska)

Pri vyššom riedení 1:1000 metanol blokoval $2,0 \pm 0,5$ % amplitúdy prúdu cez $Ca_v3.1$ kanál a 6 ± 1 % amplitúdy prúdu cez $Ca_v3.3$ kanál (Obr. 4).



Obr. 4. Vľavo: IV krivka nameraná podľa protokolu z Obr. 1 z bunky exprimujúcej $Ca_v3.1$ kanál v kontrolných podmienkach (čierne kolieska) a v prítomnosti metanolu riedeného 1:1000 (červené kolieska). Vpravo: IV krivka nameraná podľa protokolu z Obr. 1 z bunky exprimujúcej $Ca_v3.3$ kanál v kontrolných podmienkach (čierne kolieska) a v prítomnosti metanolu riedeného 1:1000 (červené kolieska)

Záver

Etanol a metanol sú často používané ako rozpúšťadlá pri testovaní účinku rôznych látok na vápnikové kanály. My sme analyzovali ich účinky na $Ca_v3.1$ a $Ca_v3.3$ vápnikové

kanály. Zistili sme, že obe látky pôsobia ako blokátory a ich účinok na oba kanály je podobný. Ani jedno z rozpúšťadiel nie je vhodné v riedení 1:100, kedy nimi vyvolaná inhibícia kanálov môže skresliť výsledky experimentov. V riedení 1:1000 je použitie metanolu bezpečné najmä v prípade $Ca_v3.1$ kanála. Metanol je pre elektrofyziológické experimenty vhodnejší, pretože etanol okrem inhibície amplitúdy prúdu mení aj napäťovú závislosť aktivácie prúdu.

Pod'akovanie

Práca bola podporená agentúrou pre vedu a výskum kontraktom APVV-0212-10 a VVCE-0064-07.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Neher E., Sakmann B. (1976) *Nature*, 260(5554), p.799
- [2] Hamill O. P., Marty A., Neher E., et al. (1981) *Pflugers Arch.* 391(2), p. 85
- [3] Hagiwara S. (1975) *Membranes.* 3, p. 359
- [4] Nowycky M. C., Fox, A. P., Tsien R.W. (1985) *Nature.* 316, p. 440
- [5] Lacinova L. (2005) *Gen. Physio. and Biophysics.* 24, p. 3
- [6] Moosmang S., Haider N., Bruderl B., et al. (2006) *Circ. Res.* 98(1), p. 105

Odvodenie kalusovej kultúry zástupcov dvojkličnolistových a jednokličnolistových rastlín v podmienkach *in vitro*

Denis Líška, Zuzana Lukačová, Alexander Lux

*Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyziológie rastlín, Mlynská dolina
842 15 Bratislava 4, Slovenská republika; liska.denis@gmail.com*

Abstrakt

Peanut (*Arachis hypogaea* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L.) are important commodities used in agriculture and pharmaceutical industry. Specification of optimal conditions for *in vitro* cultivation of these species is important both for breeding and experiments. Specific conditions are required for successful cultivation of individual species. It is the phytohormones combination that makes the specialized plant cell to dedifferentiate or to differentiate in some way. The endogenous factors determined by selection of the explant play also an important role in the mentioned processes. In the present work suitable conditions for callus formation and its *in vitro* cultivation were established for both species.

KLúčové slová: 2,4-D; *Arachis hypogaea*; BAP; explantát; *in vitro*; kalus; *Sorghum bicolor*.

Úvod a formulácia cieľa

Podzemnica olejná (*Arachis hypogaea* L.) sa pôvodne pestovala v Južnej Amerike, predovšetkým v tropických a subtropických oblastiach. V súčasnosti zasahuje jej rozšírenie aj do mierneho pásma Európy. Je to bylina dorastajúca do výšky 20 - 40 cm [1]. Využitie podzemnice je nielen v potravinárskom priemysle (semeno podzemnice olejnej obsahuje množstvo olejov a bielkovín, vitamíny B a E, stopy provitamínu A a vitamínov C a D), ale aj vo farmaceutickom priemysle na výrobu liečiv proti Alzheimerovej chorobe [2], výrobe masť a prípravkov na vlasy [1]. I toto sú dôvody, prečo sa výskum orientuje na túto kultúrnu plodinu. Hlavným cieľom je získať kultivary odolné voči nepriazni počasia, kontaminácii pôdy a ďalším biotickým a abiotickým stresom prostredia s ohľadom na výnos.

Cirok je obilnina tropických a subtropických oblastí. Jeho pestovanie zasahuje aj do mierneho pásma Európy a Ameriky. Je to rastlina vyžadujúca vyššie teploty, môže však rásť aj v suchších pôdach. Z hľadiska svetovej produkcie sa zaraďuje na štvrté miesto za pšenicu, ryžu a kukuricu. Semeno ciroku obsahuje veľké množstvo sacharidov. Cirok má široké využitie. V Ázii a Afrike sa používa predovšetkým ako potravinu, zatiaľ čo v Európe a Amerike sa používa skôr ako krmovina [3, 4]. Pestovateľské plochy tejto plodiny sa i v našom podnebnom pásme neustále rozširujú.

Základom pre optimálny rast a vývin *in vitro* kultúry je zabezpečiť vhodné fyzikálne podmienky kultivácie (teplota, svetlo), ako aj vhodnú koncentráciu vybraných fytohormónov

[5, 6]. Vhodnosť zvolenia uvedených faktorov odráža ako medzidruhová, tak aj vnútrodruhová špecificitu rastlín.

Naším hlavným cieľom bolo optimalizovať podmienky sterilizácie explantátu, iniciácie a dlhodobej kultivácie kalusovej kultúry podzemnice a ciroku s dôrazom na výber najvhodnejšieho explantátu a koncentráciu a druh rastových látok. Za hlavný prínos predloženej práce považujeme úspešné odvodenie a špecifikáciu podmienok pre udržiavanie kalusovej kultúry dôležitých zástupcov dvojkličnolistových a jednokličnolistových rastlín.

Materiál a metódy

V práci sme použili japonský kultivar podzemnice olejnej (*Arachis hypogaea* L., cv. Chibahandachi). Semená sme zavinuli do navlhčeného filtračného papiera a nechali vyklíčiť v termostate pri teplote 25 ± 1 °C počas 5 dní. Následne sme mladé rastliny vysadili do kvetináčov s perlitom, zalievali Knopovým živným roztokom a pestovali pri teplote 25 ± 1 °C vo svetlej kultivačnej komore pri 16 hodinovom svetelnom režime a intenzite svetla $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR. Z rastlín sme odobrali najmladšie listy, ktoré sme sterilizovali 10 % roztokom Savo počas 10 min, 10 min premývali v sterilnej destilovanej vode, 30 s premývali v 50 % etanole, 2 min v 0,1 % HgCl_2 a napokon premyli v sterilnej destilovanej vode. Listy sme narezali na malé segmenty a poukladali na kultivačné MS médium [7] s obsahom 2 mg 2,4-D/L a 2 mg BAP/L (MS1).

Semená sudánskeho kultivaru ciroku (*Sorghum bicolor* L., cv. Gadambalia) sme sterilizovali podľa Naqui et al. (2002) [8] s modifikáciou. Na semená namočené vo vode 3 hodiny sme nechali pôsobiť 100 % Savo po dobu 30 minút. Po premývaní boli semená až do výsevu uložené v sterilnej destilovanej vode. Použili sme rovnaké kultivačné MS médium [7], ale s pridaním 2 mg 2,4-D/L, 0,5 mg BAP/L a 0,5 mg CuSO_4/L (MS4), pH média sme v oboch prípadoch upravili na 5,8.

Kultivácia rastlinného materiálu po dobu 6 – 8 týždňov prebiehala v tmavej kultivačnej komore pri teplote 25 °C. Získané kalusy sme následne preniesli na udržiavacie MS médiá (MS1, resp. MS4), ako tomu bolo v prípade iniciačného média.

Sterilizácia nástrojov, MS média a príslušenstva bola v autokláve pri tlaku 1,5 MPa po dobu 20 min. Práca prebiehala v aseptických podmienkach flowboxu Fatran.

Výsledky a diskusia

Po vypestovaní dostatočného množstva rastlín podzemnice olejnej (*Arachis hypogaea* L.) v laboratórnych podmienkach (obr. 1) sme optimalizovali postup sterilizácie listov a ich

prenos do *in vitro* kultivačných podmienok. Úspešnosť sterilizácie bola pri podzemnici 92 %, pri semenách ciroku 66 %. Klíčivosť si pri ciroku zachovali takmer všetky semená. Všetky pokusy s oboma rastlinnými druhmi sme opakovali 6 - 7 krát.



Obr. 1 Podzemnica olejná (*Arachis hypogaea* L., cv. Chibahandachi) – rastliny pestované v perlite vo svetlej kultivačnej komore



Obr. 2 Podzemnica olejná (*Arachis hypogaea* L., cv. Chibahandachi) – pletivové kultúry na MS médiu pestované v tmavej kultivačnej komore



Obr. 3 Cirok (*Sorghum bicolor* L., cv. Gadambalia) – pletivové kultúry na MS médiu pestované v tmavej kultivačnej komore

V ďalšej časti práce sme sa venovali vplyvu fytohormónov na proces kalogenézy. Zistili sme, že uvedené koncentrácie 2 mg 2,4-D/L a 2 mg BAP/L kultivačného MS1 média sa osvedčili pri študovanom kultivare pri listoch. Pri podzemnici sme pozorovali tvorbu kalusov takmer z každého listu (obr. 2). Úspešnosť bola 97 - 100 % zo všetkých vysterilizovaných listov. Pri ciroku sme zistili, že pre bazálnu časť koleoptily daného kultivaru je optimálna koncentrácia fytohormónov 2 mg 2,4-D/L a 0,5 mg BAP/L

kultivačného MS4 média za súčasného pridania 0,5 mg CuSO₄/L (obr. 3). Z celkového počtu vyklíčených embryí sme získali len 8 - 11 % kalusov.

Záver

Experimentálne sme potvrdili rozdiely medzi dvojkličnolistovými a jednokličnolistovými rastlinami v zakladaní kalusových kultúr. Pri ciroku (jednokličnolistová rastlina) bola úspešnosť nízka (8 - 11 %). Lepšie výsledky sme dosiahli pri podzemnici olejnej (dvojkličnolistová rastlina), a to 97 - 100 % vytváranie kalusu. Úspešnosť sterilizácie bola pri ciroku 66 %, pri podzemnici 92 %.

Z experimentov vyplýva, že na indukciu procesu kalogenézy z ktoréhokoľvek rastlinného druhu je potrebné optimalizovať spôsob a dĺžku sterilizácie explantátu, ako aj prispôbiť danému procesu jednotlivé zložky živného média, predovšetkým koncentráciu fytohormónov.

Získanie kalusovej kultúry podzemnice olejnej (*Arachis hypogaea* L.) a ciroku (*Sorghum bicolor* L.) tvorí dôležitý medzistupeň v našom ďalšom výskume. Budeme ich využívať pre zakladanie suspenzných kultúr, na ktorých budeme študovať vplyv ťažkých kovov na úrovni jednotlivých buniek.

Pod'akovanie

Vďaka patrí Dr. Jun Abemu z Univerzity v Tokiu za poskytnutie semien podzemnice olejnej (*Arachis hypogaea* L., c.v. Chibahandachi).

Tento projekt bol podporený grantmi 1/0817/12 zo Slovenskej grantovej agentúry VEGA, COST FA 0905 z Agentúry na podporu výskumu a vývoja APPV-0140-10.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Mladá J., Procházka F. (1987) Atlas cizokrajných rastlin. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, p. 248
- [2] Vingtdeux V., Dreses-Werringloer U., Zhao H., et al. (2008) J. Neurosci. 9, p. 6
- [3] Valíček P. et al. (2002) Užitékové rostliny tropů a subtropů. Academia, Praha, p. 86
- [4] Domin K. (1944) Užitékové rostliny. Vilínek, Praha, p. 468-502
- [5] Pierik R. L. M. (1985) *In vitro* Culture of Higher Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 348
- [6] Collin H. A., Edwards S. (1998) Plant Cell Culture. Bios Scientific Publishers, Oxford, UK, p. 158

- [7] Murashige T., Skoog F. (1962) *Physiol. Plant.* 15, p. 473
- [8] Naqui S. M. S., Yasmin T., Rashid H., Chaudary Z., Quraishi A. (2002) *Pak. J. Bot.* 5, p. 956

Sledovanie potenciálnych bioprotektívnych účinkov emodínu

Dušan Loderer, Zuzana Sňahničanová, Andrea Ševčovičová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; dusanloderer@gmail.com

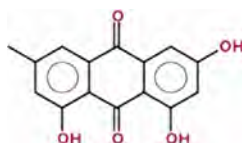
Abstrakt

Emodin is a compound occurring mainly in the roots and stems of plants belonging to the family *Polygonaceae*. It has been used in traditional Chinese medicine for the treatment of gallstones, inflammation, hepatitis and other serious diseases. Multiple tests exist to monitor its protective effects. We used DNA topology test to determine the chelating ability of biologically active compounds and antioxidant activity was detected by reducing power assay.

Kľúčové slová: emodín; DNA topology assay; reducing power assay

Úvod a formulácia cieľa

Emodín (1,3,8-trihydroxy-6-metylantrachinón) (obr.1) patrí medzi antrachinóny, polyfenolové látky so širokým spektrom biologických účinkov. Nachádza sa v koreňoch a stonkách viacerých druhov rastlín a je často využívaný v tradičnej čínskej medicíne.



Obr. 1 Chemická štruktúra emodínu [1]

Najväčšie množstvá emodínu boli zistené v rastlinách z čeľade *Polygonaceae*. Druhý najčastejší zdroj týchto látok je *Aloe vera*, z ktorej sa získava aloemodín [1].

V súčasnej dobe je emodín pomerne často študovanou látkou pre množstvo jeho biologických účinkov, od laxatívneho vyplývajúceho z jeho chemickej štruktúry [2] až po potenciál vo využívaní v liečbe nádorových ochorení. Štúdie na potkaních modeloch preukázali, že dlhodobé užívanie laxatív na báze antrachinónov spôsobuje vznik tumorov v gastrointestinálnom trakte, čo viedlo k ďalším štúdiám jeho mutagénneho, genotoxického a karcinogénneho potenciálu [3]. Mutagénny účinok emodínu závisí od jeho aktivácie mikrozomálnymi enzýmami a tiež od systému, na ktorom je študovaný. Amesov test mutagenity na baktérii *Salmonella typhimurium* preukázal mutagénny potenciál aj v prípade metabolickej aktivácie aj v prípade bez pridania enzýmov [4]. V prípade použitia cicavčích buniek *in vitro* aj *in vivo* potkaních modelov nedošlo k žiadnemu mutagénnemu ani

genotoxickému efektu [5]. Tieto výsledky boli potvrdené aj mikronukleovým testom [6]. Okrem iného boli dokázané aj antimikrobiálne účinky voči vybraným mikroorganizmom ako napríklad *Helicobacter pylori* [7] a tiež protizápalové účinky, mechanizmom inhibície transkripčného faktora NF- κ B [8].

Poznatok, že emodín je schopný v nádorových bunkách cicavcov špecificky inhibovať nadexpresiu onkogénov pomocou modulácie bunkového cyklu otvára možnosti jeho využitia v protinádorovej liečbe. Ďalšie štúdie odhalili rôzne mechanizmy indukcie apoptózy v závislosti od druhu emodínu. V súčasnosti sa využíva hlavne v kombinovanej chemoterapii so štandardnými liečivami s cieľom znížiť toxicitu a zvýšiť účinnosť protinádorovej liečby. Vďaka jeho chinónovej štruktúre môže emodín interferovať s elektróntransportným reťazcom a meniť tým redoxný potenciál v nádorových bunkách, čím utlmuje nádorové bujnenie. Jeho prídavný inhibičný efekt v procese angiogenézy ako aj v procese regulácie vytvárania metastáz, robí z emodínu vážneho kandidáta na liek, ktorý by priniesol v boji s rakovinou a nádorovými ochoreniami veľký prínos [1].

Naším cieľom bolo zistiť, či emodín dokáže ochrániť DNA pred vznikom reťazcových zlomov a zároveň stanoviť jeho chelatačné vlastnosti pomocou DNA topologického testu. Ďalším cieľom bolo stanovenie antioxidačného potenciálu testovanej látky *reducing power* testom.

Materiál a metódy

Na určenie potenciálneho protektívneho účinku emodínu *in vitro* sme použili *DNA topology assay*. Táto metóda je založená na sledovaní zmien v topológii plazmidu, ktorá sa odrazí v zmene rýchlosti migrácie plazmidovej DNA pri elektroforetickej separácii v agarózovom géli. Princípom testu je vyvolanie tvorby reaktívnych foriem kyslíka (ROS) Fentonovou reakciou na základe prítomnosti Fe^{3+} v reakčnej zmesi. Reaktívne radikály, predovšetkým hydroxylový radikál $\text{OH}\cdot$, indukujú tvorbu jedno a dvojlákových zlomov DNA. V prípade vzniku jednovlákového zlomu (SSB) na molekule plazmidovej DNA (pDNA) dôjde k zmene v jej konformácii zo superšpiralizovanej formy na relaxovanú cirkulárnu formu, čo sa prejaví spomalením jej migrácie v géli. Ak ROS indukujú vznik dvojlákových zlomov (DSB), topológia plazmidovej DNA sa zmení na lineárnu formu, ktorá sa pohybuje pri elektroforetickej separácii najpomalšie (obr.2) [9-11].

V prípade potvrdenia potenciálneho protektívneho účinku testovanej látky dôjde k zníženiu množstva poškodení DNA v porovnaní s pozitívnou kontrolou v dôsledku vychytávania iónov železa touto látkou.



Obr. 2 Rôzna elektroforetická mobilita konformačných foriem a denaturovanej plazmidovej pBR322

Ako negatívnu kontrolu sme použili samotný plazmid bez pridania $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a emodínu, pozitívnu kontrolou bol plazmid poškodený v dôsledku prítomnosti $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ v reakčnej zmesi. Pri testovaní potenciálneho protektívneho účinku emodínu sme použili koncentrácie 0,05mM, 0,025mM, 0,005mM, 0,0025mM, 0,0005mM a 0,00025mM. Zásobný roztok s koncentráciou 100mM sme pripravili rozpustením 250mg emodínu v 10ml DMSO.

Použité chemikálie:

5x TBE

fosfátový tlmivý roztok (PB), pH ~ 7,0 (zásobný roztok 1 mol.dm⁻³)

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Lachema) (zásobný roztok 10 mmol.dm⁻³)

Loading buffer (Sigma) (zásobný roztok 10x)

Plazmid pBR322 (New England Biotechnologies Ltd, UK) (zásobný roztok 1 µg. ml⁻¹)

1,5% agarózový gél

GelRed (Biotium)

Reakčnú zmes sme pripravili podľa tabuľky 1, pričom jednotlivé zložky sme pridávali v poradí: voda, tlmivý roztok, extrakt, Fe^{2+} a plazmid pBR322.

Tab č. 1: Príprava reakčnej zmesi DNA topology assay. E4 - 0,05 mM, E5*- 0,0025 mM, E4*- 0,025 mM, E6 - 0,0005 mM, E5 - 0,005 mM, E7 – 0,0025 mM

	Voda (µl)	tlmivý roztok (µl)	pBR (µl)	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (µl)	emodín (µl)
1	7	1	2	-	-
2	6,8	1	2	0,2	-
3	6	1	2	-	1µ-E4
4	6	1	2	-	1µ-E4*
5	6	1	2	-	1µ-E5
6	6	1	2	-	1µ-E5*
7	6	1	2	-	1µ-E6
8	6	1	2	-	1µ-E7
9	5,8	1	2	0,2	1µ-E4
10	5,8	1	2	0,2	1µ-E4*

11	5,8	1	2	0,2	1 μ -E5
12	5,8	1	2	0,2	1 μ -E5*
13	5,8	1	2	0,2	1 μ -E6
14	5,8	1	2	0,2	1 μ -E7

Zmes sme inkubovali 20 minút pri teplote 37°C. Po centrifugácii sme vzorky naniesli na gél a elektroforeticky separovali 1-2 hodiny pri 60V.

Reducing power assay

Antioxidačnú aktivitu testovanej látky môžeme určiť na základe jej redukčnej sily, ktorá vyplýva zo schopnosti pôsobiť ako elektrónový donor, teda neutralizovať oxidované medziprodukty [12]. *Reducing power assay* je test založený na redukcii Fe³⁺ ferikyanidových komplexov na Fe²⁺ komplexy v prípade antioxidačnej aktivity skúmanej látky. V závislosti od stupňa redukcie sa mení východisková žltá farba sledovanej vzorky na odtiene modro-zelenej až modrej farby rôznej intenzity [13]. Redukčnú silu môžeme stanoviť meraním absorbancie vzorky pri vlnovej dĺžke 700nm. Zvýšená absorbancia je výsledkom zvýšenej redukčnej sily danej látky.

Ako negatívnu kontrolu sme použili iba reakčnú zmes bez pridania skúmanej látky. Pri tomto teste sme použili emodín s koncentráciami: 100mM, 50mM, 10mM, 1mM, 0,1mM a 0,01mM a ako pozitívnu kontrolu kyselinu galovú s rovnakými koncentráciami, ktorá bola zároveň aj referenčnou vzorkou. Zásobný roztok emodínu s koncentráciou 100mM sme pripravili rozpustením 250mg emodínu v 10ml DMSO.

Použité chemikálie:

- fosfátový tlmivý roztok, pH ~ 6,6 (zásobný roztok 0,2 mol.dm⁻³)
- ferokyanid [K₃Fe(CN)₆] (zásobný roztok 10 g.l⁻¹)
- kyselina trichlóroctová (zásobný roztok 100 g.l⁻¹)
- chlorid železitý (FeCl₃) (zásobný roztok 1 g.l⁻¹)

Do skúmaviek sme napipetovali roztoky podľa tabuľky 2.

Tab. 2: Príprava reakčnej zmesi pre *reducing power assay*

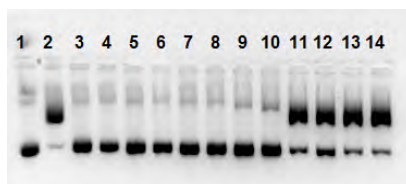
	Objem extraktu (μl)	Pufor (μl)	Ferikyanid draselný (μl)
E1 100mM	50-E1*	650	500
E2 50mM	50-E2*	650	500
E3 10mM	10-E2*	690	500
E4 1mM	50-E4*	650	500
E5 0,1mM	5-E4*	695	500
E6 0,01mM	10-E5*	690	500
G1 100mM	50-G1*	650	500
G2 50mM	50-G2*	650	500

G3 10mM	10-G2*	690	500
G4 1mM	50-G4*	650	500
G5 0,1mM	5- G4*	695	500
G6 0,01mM	10-G5*	690	500
NK	0	700	500

Po inkubácii 20 min. pri teplote 50°C sme pridali 500 µl kyseliny trichlóroctovej do každého variantu a následne sцентриfugovali 10 min, 3000 otáčok za minútu. Z každej skúmavky sme odobrali 500 µl z vrchnej fázy do čistej skúmavky a pridali po 500 µl vody a 100 µl FeCl₃. Nakoniec sme spektrofotometricky odmerali absorbanciu každého variantu pri 700nm.

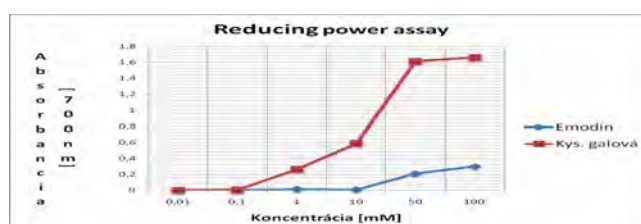
Výsledky a diskusia

Výsledok DNA topology testu je znázornený na obrázku 3.



Obr.3 Výsledky elektroforézy v agarózovom géli- DNA topology test. 1: negatívna kontrola- pBR, 2: pozitívna kontrola- pBR+ Fe²⁺, 3: pBR+ 0,05mM emodín, 4: pBR+0,025mM emodín, 5: pBR+0,005mM emodín, 6: pBR+0,0025mM emodín, 7: pBR+0,0005mM emodín, 8: pBR+ 0,00025mM emodín, 9: pBR+Fe²⁺ +0,05mM emodín, 10: pBR+Fe²⁺ + 0,025mM emodín, 11: pBR+Fe²⁺ + 0,005mM emodín, 12: pBR+Fe²⁺ + 0,0025mM emodín, 13: pBR+Fe²⁺ + 0,0005mM emodín, 14: pBR+Fe²⁺ + 0,00025mM emodín.

Prvá dráha reprezentuje kontrolu, kedy sa v reakčnej zmesi nachádza neporušený plazmid superšpiralizovanej formy. Dráha 2 je pozitívna kontrola, kde prítomnosť Fe²⁺ katiónov spôsobuje tvorbu zlomov na plazmidovej DNA a tým zmenu jej konformácie na linearizovanú formu. Dráhy 3-8 predstavujú prípad, kedy boli pridávané do reakčnej zmesi rôzne koncentrácie emodínu. Ani v jednom prípade nedošlo k negatívnemu vplyvu skúmanej látky na plazmid pBR 322. V dráhach číslo 9 a 10 sme odhalili protektívny účinok emodínu s koncentráciou 0,05mM, respektíve 0,025mM, pri simultánnom pôsobení s Fe²⁺. Pri nižších koncentráciách emodínu k protektívnemu účinku nedochádzalo (dráhy 11 až 14).



Obr.4 Redukčná sila emodínu v porovnaní s kyselinou gálovou

Výsledok *reducing power* testu (obr.4) preukázal len slabú antioxidačnú aktivitu, nakoľko pri najvyššej koncentrácii nebol schopný efektívne konvertovať Fe^{3+} komplexy na Fe^{2+} komplexy v porovnaní s kyselinou gálovou, ktorá bola referenčnou vzorkou.

Záver

Naše doterajšie výsledky ukázali, že emodín vykazuje chelatačné účinky a teda zabraňuje tvorbe reaktívnych foriem kyslíka, ktoré by mohli reagovať s pDNA a tvoriť jej poškodenie vo forme reťazcových zlomov. Zároveň sme určili jeho slabé antioxidačné schopnosti na základe stanovenia redukčnej sily ako schopnosti redukovať Fe^{3+} ferikyanidové komplexy na Fe^{2+} komplexy. V budúcnosti sa chceme zamerať na testovanie ďalších vlastností emodínu využitím kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* ako modelového organizmu.

Pod'akovanie

Táto práca bola finančne podporená grantmi APVV-0040-10, VEGA 1/0025/11 a SK-BG-0006-10, BGSK/206.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Hsu S., Chung J. (2012) *BioMedicine*. 2, p. 108
- [2] Mueller S. O., Stopper H. (1999) *Biochem. Biophys. Acta*. 1428, p. 406
- [3] Schorkhuber M., Richter M., Dutter A., et al. (1998) *Eur. J. Cancer*. 34, p.1091
- [4] Wehner F. C., Thiel P. G., du Rand M. (1979) *Appl. Environ. Microbiol.* 37, p.658
- [5] Bruggeman I.M., van der Hoeven J. C. (1984) *Mutat. Res.* 138, p.219
- [6] Mengs U., Krumbiegel G., Volkner W. (1997) *Mutat. Res.* 393, p. 289
- [7] Wang H. H., Chung J. G. (1997) *Curr. Microbiol.* 35, p. 262
- [8] Li H. L., Chen H. L., Li H., et al. (2005) *Int. J. Mol. Med.* 16, p. 41
- [9] De Mattos J. C. P., Dantas F. J. S., Caldeira-de-Araujo, A., et al. (2004) *Biochem. Mol. Biol. Education*. 32, p. 254
- [10] Rauko P., Novotný L., Balážová E. (1993) *Journal of Biochemistry*. 25, p. 1475
- [11] Čipák L., et al. (2001) *Toxicology in vitro*. 15, p. 677
- [12] Chanda S., Dave R. (2009) *African Journal of Microbiology Research*. 3, p. 981
- [13] Ferreira C. F. R. I. (2007) *Food Chemistry*. 100, p. 1511

Nová stabilná bunková línia exprimujúca interleukín-29 Vero/IL-29 ako nástroj na štúdium antivírusového účinku IL-29 voči herpetickým vírusom

Katarína Lopušná¹, Ingeborg Režuchová², Marcela Kúdelová², Anna Ohradňanová², Peter Kabát^{1,2}

¹Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, katarina.lopusna@gmail.com

²Virologický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika

Abstrakt

Interferons are characterized by ability to inhibit cell growth, have antiviral, immunoregulatory, anti-apoptotic, and anti-angiogenic properties. Interleukin-29 (IL-29, IFN- λ 1) belongs together with interleukin-28 A (IFN- λ 2) and 28B (IFN- λ 3) to the group of the third type of interferons. Although they were characterized on the gene and protein level, it is not yet fully known spectrum of their biological effects. In our work, we investigate the antiviral effect of IL-29 on the replication of a highly pathogenic strain of Human herpes virus-1 (HHV-1) ANGpath. We have prepared a new stable cell line expressing IL-29 -Vero/IL-29. In Vero/IL-29 cells infected with ANGpath we observed formation of syncytial plaque phenotype typical for this virus (48 hrs p.i.). However, the plaques were smaller and their number was significantly lower when compared with ANGpath infected Vero cells. We conclude that IL-29 has the ability to inhibit the replication of HHV-1, possibly interfering with cell surface receptors as well as with viral glycoprotein B involved in adsorption/penetration processes.

Kľúčové slová: interleukín-29; interferón; bunková línia Vero; herpetické vírusy; herpes simplex vírus-1

Úvod a formulácia cieľa

Objav interferónov bol výsledkom výskumu dvoch nezávislých vedeckých skupín, ktoré v roku 1957 objavili v infikovaných kuracích embryách proteín a nazvali ho interferón (IFN) [1]. Interferóny, mediátory imunitnej odpovede, patria do veľkej rodiny cytokínov druhej triedy [2]. Interferóny sa vyznačujú schopnosťou inhibovať bunkový rast, majú tiež antivírusové, imunoregulačné, anti-apoptotické a anti-angiogénne vlastnosti [3]. Po aktivácii expresie interferónov vírusovou infekciou sa tieto viažu na povrchové receptory infikovanej bunky a okolitých buniek čím aktivujú signálnu dráhu Jak-STAT vedúcu k expresii proteínov s antivírusovou aktivitou, napríklad 2'-5' oligoadenylát syntetázy, RNA adenosín deaminázy, MX proteínu a proteín kinázy aktivovanej dsRNA [4,5].

Objavenie interferónov tretieho typu (IFN- λ) v roku 2003 otvorilo novú kapitolu výskumu. Dnes do tejto skupiny IFN patria tri homológne proteíny, interferón lambda 1 (IFN- λ 1 alebo IL-29), interferón lambda 2 (IFN- λ 2 alebo IL-28A) a interferón lambda 3 (IFN- λ 3 alebo IL-28B) [6].

Čeľaď *Herpesviridae* zahŕňa okolo 120 druhov vírusov cicavcov, vrátane človeka, vtákov, plazov, obojživelníkov, rýb a mäkkýšov. Dodnes bolo opísaných 8 ľudských herpetických vírusov, ktoré pochádzajú zo všetkých troch podčeľadí: *alfa-*, *beta-* a *gammaherpesvirinae*. Sú to: ľudský herpesvírus-1 a 2 (HHV-1 a HHV-2), ľudský herpesvírus-3 (HHV-3), ľudský herpesvírus-4 (HHV-4), ľudský herpesvírus-5 (HHV-5), ľudský herpesvírus-6 (HHV-6), ľudský herpesvírus-7 (HHV-7) a ľudský herpesvírus-8 (HHV-8) [7, 8].

Virión herpetických vírusov je kvázisférického tvaru s priemerom 140 až 300 nm. Pozostáva zo štyroch častí: jednej kópie dsDNA (130×10^3 až 248×10^3 bp), uzavretej v kapside ikozaedrálného tvaru, ktorý obklopuje proteínová vrstva nazývaná tegument, a vonkajší lipidový obal [7, 9]. Replikačný cyklus HHV-1 vo vnímavých bunkách trvá približne 16-18 hodín. Chronické infekcie spôsobené herpetickými vírusmi sú zvyčajne latentné, za určitých podmienok však môže dôjsť k reaktivácii vírusu [10]. HHV-1 môže vyvolať ochorenia s vysokou morbiditou a mortalitou, ako je napríklad herpetická encefalitída alebo keratitída, vedúca často k slepote [7].

Cieľom našej práce bolo pripraviť stabilnú bunkovú líniu, ktorá exprimuje IL-29 a charakterizovať vplyv exprimovaného interferónu na replikáciu vysokopatogénneho kmeňa HHV-1 ANGpath v tejto bunkovej línii.

Materiál a metódy

Expresný vektor pcDNA3.1(+)₁(Invitrogen)

Kompetentné bunky *Escherichia coli* (*E. coli*) JM109 (Promega)

Bunková línia Vero–fibroblastoidné bunky obličiek *Cercopithecus aethiops* (ATCC CCL-81)

Ľudský herpesvírus-1 - kmeň ANGpath (HSV-1 ANGpath) (Institute of virus research, DKFZ, Nemecko)

Genetický sulfát G418 (PAA)

Expresný „shuttle“ vektor pcDNA3.1(+) obsahujúci gén pre IL-29 sme pripravili podľa spôsobom popísaným Svetlíkovou a kol., 2010 [11]. Expresiu IL-29 v ľudských leukocytoch sme indukovali 100 µg/ml poly(I) × poly(C) po dobu 20 h kultiváciou pri 37° v 5% CO₂ na trepačke. Totálnu RNA sme z leukocytov extrahovali použitím RNA Insta-Pure System (Eurogentec). 3µg izolovanej RNA sme prepísali do komplementárnej cDNA použitím randomných heptanukleotidových primerov (Sigma-Aldrich) a M-MuLV reverznej transkriptázy (Finnzymes).

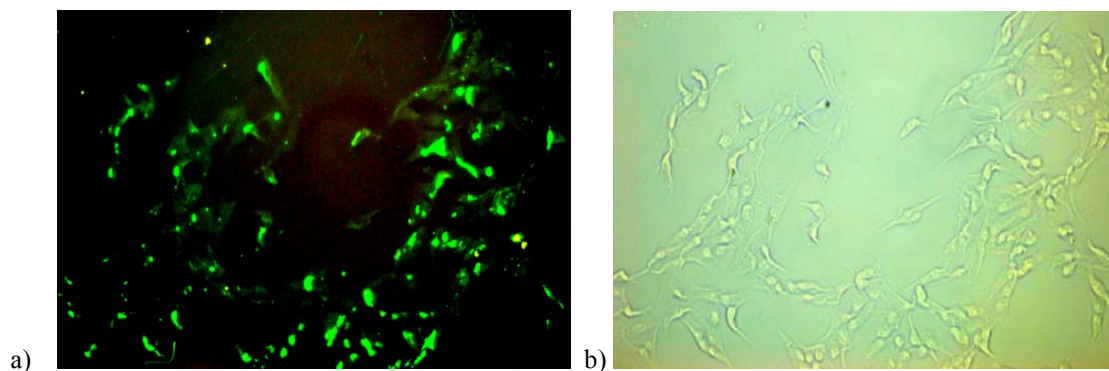
Po amplifikácii kódujúcej sekvencie IL-29 sme PCR produkty klonovali do shuttle vektora pcDNA3.1(+). Kompetentné bakteriálne bunky *E. coli* JM109 sme transformovali plazmidom obsahujúcim gén pre IL-29 (pcDNA3.1/IL-29). Z pozitívnych klonov sme izolovali DNA, ktorú sme linerizovali štiepením restriktčným enzýmom PvuI. Po overení správnej veľkosti rekombinantných plazmidov (6077 bp) gélovou elektroforézou sme vybrané klony pcDNA3.1/IL-29 izolovali z gélu použitím Wizard®SV Gel and PCR Clean-up System (Promega).

Vero bunky sme kultivovali v DMEM médiu s 5% FBS a transfekovali s 1,1 µg DNA pcDNA3.1/IL-29 použitím transfekčnej reagentie TurboFect™ Transfection Reagent (ThermoScientific). Transfekovaným Vero bunkám sme vymenili po 24 hodinách kultivačné médium za DMEM s 5% FBS a geneticínom sulfátom G418 (50 µg/ml). Od 2. dňa po transfekcii sme koncentráciu G418 postupne zvyšovali až na 250 µg/ml (30-ty deň po transfekcii). 35 dní po transfekcii jednotlivé bunkové klony vytvorili kolónie a tieto sme izolovali do samostatných jamiek. Následne sme analyzovali prítomnosť expresie IL-29 nepriamou imunofluorescenciou použitím primárnej protilátky anti-hIL-29/IFN-λ1 (R&D Systems) a sekundárnej protilátky konjugovanej s fluorescenčnou farbičkou Alexa Fluor® 488 (Invitrogen). Expresiu IL-29 sme v bunkách dokázali aj pomocou RT-PCR (nedokumnetované).

Antivírusový účinok IL-29 na replikáciu HHV-1 sme detegovali klasickou metódou zábrany cytopatického efektu. Transfekované Vero bunky tvoriace jednovrstvu sme infikovali HHV-1 ANGpath (s titrom 4×10^6 PFU/ml) v riedeniach 1:2, 1:4, 1:8 a 1:16. Po adsorpcii vírusu sme k bunkám pridali 0,43% metylcelulózu v DMEM. Infikované bunky sme kultivovali pri 37°C a 5% CO₂. Po 48 hodinách po infekcii sme analyzovali morfológiu a počet vytvorených plakov. Ako negatívnu kontrolu sme použili netransfekované Vero bunky infikované rovnakými riedeniami HHV-1 ANGpath.

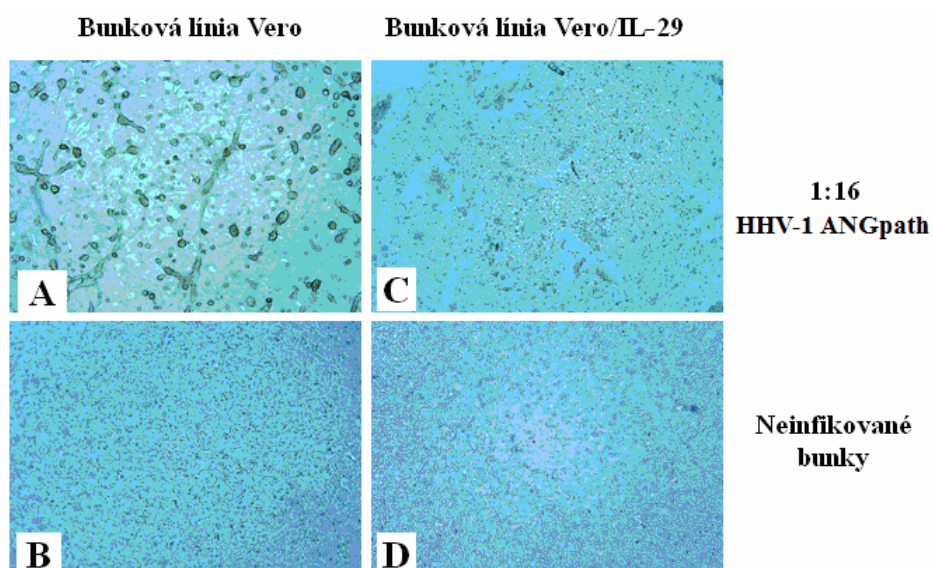
Výsledky a diskusia

Po úspešnej transfekcii bunkovej línie Vero rekombinantným plazmidom s génom kódujúcim interleukín-29 (pcDNA3.1/IL-29), sme získali novú bunkovú líniu Vero/IL-29, ktorá exprimuje ľudský interleukín-29 (Obr. 1).

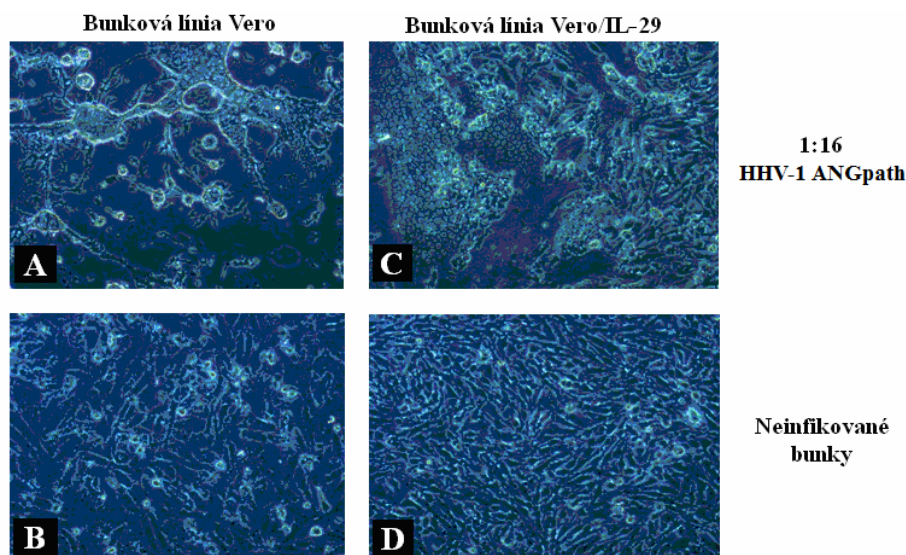


Obr. 1 Nepriama imunofluorescencia IL-29 v bunkovej línii Vero/IL-29. Primárna protilátka - anti-hIL-29/IFN- λ 1 (R&D Systems), sekundárna protilátka - Alexa Fluor® 488 (Invitrogen); (fluorescenčný mikroskop (a), svetelný mikroskop (b)).

Po infekcii bunkovej línii Vero/IL-29 vírusom HSV-1 ANGpath, ktorú sme porovnávali s bunkami Vero, sme potvrdili antivírusový účinok interleukínu-29 produkovaného bunkami línii Vero/IL-29 na replikáciu vírusu. Dva dni po infekcii Vero buniek sme pozorovali poškodenie celej bunkovej jednovrstvy aj pri najvyššom riedení vírusu 1:16. Vírus vykazoval typický syncytiálny fenotyp plakov v infikovaných bunkách. Naopak, jednovrstva Vero/IL-29 buniek bola len mierne poškodená. V týchto bunkách sme pozorovali tvorbu malých syncytiálnych plakov a veľa buniek zostalo nepoškodených vírusom (Obr. 2, 3). Predpokladáme, že interleukín-29 exprimovaný bunkami Vero/IL-29 zabraňuje šíreniu HSV-1 z infikovaných buniek do zdravých.



Obr. 2 Bunky Vero a Vero/IL-29 infikované 48 hodín s HHV-1 ANGpath riedeným 1:16 (svetelný mikroskop-5-násobné zväčšenie). Veľké syncytiálne plak v infikovaných bunkách Vero (A), neinfikované bunky Vero (B), malé syncytiálne plak v infikovaných bunkách Vero/IL-29 (C), neinfikované bunky Vero/IL-29 (D).



Obr. 3 Bunky Vero a Vero/IL-29 infikované 48 hodín s HHV-1 ANGpath riedeným 1:16 (svetelný mikroskop-20-násobné zväčšenie). Veľké syncytiálne plaky v infikovaných bunkách Vero (A), neinfikované bunky Vero (B), malé syncytiálne plaky v infikovaných bunkách Vero/IL-29 (C), neinfikované bunky Vero/IL-29 (D).

Vplyv interleukínu-29 na replikáciu herpetických vírusov nie je zatiaľ presne známy. Doterajšie experimenty však ukázali, že interleukínom-29 aktivovaná imunitná odpoveď po infekcii astrocytov a neurónov HHV-1 výrazne inhibuje syntézu DNA aj štruktúrnych vírusových proteínov, pričom nebola zistená toxicita interleukínu-29 [12].

Okrem herpetických vírusov bola v doterajších výskumoch pozorovaná interleukínom-29 sprostredkovaná imunitná odpoveď hostiteľa aj pri infekcii vírusom hepatitídy A z čeľade *Picornaviridae*, vírusom hepatitídy B z čeľade *Hepadnaviridae*, vírusom hepatitídy C z čeľade *Flaviviridae* [13, 14], vírusom BK z čeľade *Polyomaviridae*, vírusom encefalomyokarditídy (EMCV) z čeľade *Picornaviridae*, vírusom SARS-CoV z čeľade *Coronaviridae*, vírusom chrípky z čeľade *Orthomyxoviridae*, vírusom Sendai, vírusom mumpsu, ľudským metapneumo-vírusom a syncytiálnym respiračným vírusom (RSV) z čeľade *Paramyxoviridae*, vírusom vezikulárnej stomatitídy (VSV) z čeľade *Rhabdoviridae* a tiež vírusom Sindbis z čeľade *Togaviridae* [7, 15].

Záver

V našej práci zameranej na štúdium antivírusového účinku interleukínu-29 voči herpetickým vírusom, konkrétne voči HHV-1, sme pripravili stabilizovanú bunkovú líniu Vero/IL-29 exprimujúcu interleukín-29 a stanovili vplyv IL-29 na replikáciu vysoko patogénneho kmeňa ANGpath v nej. Po infekcii tejto bunkovej línie s ANGpath sme pozorovali menšie syncytiálne plaky, v signifikantne menšom počte, v porovnaní

s kontrolnými Vero bunkami.

Spektrum biologického účinku interleukínu-29 *in vitro* aj *in vivo* zatiaľ nie je presne známe. Z našich výsledkov však vyvodzujeme, že interleukín-29 je schopný inhibovať replikáciu vysokopatogénneho kmeňa HHV-1 pravdepodobne interferenciou s glykoproteínom B a s povrchovými receptormi bunky. Interleukín-29 má teda potenciál, aby sa v budúcnosti mohol využívať na liečbu ochorení vyvolaných ľudskými herpetickými vírusmi.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporená agentúrou VEGA 1/0265/11 a VEGA 2/0185/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Isaacs A., Lindemann J. (1957) Proc. R. Soc. London Ser. B. 147, p. 258
- [2] Donnelly R. P., Dickensheets H., O'Brien T. R. (2011) Trends Immunol. 32(9), p. 443
- [3] Friedman R. M. (2008) Br J Clin Pharmacol. 65(2), p. 158
- [4] Donnelly R. P., Kotenko S. V. (2010) J Interferon Cytokine Res. 30(8), p. 555
- [5] Pfaller C. K., Li Z., George C. X., Samuel C. E. (2011) Curr Opin Immunol. 23(5), p. 573
- [6] Uzé G., Monneron D. (2007) Biochimie. 89, p. 729
- [7] Rajčáni J. (2006) Čel'ad' Herpesviridae. In: Rajčáni J., Čiampor F. (eds.) Lekárska virológia, Veda, Bratislava, p. 273
- [8] Boehmer P. E., Nimonkar A. V. (2003) IUBMB Life. 55(1), p. 13
- [9] Knipe D. M., Howley P. M. (2007) Fields Virology, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 2503
- [10] Carter J. B., Saunders V. A. (2007) Virology, Principles and applications. WILEY, Liverpool, p. 122
- [11] Svetlíkovoá D., Kabát P., Ohrad'anová A., et al. (2010) Antiviral Res. 88(3), p. 329
- [12] Li J., Hu S., Zhou L., et al. (2011) Glia. 59(1), p. 58
- [13] Wang J., Oberley-Deegan R., Wang S., et al. (2009) J. Immunol. 182, p. 1296
- [14] Robek M. D., Boyd B. S., Chisari F. V. (2005) J Virol. 79(6), p. 3851
- [15] Miknis Z. J., Magracheva E., Li W., et al. (2010) J Mol Biol. 404(4), p. 650

Chronické podávanie syntetických analógov pre dopamínové D3 receptory ovplyvňuje regeneráciu mozgu a správanie zebričky červenzobej (*Taeniopygia guttata*) po striatálnom poškodení

Kristína Lukáčová, Eva Bosíková, Ľubica Niederová

Slovenská akadémia vied, Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Moyzesova 63, 90028

Ivanka pri Dunaji

Kristina.Lukacova@savba.sk

Abstrakt

Damage to striatal nucleus lateral AreaX (LAreaX) controlling song in songbirds is followed by a rapid recovery. Both the proliferative zone and song output nuclei contain high densities of dopamine D3 receptors. Here we tested if their pharmacological manipulation in zebra finch (*Taeniopygia guttata*) will result in changed neuronal recovery rate and/or behavior. We created neurotoxic lesions of LAreaX and implanted osmotic minipumps releasing for 2 weeks D3 agonist, antagonist, or saline. We found that lesion in LAreaX was regenerated to $72,5 \pm 2,5\%$ in control birds one month after surgery. The birds supplied with D3 agonist showed smaller lesions relative to both controls and birds supplied with D3 antagonist. The agonist also increased the numbers of new neurons in and around the lesion. The behavioral analysis showed differences in motif duration. These results suggest that dopamine D3 receptors accelerate the process of striatal recovery after injury and they seem to play a role in song tempo.

Kľúčové slová: dopamín; striatum; AreaX; lézia; regenerácia; zebrička.

Úvod a formulácia cieľa

Zebrička červenzobá spieva počas celého svojho života len jednu pieseň naučenú od tútora [1]. Pri speve sa ako komplexnejší prejav považuje motív pozostávajúci zo slabík, ktoré sú delené na elementy. Priemerná dĺžka motívu u zebričky je približne 700 ms a frekvencia sa pohybuje medzi 0,5 až 8 kHz [2]. Učenie motívu a piesne umožňuje sieť vokálnych oblastí mozgu, medzi ktoré patrí striatálna oblasť AreaX. Jej laterálna časť LAreaX je súčasťou tzv. prednej dráhy dôležitej pri učení spevu v mladosti avšak jej funkcia v dospelosti nie je úplne objasnená [3]. Po jej poškodení dochádza k čiastočnej obnove. Do oblasti migrujú neuróny z okolitého tkaniva alebo neuróny vzniknuté de novo putujúce z neurogénnej zóny – subventrikulárnej zóny (SVZ) [4]. SVZ má vysokú denzitu dopamínových D3 receptorov. Expresia D3 receptorov v mozgu spevavcov je pomerne vzácna, ale okrem SVZ nájdeme vysokú expresiu aj vo vokálnych oblastiach motorickej dráhy [5], pričom tieto oblasti kontrolujú vokálny output. U cicavcov bolo zistené, že aktiváciou D3 receptorov bola zvýšená neurogenéza v SVZ [6,7,8]. Ich úloha u spevavcov však nebola doteraz preskúmaná.

Na základe týchto poznatkov sme sa pokúsili zistiť, či sa farmakologickou manipuláciou D3 receptorov zmení veľkosť lézie LAreaX. Zároveň sme určovali mieru

inkorporácie novo vzniknutých neurónov do poškodenej oblasti v závislosti od podaného farmaka. Nakoniec sme testovali, či lézia a podané farmaká majú vplyv aj na jednu zo základných charakteristík piesne, dĺžku motívu.

Materiál a metódy

V experimente sme použili 38 samcov zebričky červenozobej (*Taeniopygia guttata*) chovaných na Ústave biochémie a genetiky živočíchov SAV v Ivanke pri Dunaji. Hmotnosť vtákov bola 18 ± 5 g a umiestnení boli vo zverinci s teplotou 24 ± 3 °C a vlhkosťou 55 ± 4 %. Potravu a vodu mali k dispozícii *ad libitum* a svetelný režim bol 14 hod svetlo a 10 hod tma. Samce boli vo veku od 4 mesiacov do 1 roka.

Každému jedincovi sme vytvorili bilaterálnu léziu vokálnej oblasti LAreaX pomocou neurotoxínu- kyseliny iboténovej (1%, pH=7; Sigma, USA) pod vplyvom inhalačnej anestézy s obsahom izofluránu (1-3%; Nicholas Piramal, USA) a pri rýchlosti 0,8-1 l/min. Lokalizáciu vokálnej oblasti LAreaX sme určili pomocou koordinátov v stereotaktickom aparáte (Kopf 900 (David Kopf, USA; 4,5-5,0 mm rostrálne; 1,3 mm laterálne a 3,5 mm ventrálne). Po vytvorení lézie sme vtákom voperovali na dorzálnu časť tela osmotickú minipumpu Alzet 1002 (DURECT Corporation, USA). Pumpy boli naplnené agonistom dopamínu pre D3 receptory 2-dipropylamino-7-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaftalénom (7-OHDPAT; Sigma, USA; n=11) s koncentráciou 1,6 mg na 100 µl, antagonistom 5,6-Dimetoxy-2-(N-dipropyl)-aminoindánom (U99194; Sigma, USA; n=12) s koncentráciou 3 mg na 100 µl. Ako kontrolu sme použili sterilný fyziologický roztok s koncentráciou 9 mg NaCl (Sigma, USA) na 100 µl (n=15). Látky sa postupne uvoľňovali počas dvoch týždňov. Počas 7 dní po operácii sme vtákom podávali i.m. marker novovzniknutých buniek brómdeoxyuridín (BrdU; Sigma, USA) 5mg/100g hmotnosti. Spev sme nahrávali pred aj po operácii. Po mesiaci od operácie sme vykonali transkardiálnu perfúziu pod vplyvom anestetika ketamín-xylazín [15 mg/ml ketamín (Narkamon 5%, Spofa, ČR), 3 mg/ml xylazín (Rometar 2%, Spofa, ČR); 200-220 µl na vtáka]. Perfúziou sme podávali do krvného obehu najprv 2 min fosfátový tlmivý roztok [0,1 M PBS; zásobný 10x PBS (4l): 320 g NaCl; 45,6 g Na₂HPO₄ (Sigma, USA); 8 g KCl (Sigma, USA); 8 g KH₂PO₄ (Sigma, USA); doplniť do 4 l deionizovanou vodou. pH = 7,4 upravené pomocou 10M NaOH (Sigma, USA); pre experimenty sme zásobný PBS riedili 1:9 s deionizovanou vodou na 1x PBS], a potom 20 min 4% roztok paraformaldehydu (Sigma, USA). Mozog odstránený z lebečnej dutiny sme postfixovali 5 h v 4% paraformaldehyde, následne 24 h v 20% roztoku sacharózy (Lachema, ČR) a ďalších 24 h v 30% roztoku

sacharózy. Takto pripravený mozog sme zmrazili v médiu OCT Compound (Sakura, Japonsko) a pripravili v zmrazovacom mikrotóme Leica 1800 (Leica, USA) na 30 μm hrubé koronálne rezy. Rezy sme uložili do PBS s obsahom 1 % azidu sodného (Mercachem, Nemecko) a skladovali pri 4 °C.

Neuróny sme vizualizovali použitím imunohistochemickej metódy farbenia. Rezy sme premyli 3x v PBS pri laboratórnej teplote. Nešpecifickú väzbu sme znížili inkubáciou 1 hodinu v blokovacom roztoku obsahujúcom 96% bovinného sérového albumínu (BSA; Sigma, USA) a 0,2 % Tritonu X-100 (Koch Light Research Laboratories, UK) v PBS. Po jeho odstránení sme pridávali primárne protilátky. Na identifikáciu veľkosti lézie sme použili sme myšiu monoklonálnu primárnu protilátku proti neuronálnemu markeru HuC/HuD (anti-Hu; Molecular Probes, USA) v pomere 1:500 a králičiu polyklonálnu primárnu protilátku proti egr-1 (Santa Cruz Biotechnology, USA) v pomere 1:200. Na identifikáciu novovzniknutých neurónov a buniek sme použili druhú sadu rezov, ku ktorým sme vo vodnom kúpeli pri 37 °C pridali 2M HCl (Lach-ner, ČR) na rozviazanie DNA a nechali sme ich inkubovať 7 min. Následne sme reakciu zastavili pridaním borátového pufru [Borátový tlmivý roztok (11): 8,7 g H₃BO₃ (Merck, Nemecko); 5,7 g Na₂B₄O₇·10H₂O (Merck, Nemecko); po rozpustení doplniť deionizovanou vodou do 1l, 0,1M, pH = 8,5)] s inkubáciou 4 min. Ďalej sme pokračovali pridaním králičej protilátky anti-doublecortin (anti-DCX; Sigma, USA) v pomere 1:3000 v kombinácii s potkaňou anti-BrdU protilátkou (Accurate Chemicals, USA) v pomere 1:500. Primárne protilátky boli riedené v blokovacom roztoku. Inkubácia s primárnymi protilátkami trvala 48 h pri teplote 4 °C. Následne sme rezy 3x premyli v PBS pri laboratórnej teplote a inkubovali 2 h na tmavom mieste so sekundárnymi protilátkami (Molecular probes, USA). V prvej sade farbenia rezov sme použili kozí protikráličí IgG konjugovaný s Alexa 594 a somárí protimyšší IgG konjugovaný s Alexa 488, v druhej sade rezov sme použili somárí protikráličí IgG konjugovaný s Alexa 594 a protipotkaniu IgG konjugovanú s fluoresceínom-5-izotiokyanátom (FITC; Sigma, USA). Všetky sekundárne protilátky boli riedené v pomere 1:500 v blokovacom roztoku okrem FITC, ktorý bol riedený v pomere 1:400. Potom sme opäť rezy premyli 3x v PBS, natiahli na silanizované podložné sklíčka a premyli v deionizovanej vode. Pred pokrytím krycím sklíčkom sme na rezy pridali Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, USA) a v druhej sade farbenia Vectashield bez DAPI (Vector Laboratories, USA).

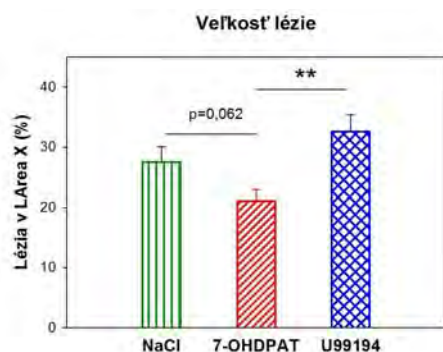
Počet DCX⁺ a BrdU⁺ neurónov sme počítali v aspoň dvoch rezoch a v každom reze v troch štvorcoch veľkých 100 x 100 μm v lézii, v časti LAreaX vzdialenej asi 100 μm od okraja lézie, a tiež v laterálnom a mediálnom okraji lézie širokom asi 50 μm.

Ďalej sme merali dĺžku motívov v dva rôzne dni pred operáciou a 1, 2, 3, 7, 14, 21 a 28 dní po operácii. Dáta sme získali z prvých 60 motívov od začiatku svetelnej fázy.

Výsledky sme pre veľkosť lézie a počet buniek v rôznych oblastiach sme vyhodnotili metódou ANOVA s Fisherovým PLSD *post hoc* testom s faktorom „skupina“. Rovnakú metódu sme použili pre vyhodnotenie dĺžky motívu, pričom faktormi boli „deň“ a „skupina“.

Výsledky a diskusia

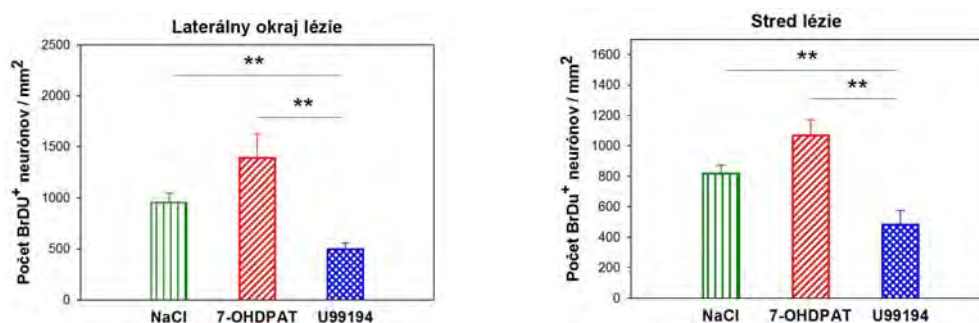
Mesiac po vytvorení bilaterálnych lézií v oblasti LAreaX sme u jedincov s podaným agonistom D3 receptorov (7-OHDPAT) pozorovali redukciu poškodenia na 79±1,8% pôvodnej veľkosti. Oproti tomu, signifikantne nižšiu obnovu na 67,5±2,7% (p=0,002; Obr.1) sme sledovali v prípade jedincov s aplikovaným antagonistom (U99194).



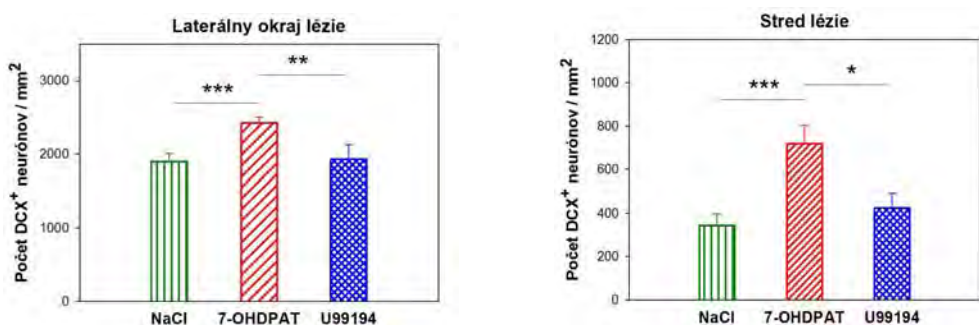
Obr.1 Graf veľkosti lézie v LAreaX závislej od podania agonistu, antagonistu alebo fyziologického roztoku. Hodnoty pre jednotlivé stĺpce sú zobrazované ako aritmetický priemer a SEM, agonista (7-OHDPAT) n=11, antagonistu (U99194) n=12, kontrola (NaCl) n=15. ** je p<0,01

Brómdeoxyuridín (BrdU), syntetický analóg tymidínu inkorporujúci sa do DNA počas S-fázy bunkového cyklu, označoval nové bunky (neuróny aj glie) vznikajúce v priebehu siedmich dní po poškodení. Novovzniknuté bunky sa včleňovali do LAreaX, okraja aj centra lézie. U jedincov s podaným antagonistom sme pozorovali signifikantne nižší počet BrdU⁺ buniek v porovnaní s kontrolnou skupinou, respektíve skupinou s podaným agonistom vo všetkých nami sledovaných oblastiach (Obr. 2; laterálny okraj p=0,002 resp. p=0,004; stred lézie p=0,01 resp. p=0,002; mediálny okraj p=0,018 resp. p=0,004; LAreaX p=0,001 resp. p=0,004). Na rozdiel od toho, podanie agonistu vplyv na inkorporáciu nových buniek do žiadnej z týchto oblastí nemalo.

Prítomnosť mladých, približne 2 až 4 týždňových DCX⁺ neurónov v poškodenom tkanive nám potvrdila prebiehajúci proces regenerácie. Jedinci s podaným agonistom mali oproti kontrolnej skupine aj skupine s podaným antagonistom signifikantne vyšší počet inkorporovaných DCX⁺ buniek v laterálnom okraji (Obr. 3 p=0,001; p=0,026), mediálnom okraji (p=0,001; p=0,017) aj centre lézie (Obr. 3 p=0,001; p=0,011). V obnovenej oblasti LAreaX sme nepozorovali rozdiely medzi skupinami v žiadnej zo spomínaných oblastí.



Obr.2 Graf znázorňujúci závislosť počtu nových BrDU⁺ neurónov od podania agonistu, antagonistu dopamínu pre D3 dopamínové receptory a fyziologického roztoku na ľavo v laterálnom okraji lézie na pravo v strede lézie. Hodnoty pre jednotlivé stĺpce sú aritmetický priemer a SEM. Agonista (7-OHDPAT), antagonistu (U99194), kontrola (NaCl). Pre všetky skupiny n=3. ** je p<0,01

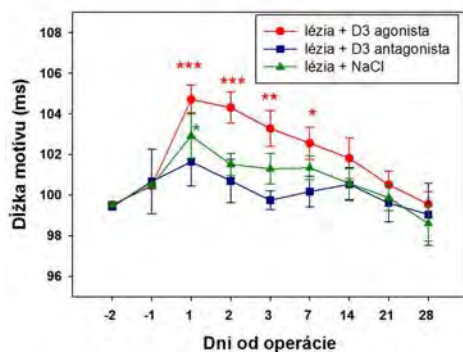


Obr.3 Graf znázorňujúci závislosť počtu nových DCX⁺ neurónov od podania agonistu, antagonistu dopamínu pre D3 dopamínové receptory a fyziologického roztoku na ľavo v laterálnom okraji lézie na pravo v strede lézie. Hodnoty pre jednotlivé stĺpce sú zobrazované ako aritmetický priemer a SEM. Agonista (7-OHDPAT) n=11, antagonistu (U99194) n=12, kontrola (NaCl) n=15 * je p<0,05; ** je p<0,01; *** je p<0,001.

Poškodenie striatálnej oblasti LAreaX ovplyvnilo tempo piesne jedincov všetkých skupín. Motív piesne sa spočiatku predĺžil, tempo sa spomalilo. V priebehu regenerácie do konca mesiaca sa hodnoty dostali na pôvodnú úroveň. Signifikantné rozdiely medzi skupinami sme však nezaznamenali.

Bilaterálna lézia v oblasti striata vyvoláva intenzívnu inkorporáciu nových buniek do oblasti poškodenia, za čo je pravdepodobne zodpovedná zvýšená proliferácia buniek v subventrikulárnej zóne. Syntetické analógy dopamínu môžu tento proces výrazne ovplyvňovať [6]. Bolo dokázané, že podanie agonsitu pre D3 receptory 7-OHDPAT *in vitro*

spôsobuje zvýšenie proliferácie prekursorových buniek v SVZ [7] a zároveň podaním antagonistu U99194 je možné tento efekt blokovať (5). Takýto efekt pôsobenia sme pozorovali aj v našej práci, kde novovzniknuté bunky respektíve mladé neuróny regenerovali poškodenú oblasť intenzívnejšie po podaní agonistu ako antagonistu.



Obr.4 Graf ukazujúci dĺžku motívu v jednotlivé dni pred a po operácii v závislosti od podanej látky. Plné symboly predstavujú aritmetický priemer a SEM. Agonista (7-OHDPAT) n=11, antagonist (U99194) n=12, kontrola (NaCl) n=15 * je p<0,05 ** je p<0,01, *** je p<0,001.

Záver

Výsledky naznačujú, že dopamínové D3 receptory urýchľujú proces obnovy mozgu po striatálnom poškodení a na základe neurogenézy a inkorporácie novovzniknutých neurónov do poškodenej oblasti. Manipulácia D3 receptorov ovplyvní regeneráciu mozgu, ale môže mať vplyv aj na tempo piesne, prostredníctvom ovplyvnenia motorickej dráhy cez D3 receptory. Zdá sa, že jednou z úloh LArea X je udržiavanie tempa piesne.

Pod'akovanie

Práca bola financovaná z grantov FIRCA R03 TW007615-01, VEGA 2/0189/10 a APVV VVCE-0064-07.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Konishi M. (1985) Annu. Rev. Neurosci. 8, p. 125
- [2] Sossinka R., Bohner J. (1980) Z. Tierpsychol. 53, p. 123
- [3] Nottebohm F. (1991) Trends. Neurosci. 14, p. 206
- [4] Scharff C., Nottebohm F. (1991) J. Neurosci. 11, p. 2896
- [5] Kubiková E., Wada K., Jarvis E. D. (2010) J. Comp. Neurol. 518, p. 741
- [6] Baker S. A., Baker K. A., Hagg T. (2004) Nat. Med. 8, p. 963
- [7] Höglinger G. U., Rizk P., Muriel M. P., et al. (2004) Nat. Neurosci. 7, p. 726

Asymmetric cell division in *Bacillus subtilis*

Jana Makroczyová, Ján Jamroškovič, Imrich Barák

*Slovak Academy of Sciences, Institute of Molecular Biology, Department of Microbial Genetics, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovak Republic,
jana.makroczyova@savba.sk*

Abstract

Cell division in prokaryotes is mediated by complex and conserved protein machinery. The positioning of division septum relies on the proteins of Min system and must be very precise to ensure equal distribution of genetic material. During sporulation of *Bacillus subtilis*, the bacteria undergoes asymmetric division resulting in larger mother cell and smaller forespore. Both vegetative and asymmetric division depend on essentially the same protein machinery, however some of the proteins with known function in vegetative division play yet undefined role in sporulation, including the Min proteins. Here we show, that even though the absence of MinD or MinJ proteins seems not to disturb sporulation, it affects the activation of the first forespore-specific sporulation σ factor, σ^F . Tracking of σ^F activity during sporulation revealed a four-fold increase in σ^F activity in the third hour of sporulation in *min* mutants compared to the wild type. Further, fluorescence microscopy was employed to investigate the spatial pattern of σ^F activation in these mutants.

Keywords: *Bacillus subtilis*; sporulation; cell division, Min system; sigma factor

Introduction and aims of the study

Bacillus subtilis is one of the organisms in which the process of cell division has been intensively studied. The key element in this process is a highly conserved FtsZ protein. Cell division begins with polymerization of FtsZ and formation of a contractile FtsZ-ring (Z-ring) at the future site of the septum, that is the mid-cell [1]. This FtsZ-ring then serves as a scaffold which recruits other division proteins. Proper placement of Z-ring is governed by proteins of the Min system [2], which block division at unwanted sites, such as cell poles. Mutations in the locus encoding for these proteins cause indiscriminate septum placement and formation of anucleate “minicells” and is hence named Min locus.

The core of the Min the system is composed of evolutionary conserved MinC and MinD proteins that form a complex, which serves as the inhibitor of division. MinC acts directly on FtsZ and disallows efficient polymerization of FtsZ into mature Z-ring [3]. MinD is a membrane associated ATPase, that recruits MinC to membrane interface [4]. The third element of the Min system is called a topological determinant and attracts the MinCD complex to the cell poles. In *B. subtilis*, the topological determinant is DivIVA protein [5], which recruits this complex to the cell poles via MinJ [6] (Fig. 1A).

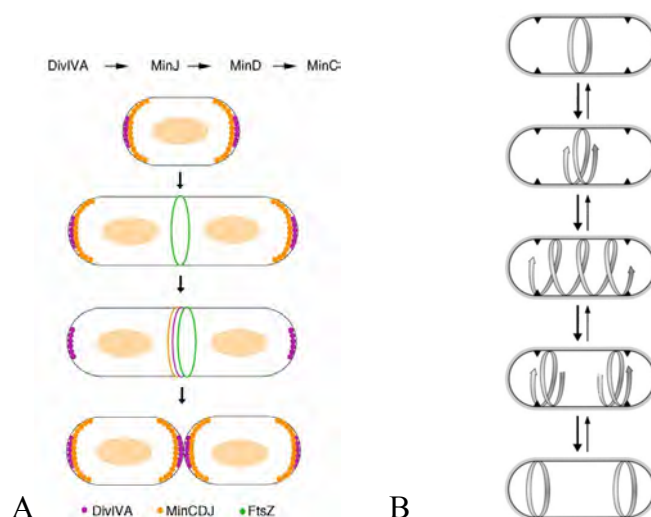


Fig. 1 (A) MinCDJ–DivIVA system of *B. subtilis* during vegetative growth [7]
 (B) Relocalization of Z-ring from mid-cell to polar sites during sporulation [8]

During sporulation of *B. subtilis* [9, 10] the bacteria divides asymmetrically into two unequal compartments, the larger mother cell and smaller forespore. The Z-ring formed initially at the mid-cell is relocalized via spiral-like structures to polar sites (Fig. 1B), one of which is then utilized as basis for asymmetric septum. How is the block of polar sites mediated by Min system during vegetative growth overcome during sporulation has not been satisfyingly resolved yet. Upon spore maturation, the mother cell undergoes lysis, releasing the spore to the environment. Cells resulting from this asymmetric division have different fates and follow distinct genetic programmes, mediated by cascade of RNA polymerase σ factors specific for the forespore and the mother cell. The first factor becoming active is the forespore-specific factor σ^F , whose activation is linked to the formation of asymmetric septum. Both vegetative and asymmetric division rely on nearly identical set of proteins. However, not all of the proteins with known function in vegetative division have established role in sporulation. Mutations in *minC* and *minD* were found to have little effect on sporulation frequency [11, 12], yet, 30% of cells of *minD* mutant exhibited a misplaced sporulation-like septum [13], indicating that role of Min system in sporulation cannot be fully excluded.

Materials and methods

Sporulation frequency of *min* mutant strains was assessed as follows: Single colony of *B. subtilis* cultures was streaked onto LB plate and incubated overnight at 30°C. Next

morning the cells were inoculated into liquid DSM to initial $OD_{600}=0.1$ and incubated with shaking for 24 hours at 37°C . Then, 1ml of the culture was detracted. In the next step the dilutions 10^1 - 10^6 were prepared. 100 μl of each dilution was streaked onto LB plates and incubated overnight at 37°C . The remaining diluted samples were heated to 85°C for 15 minutes and again 100 μl of each dilution was streaked onto LB plates and incubated overnight at 37°C . Finally, the number of spores was counted and by comparison with number of colonies grown from viable (not heated) cells the sporulation frequency was determined.

The measurements of σ^{F} activity were performed in *min* mutant strains containing *lacZ* reporter gene fused to σ^{F} -specific promoter *P_{spoIIQ}*. Cells were grown in DSM and incubated with shaking at 37°C over period of 12 hours. Each hour, a 2 ml aliquot was detracted, frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C . The σ^{F} activity was then determined as specific enzyme activity in β -galactosidase assay as described in [14] and modified as follows: The vials were thawed at room temperature and spun down $3300g$ for 10 min. Pellet was resuspended in 2 ml of cold Z-buffer and OD_{600} was measured. 0.5 ml of the suspension was transferred to fresh eppendorf tube and 0.5 ml of Z-buffer was added. The cells were permeabilized by adding 100 μl chloroform and 50 μl 0.1% SDS, vortexed and placed in water bath at 28°C for 3 min. Upon addition of 0.2 ml ONPG ($4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) and vortexing, the eppendorf tubes were incubated at 28°C until light yellow colour developed. The time of the reaction was measured and the reaction was stopped by addition of 0.5 ml 1 M Na_2CO_3 . In the case of negative control, the reaction was incubated for 1 hour. Upon centrifugation at $16000g$ for 5 min, OD_{420} and OD_{550} of the supernatant were measured. Resulting Miller units were then calculated from corresponding OD values, time and volume of reaction.

Fluorescence microscopy was used to investigate spatial activation of σ^{F} in *Δ minD* and *Δ minJ* mutant strains. By placing *gfp* reporter gene under control of σ^{F} -specific promoter *P_{spoIIQ}* it is possible to visualize compartments where σ^{F} becomes active. *P_{spoIIQ}-gfp* fusion was introduced at *amyE* chromosomal locus in *Δ minD* and *Δ minJ* mutant backgrounds as well as in the wild type strain. Samples for fluorescence microscopy were grown in DSM and harvested at t_2 (beginning of the 3rd hour of sporulation), when the activity of σ^{F} was highest as measured previously. Volume equivalent to 100 μl of culture with $OD_{600}=1$ was detracted and spun down for 3 min at 5000 rpm. Pellet was resuspended in 20 μl of supernatant and 0.5 μl of suspension was used for observation. Samples were examined by OLYMPUS BX61

microscope equipped with Olympus DP30BW camera. Image analysis was performed using Fiji/ImageJ software.

Results and discussion

Sporulation frequencies were determined for $\Delta minD$ and $\Delta minJ$ mutants. Positive control (PC) is represented by wild type strain. Sporulation of strain containing the P_{spoIIQ} - $lacZ$ reporter fusion, which is utilized in further experiments was also determined to ensure this fusion does not affect sporulation (IB1340). Strain depleted from the main initiator of sporulation, Spo0A, which is defective in sporulation was used as negative control (NC). These results indicate that absence of MinD or MinJ does not affect sporulation (Fig. 2).

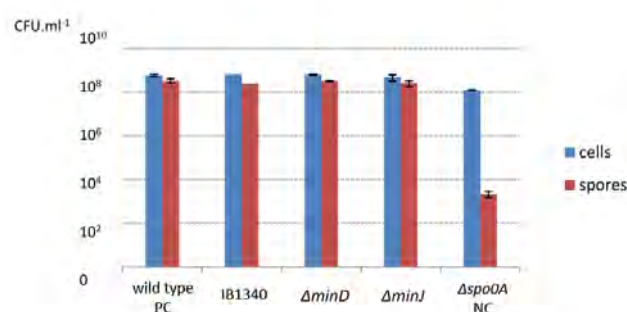


Fig. 2 Sporulation frequencies of *min* mutants and control strains shown in logarithmic scale

Progress of σ^F activation was assessed in $\Delta minD$, $\Delta minJ$ and wild type background used as positive control (PC, IB1340). Negative control (NC) is represented by strain containing promoterless copy of the $lacZ$ gene. Measurements of σ^F activity in $\Delta minD$ and $\Delta minJ$ mutant strains show, that deletion of MinD or MinJ leads to an approximate four-fold increase in activity of σ^F (Fig. 3).

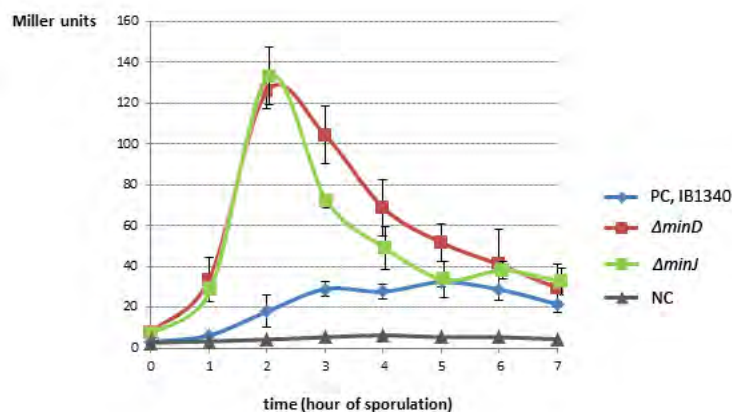


Fig. 3 Progress of σ^F activation in $\Delta minD$ and $\Delta minJ$ mutant strains compared to wild type

In wild type cells, the σ^F is synthesised both in the mother cell compartment and the forespore, but its activation is triggered specifically only in the forespore. One possible explanation that might account for the measured increase in *min* mutants is that σ^F becomes active in the whole cell, possibly as a consequence of disrupted septum. Therefore we investigated the spatial activation of σ^F in these mutants. Fluorescence microscopy of $\Delta minD$, $\Delta minJ$ and wild type strain revealed the same pattern of localization in all studied strains, with GFP signal present only in the forespores. No signal was observed in the mother cell compartment in neither of the strains (Fig. 4).

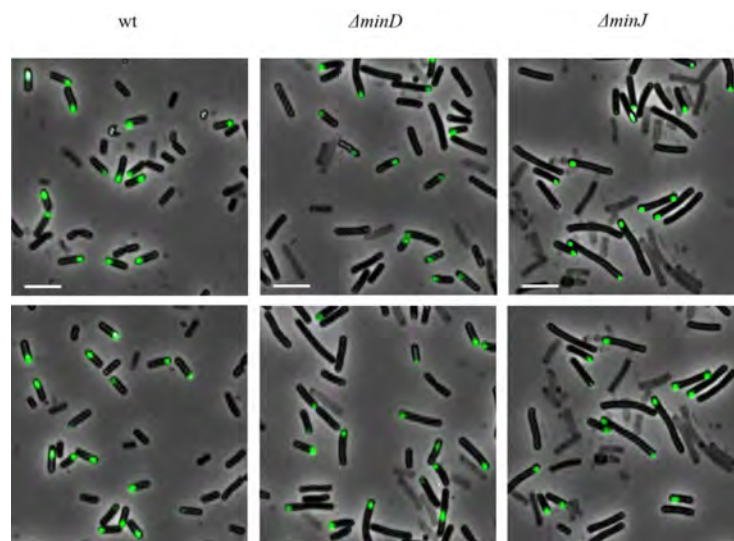


Fig. 4 Overlays of images from brightfield and fluorescence microscopy of wild type, $\Delta minD$ and $\Delta minJ$ strains showing compartments where σ^F is active. The scale bar represents 5 μm .

Additionally, images from fluorescence microscopy were quantitatively analysed (not shown). The spores of these *min* mutants did not show any increase in mean GFP signal intensity or in distribution of fluorescence compared to the wild type. The number of spores analyzed by fluorescence microscopy was much smaller (approx. 30 per strain) than amount of cells assayed for β -galactosidase activity, which might account for the observed difference. It is also possible, that only a subpopulation of cells is affected by *min* mutations, similarly as only in 30% of cells of *minD* mutant a misplaced septum was present [13]. This observation reflects the varying ability of cells to cope with defects caused by mutations. Such subpopulation might not be detected by microscopy, however it might substantially contribute to the σ^F activity measurements. Also, the mean GFP signal was not normalized

against controls, therefore it is possible the signal was already saturated at the level of wild type, and no increase could not be detected whatsoever.

Conclusions

Taken together, these results indicate a negative effect of Min system on activation of the first forespore-specific factor σ^F . The activation of σ^F in *min* mutants is not spatially disturbed and remains confined only to the forespore.

Acknowledgements

The study was performed at the Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, under supervision of RNDr. Imrich Barák, DrSc.

References

- [1] Bi, E., & Lutkenhaus, J. (1991) *Nat.* 354(6349), p. 161
- [2] Barák, I., & Wilkinson, A. J. (2007) *FEMS Microbiol. Rev.* 31(3), p. 311
- [3] Bi, E., & Lutkenhaus, J. (1993) *J. Bacteriol.* 175(4), p. 1118
- [4] De Boer, P. A., Crossley, R. E., Hand, et al. (1991) *EMBO J.* 10(13), p. 4371
- [5] Cha, J. H., & Stewart, G. C. (1997) *J. Bacteriol.* 179(5), p. 1671
- [6] Bramkamp, M., Emmins, R., Weston, et al. (2008) *Mol. Microbiol.* 70(6), p. 1556
- [7] Bramkamp, M., & Van Baarle, S. (2009) *Curr. Opin. Microbiol.* 12(6), p. 683
- [8] Ben-Yehuda, S., & Losick, R. (2002) *Cell*, 109(2), p. 257
- [9] Errington, J. (2003) *Nat. Rev. Microbiol.* 1(2), p. 117
- [10] Stragier, P., & Losick, R. (1996) *Annu. Rev. Genet.* 30, p. 297
- [11] Li, Y., & Austin, S. (2002) *Mol. Microbiol.*, 46(1), p. 63
- [12] Huang, K. C., Meir, Y., & Wingreen, N. S. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100(22), p. 12724
- [13] Barák, I, Prepiak, P., & Schmeisser, F. (1998) *J. Bacteriol.* 180(20), p. 5327
- [14] Miller, J. H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics.* Cold Spring Harbor Laboratory, p. 352

Charakterizácia replikačného proteínu gp41 korynefága BFK20

Radka Matúšková¹, Nora Halgašová²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika;

²Slovenská akadémia vied, Ústav molekulárnej biológie, Oddelenie genomiky a biotechnológií, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovenská republika;
radka.matusek@gmail.com

Abstrakt

The subject of our study is a protein gp41. Gp41 is a member of replication cassette of coryneophage BFK20. By former bioinformatics analysis gp41 was identified as a putative helicase that exhibits the highest degree of similarity to the helicases from family SF2. By cloning of ORF41 gene into the expression vector pET28a+ we created expression plasmid pET28/41HC and transformed it into expression host strain *E. coli* BL21(DE3). We achieved an overexpression of gp41HC with His-Tag sequence on the C terminus in a soluble form. Target recombinant protein was isolated by metal ion affinity chromatography on cobalt column. We verified the presence of His-Tag sequence on the expressed protein by Western blot analysis. We tested oligomerization state of recombinant protein gp41HC using FPLC method.

Kľúčové slová: korynefág BFK20; replikačný proteín; helikáza; Western blot analýza; FPLC

Úvod a formulácia cieľa

Koryneformné baktérie z rodu *Corynebacterium* a *Brevibacterium* zaraďujeme medzi Gram-pozitívne, nesporulujúce baktérie s vyšším obsahom GC párov v ich genomickej DNA [1]. Nepatogénne druhy, napríklad *Brevibacterium flavum*, sa využívajú v priemysle na výrobu aminokyselín, predovšetkým L-lyzínu, treonínu či kyseliny L-glutámovej.

Priemyselné produkčné kultúry bývajú často ohrozené fágovými infekciami. Prvým korynefágom s kompletne osekvenovaným genómom je lytický fág BFK20. Z morfológického hľadiska patrí do taxonomickej skupiny *Siphoviridae* [2]. Jeho hostiteľom je kmeň *Brevibacterium flavum* CCM 251. Genóm BFK20 tvorí dvojvláknová lineárna molekula DNA s celkovou dĺžkou 42 972 bp [EMBL, AJ278322].

V našej práci sa venujeme ORF41, ktorý patrí ku skorým génom. Kóduje predpokladanú helikázu, ktorá je súčasťou replikačnej kazety korynefága BFK20. Na základe sekvenčnej analýzy a porovnávacích štúdií aminokyselinovej sekvencie a organizácie konzervovaných motívov je možné proteín gp41 zaradiť do rodiny SF2 helikáz, ktorej členom sú aj DEAD-box helikázy.

V práci popisujeme klonovanie ORF41 do expresného vektora pET28a+ a izoláciu rekombinantného proteínu gp41HC metalochelátovou afinitnou chromatografiou na kobaltovom nosiči. V ďalšej časti potvrdzujeme prítomnosť His-Tag sekvencie

rekombinantného proteínu pomocou Western blot analýzy a pozornosť venujeme experimentálnej charakterizácii oligoméneho stavu rekombinantného proteínu pomocou FPLC.

Materiál a metódy

Príprava expresného plazmidu: PCR reakciou sme amplifikovali ORF41 (1641 bp) korynefága BFK20, ktorý kóduje predpokladanú helikázu gp41. Templátom pre PCR reakciu bola dvojláková DNA korynefága BFK20 izolovaná v našom laboratóriu. Na amplifikáciu zvolených fragmentov sme použili dvojicu primérov, ktoré obsahujú štiepne miesta pre restričné endonukleázy *NcoI* a *SalI*. Amplifikované fragmenty ORF41 sme prečistili kitom (PCR Purification Kit; Qiagen) a štiepili restričnými endonukleázami *NcoI* a *SalI* (NEB). Takto opracované fragmenty sme klonovali do expresného vektora pET28a+ štiepeného tými istými restričnými endonukleázami. Vzniknutý konštrukt sme označili pET28/41HC. Rekombinantný proteín gp41HC sa exprimuje ako fúzny proteín s C koncovou histidínovou kotvou.

Indukcia expresie: Rekombinantným expresným vektorom pET28/41HC sme transformovali hostiteľské bunky *E. coli* BL21(DE3). Transformanty z nočného inokula sme preočkovali do tekutého TB média [3] a kultivovali na rotačnej trepačke pri 37°C do dosiahnutia hodnoty OD (A_{600}) = 0,5. Expresiu sme indukovali 0,5 mmol.l⁻¹ IPTG (izopropyl- β -D-1-tiogalaktopyranozid) počas 3 h pri 37°C za stáleho trepania.

Izolácia proteínu: Bunkový lyzát sme získali sonifikáciou buniek 10 x 15" pri amplitúde 10 na prístroji Soniprep 150 Plus (MSE). Exprimovaný rekombinantný proteín gp41HC sme izolovali metalochelátovou afinitnou chromatografiou na kobaltovom nosiči (Sigma HIS-Select[®] Cobalt Affinity Gel; CN H8162) pri teplote 4°C podľa inštrukcií výrobcu. Indukciu expresie aj jednotlivé kroky izolačného postupu sme analyzovali pomocou elektroforézy v 10% SDS-polyakrylamidovom géli. Ako štandard molekulových hmotností sme používali Unstained Protein Molecular Weight Marker; Fermentas.

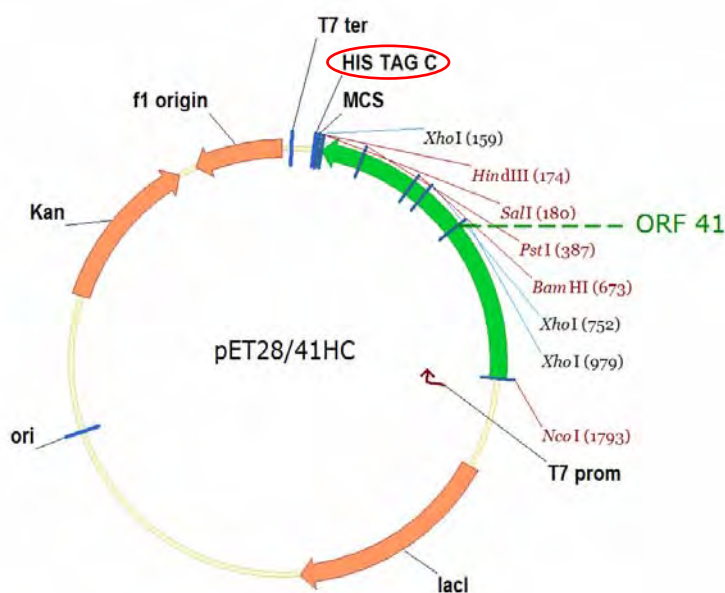
Western blot analýza: Proteíny separované elektroforézou v polyakrylamidovom géli sme elektroforeticky preniesli na nitrocelulóзовú membránu Hybond-C extra (Amersham), pričom sme použili komerčnú aparatúru Panther[™] HEP-1. Prenos prebiehal počas 2 h pri potenciálovom spáde 0,8 mA.cm⁻². Po prenesení na membránu sme fúzne proteíny s histidínovou kotvou detekovali použitím monoklonálnej protilátky proti His-Tag izolovanej z myši (Novagen), ktorú sme následne vizualizovali imunodetekciou sekundárnou protilátkou, ktorá je konjugovaná s alkalickou fosfatázou (Goat Anti-Mouse IgG Alkaline Phosphatase

Conjugate, Novagen). Ako štandard molekulových hmotností sme používali PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Fermentas.

FPLC: Na stanovenie oligomerizácie študovaného proteínu sme primárne zvolili metódu FPLC. Gélová filtrácia proteínov prebiehala v FPLC systéme UNICORN 5.11 na kolóne Superose 12 pri prietokovej rýchlosti 0,4 ml/min v tlmivom roztoku 20 mmol.l⁻¹ TrisHCl pH 8,0; 150 mmol.l⁻¹ NaCl; 10% (v/v) glycerol. Molekulovú hmotnosť proteínu sme určili podľa kalibračnej krivky získanej pomocou štandardov: BSA (Serva), ovalbumín (Serva), karbonická anhydráza (Sigma-Aldrich), ktoré boli rozdelené za rovnakých podmienok. Molekulová hmotnosť analyzovaného proteínu zodpovedá retenčnému času.

Výsledky a diskusia

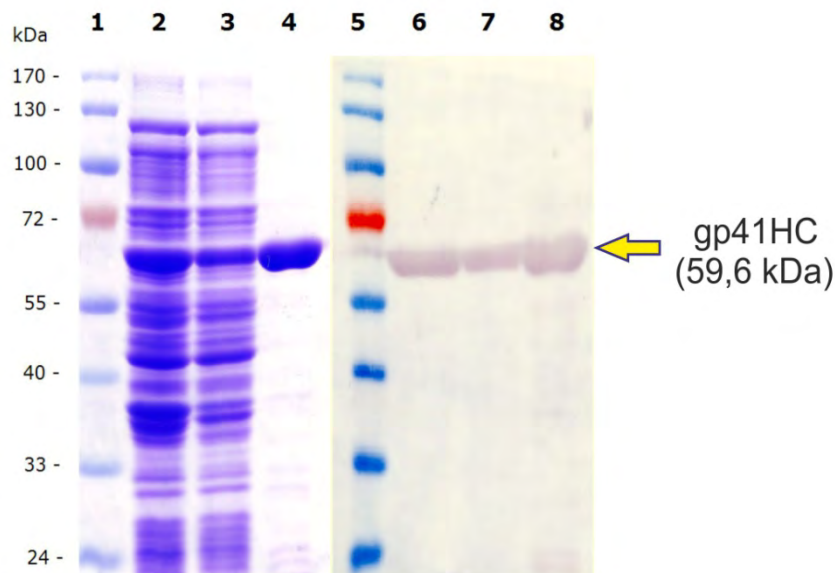
Pripravili sme konštrukt pET28/41HC s naklonovaným génom ORF41 s veľkosťou 1614 bp (Obr. 1). Rekombinantný proteín gp41HC sa exprimuje ako fúzny proteín s His-Tag kotvou na C konci s molekulovou hmotnosťou 59,6 kDa.



Obr. 1: Konštrukt pET28/41HC s naklonovaným ORF41.

Konštruktom pET28/41HC sme transformovali hostiteľské bunky *E. coli* BL21(DE3). Na expresiu proteínu gp41HC v hostiteľskom kmeni sme zvolili TB médium. Expresiu rekombinantného proteínu sme indukovali pridaním 0,5 mmol.l⁻¹ IPTG. Ako kontrolu sme použili paralelnú neindukovanú kontrolu. Expresiu replikačného proteínu gp41HC sme analyzovali v 10% SDS-polyakrylamidovom géli. Zistili sme, že časť proteínu ostáva

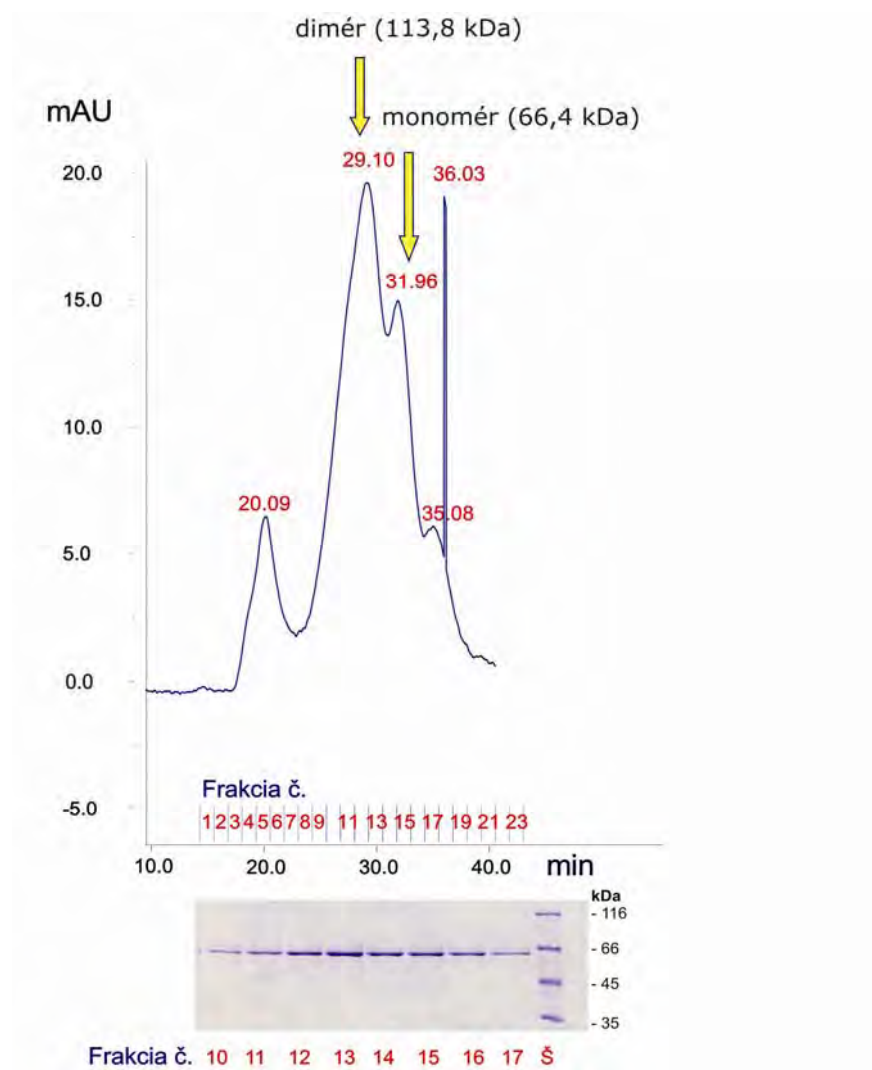
v nerozpustnej frakcii, ale napriek tomu sme proteín izolovali metalochelátovou afinitnou chromatografou na kobaltovom nosiči. Výsledkom bol prečistený rekombinantný proteín gp41HC s molekulovou hmotnosťou 59,6 kDa. Prítomnosť histidínovej kotvy na C konci sme potvrdili Western blot analýzou (Obr. 2).



Obr. 2: Expresia, izolácia a Western blot analýza rekombinantného proteínu gp41HC.

Dráhy: 1, 5 – štandard molekulových hmotností (#SM0671; Fermentas), 2, 6 – bunkový lyzát, 3, 7 – supernatant po centrifugácii sonifikovaných buniek, 4, 8 – izolovaný proteín gp41HC

Schopnosť oligomerizácie replikačného proteínu v natívnom prostredí sme analyzovali gélovou filtráciou na kolóne Superose 12. Veľkosť proteínu gp41HC sme určili na základe porovnania s proteínovými štandardmi, ktoré boli analyzované za rovnakých podmienok. Zistili sme, že takmer celý objem proteínu reprezentujú dva píky na chromatograme. Pozorovali sme uvoľňovanie proteínu gp41HC predovšetkým v retenčnom čase 29,10 min a v menšej miere v čase 31,96 min. Tieto dva časy zodpovedajú molekulovým hmotnostiam 113,8 kDa a 66,4 kDa. Porovnaním získaných molekulových hmotností s predpokladanou molekulovou hmotnosťou natívneho proteínu sme zistili, že gp41HC sa vyskytuje v roztoku prevažne ako dimér, v menšej miere ako monomér.



Obr. 3: Analýza oligoméneho stavu proteínu gp41HC v natívnych podmienkach pomocou FPLC.
FPLC chromatogram analýzy proteínu gp41HC. SDS-PAGE elektroforéza frakcií č. 10-17 po FPLC.

Záver

ORF41 bakteriofága BFK20 kódujúci predpokladanú helikázu sme klonovali do expresného vektora pET28a+ a pripravili sme expresný plazmid pET28/41HC. Nadprodukovaný rekombinantný proteín gp41HC sme izolovali metalochelátovou afinitnou chromatografiou na kobaltovom nosiči. Prítomnosť histidínovej kotvy na C konci sme potvrdili Western blot analýzou. Oligoméry stav proteínu sme sledovali metódou FPLC, experimentálne sme potvrdili tvorbu dimérov predpokladanej helikázy gp41HC.

PodĎakovanie

Práca bola vypracovaná v Laboratóriu genomiky na Ústave molekulárnej biológie SAV. Experimentálna časť bola financovaná z grantových prostriedkov grantu VEGA

2/0110/11.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Woese, C. R. (1987) *Microbiol. Rev.* 51(2), p. 221
- [2] Koptides, M., Barák, I., Šisová, M., et al. (1992) *J. Gen. Microbiol.* 138, p. 1387
- [3] Sambrook, J., Russell, D. (2001) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*

Effect of silver ions on oxidative stress in zebra fish hepatoma cell line

Lucie Mečřřová (1), Meike Becker (2)

¹*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra ekologie, Mlynská dolina 842 15 Bratislava 4, Slovensko; lucka.mecirova@gmail.com*

²*Technische Universität Kaiserslautern, Fachschaft Biologie, Erwin-Schrödinger Str. 13, Germany*

Abstrakt

The aim of the study was to analyze whether silver ions cause oxidative stress by blocking the cells antioxidant capacity in zebra fish hepatoma cell line. In our experiment we have tested toxicity of silver ions in concentration of 25mg/L. To distinguish weather the silver ions cause oxidative stress, we used combined treatment with pro-oxidant menadione. Our results suggest that silver ions are toxic to zebra fish hepatoma cells, but not necessarily due to oxidative stress.

Key words: *oxidative stress; ROS; antioxidant capacity; pro-oxidant; menadione; silver ions; hepatoma cell line*

Introduction

Oxidative stress is a physiological state where the production of ROS outweighs the antioxidant capacity of the cell, thereby resulting in oxidative damage to proteins and other cellular molecules potentially leading to death [1] of the cell. Menadione is a well-known pro-oxidant meaning that presence of this substance in cell cause extra ROS formation. According to the recent study made by Farkas et al. [2] silver and gold nano particles cause oxidative stress, but the effect of silver ions was unclear probably due to low concentrations of silver ions used. This study was used as a draft for our experiment.

Materials and methods

To test the effect of silver ions, the cells of zebra fish hepatoma cell line (350 000 cells/ml) have been exposed first to 25mg/L silver ions (exposure time 24 hours) and later to 5 different concentrations of menadione (25 μ M; 12.5 μ M; 6.25 μ M; 3.125 μ M; 1.56 μ M, exposure time 24hours). Due to this we could have seen whether silver ions make the cells more fragile to the exposure of menadione.

Following methods have been used:

- **The alamar blue assay** is a viability test, which measures the cytotoxicity of various agents by measuring the metabolic activity. This is done by a REDOX indicator which responds to the reduction growth medium with fluorescence.
- **The CFDA-AM** is also a viability test which measures the enzymatic activity and the membrane integrity. CFDA-AM is a substrate of esterase that is converted in living cells into a polar, not membrane permeable substance. This conversion occurs only in cells with intact cell membranes and therefore a suitable cytoplasmic milieu for the esterase activity.

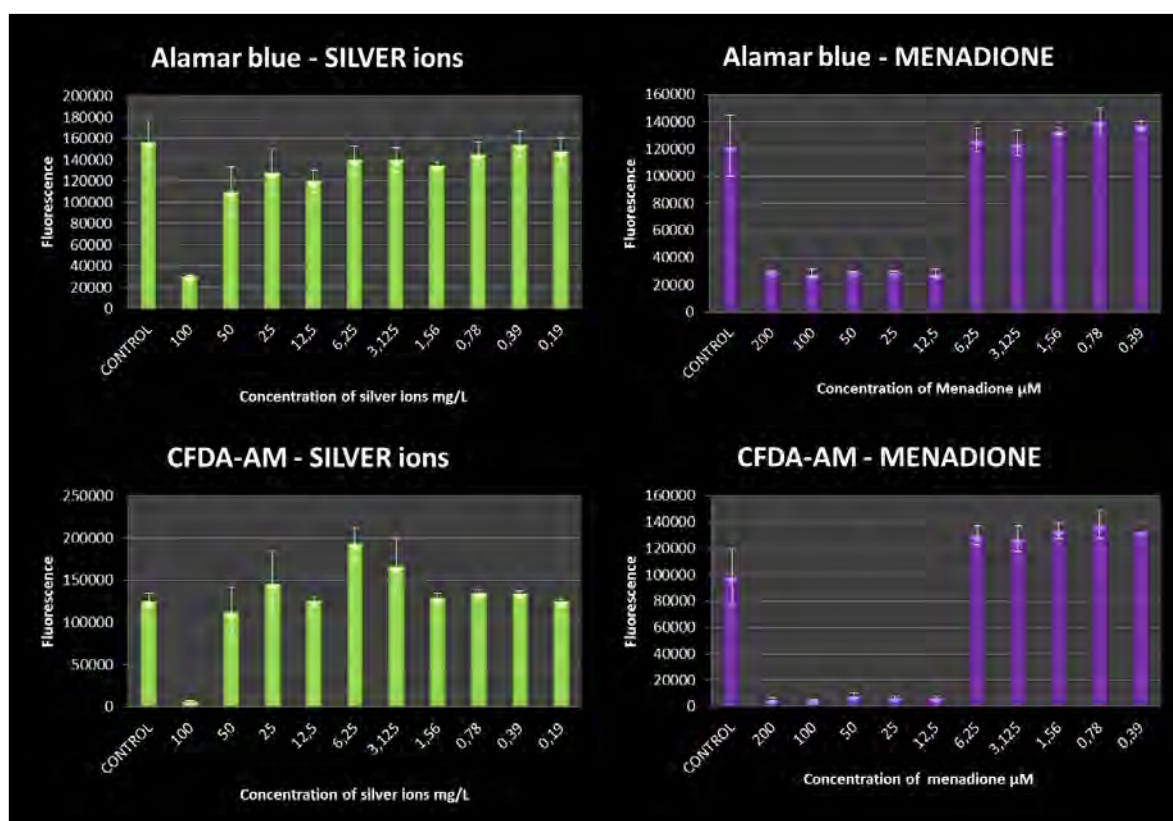


Fig. 1 Viability tests with different concentrations of silver ions and menadione

The viability of cells that have been treated with different concentrations of silver ions and menadione was determined and the most suitable concentrations for the experiment were selected. During the experiment the cells have been exposed to **25mg/L silver ion** for 24 hours and another 24 hours to **menadione** in 5 different concentrations (**25µM; 12.5µM; 6.25µM; 3.125µM; 1.56µM**).

Results and discussion

Surprisingly high toxic effect of silver ions was detected, what can be seen on the Ag^+ control group. No significant difference in viability between the combined treatment of Ag^+ and 25µM 12,5µM menadione and the treatment with only menadione (in the same concentrations 25µM 12,5µM) was observed. Lower concentrations of menadione (6.25µM;

3.125 μ M and 1.56 μ M) were on the other hand less toxic and comparing to combined treatment of Ag⁺ with menadionne (6.25 μ M; 3.125 μ M; 1.56 μ M) the viability was higher.

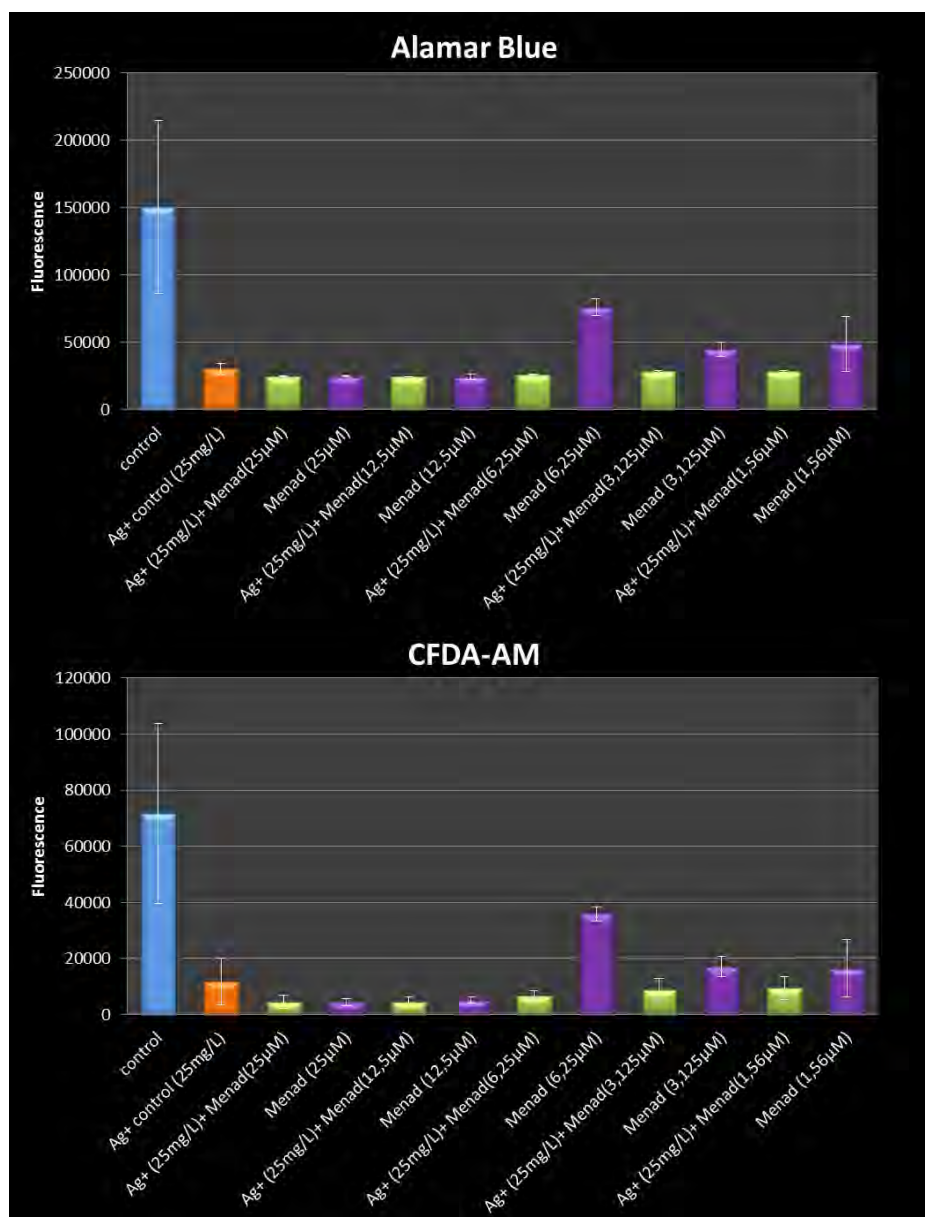


Fig. 2 The result of viability tests of combined treatments with silver ions and menadione.

Fig. 2 is showing the effect of three different treatments. Orange column presents the control 25mg/L Ag⁺ group, purple columns treatments by menadione and green columns treatments by Ag⁺ combined with menadione.

Assuming that silver ions block antioxidants, we have expected much higher ROS formation after combining both Ag⁺ and menadione treatments. Although we have observed this trend in case of lower concentrations of menadione, no significant results have been found. Some problems may have occurred during the experiments, which could misrepresent our results. For example the concentration of silver ions (25mg/L) selected for the experiment was probably too high because it was more toxic to the cells than intended. The concentrations of menadione which had been selected had a wide scale, but none of the

concentrations used was accurate. For the future studies we suggest to test more concentrations of menadione within the interval 6,25 μ M to 12,5 μ M.

Conclusion

The results indicate that the Ag ions are toxic to zebra fish hepatoma cells, but not necessarily due to oxidative stress.

Acknowledgements

We would like to thank Johana Grans for excellent supervision, Joachim Sturve for providing his devices and knowledge about this subject from previous studies and to Lars Johan Erkell for directing the Animal Cell Physiology course 2012/2013 at the *Institute of biology and environmental science* (University of Gothenburg) which included this laboratory project as a part of the tuition.

References

- [1] Halliwell B., Gutteride J. M. C. (1999) Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxfrord, p. 187
- [2] Farkas J., Christian P., Urrea J. A. G., et al. (2010) Aquat Toxicol. 96(1), p. 44

Lytická aktivita endolyzínu bakteriofága phiBP

Lívia Medžová¹, Gabriela Bukovská²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 824 15 Bratislava, Slovenská republika; liviamedzova@yahoo.com

²Ústav molekulárnej biológie SAV, Oddelenie genomiky a biotechnológií, Laboratórium genomiky, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava 45, Slovenská republika

Abstrakt

A bacteriophage phiBP infecting *Paenibacillus polymyxa* CCM 7400 was isolated from cell lysate culture. The phiBP genome consist of double-stranded DNA of 43 kbp size. The genome was partially sequenced and through bioinformatics analysis regions with significant similarity to typical lytic genes were revealed. Three lytic genes, two for holine and one for endolysin were identified within 2,5-kbp fragment. In this paper, the lytic activity of recombinant endolysin of bacteriophage phiBP is experimentally characterized. The constructs pET-EN a pET-EC with cloned gene of endolysin of bacteriophage phiBP, were prepared. Conditions for expression of recombinant protein were optimalized. We got a soluble fraction of enzymatically active endolysin of bacteriophage phiBP by cultivation at 30°C. Protein purification was performed using metal-ion affinity chromatography on HIS-Select Cobalt Affinity Gel. The lytic activity was confirmed by diffuse assay and turbidity reduction assay on substrates from several bacterial strains.

Kľúčové slová: bakteriofág; endolyzín; expresia proteínov; lytická aktivita

Úvod a formulácia cieľa

Bakteriofágové endolyzíny predstavujú novú alternatívnu triedu antibakteriálnych látok vhodných na liečbu infekcií spôsobených baktériami rezistentnými na antibiotiká. V porovnaní s antibiotikami, bakteriofágové endolyzíny vykazujú selektívny účinok na špecifické patogénne baktérie bez ovplyvnenia okolitých komenzálnych mikroflór. Využitie lytických enzýmov (endolyzínov) má veľký význam aj pre aplikácie v biotechnológiách, potravinárskom odvetví a v neposlednom rade aj vo farmaceutickom priemysle [1].

Doteraz študované endolyzíny z bakteriofágov infikujúcich Gram-pozitívnych hostiteľov sa vyznačujú zväčša dvojdoménovou modulárnou štruktúrou proteínu, ktorá pozostáva z N-koncovej katalytickej domény a C-koncovej väzobnej domény. Endolyzíny rozdeľujeme podľa miesta štiepenia substrátu do piatich skupín: (A) N-acetylmuramidázy (lyzozýmy), (B) N-acetyl-β-D-glukozaminidázy (glykozidázy), (C) N-acetylmuramoyl-L-alanín amidázy, (D) L-alanoyl-D-glutamát endopeptidázy a (E) špecifické endopeptidázy [2].

Bakteriofág phiBP je lyzogénny fág, izolovaný z lyzátu jeho zatiaľ jediného hostiteľa *Paenibacillus polymyxa* CCM 7400. Patrí pravdepodobne k tzv. „vir mutantom“. Genóm bakteriofága phiBP pozostáva z dsDNA o veľkosti 43 kbp. Bakteriofág phiBP bol zaradený na základe morfológie do čelade „unclassified“ *Siphoviridae* rad *Caudovirales*. Predpokladaný gén pre endolyzín bakteriofága phiBP sa nachádza na ORF (open reading

frame) 1.2, má veľkosť 993 bp (EMBL, FN538971). Na základe bioinformatickej analýzy sme pre endolyzín phiBP identifikovali výraznú homológiu s endolyzínmi z *Bacillus spp.* a s glykozylyhydrolázovou lytickou doménou (GH 25) [3].

V predkladanej práci sme klonovali gén pre endolyzín bakteriofága phiBP do expresného vektora pET28a⁺ a exprimovali sme rekombinantný proteín v systéme *E. coli* BL21(DE3). Lytickú aktivitu exprimovaných proteínov sme potvrdili experimentálne optickou a difúznou metódou.

Materiál a metódy

Príprava konštruktú: Izolovaná a prečistená genómová DNA bakteriofága phiBP bola použitá ako templát v PCR reakcii. Pomocou PCR sme amplifikovali fragmenty endolyzínu phiBP: A o veľkosti 1007 bp a B o veľkosti 1014 bp. Primery použité na amplifikáciu fragmentu A, pre konštrukt pET-EC, obsahovali štiepne miesta restričných endonukleáz *NcoI* a *SalI*. Primery použité na amplifikáciu fragmentu B, pre konštrukt pET-EN, obsahovali štiepne miesta restričných endonukleáz *NdeI* a *SalI*. PCR produkty boli prečistené pomocou kitu „PCR Purification Kit“ (Qiagen), poštiepené restričnými endonukleázami (NEB) a klonované do linearizovaného expresného vektora pET28a⁺. Konštrukt pET-EC bol navrhnutý pre expresiu proteínu endolyzínu phiBP ako fúzny proteín s C koncovou HisTag kotvou a pET-EN pre endolyzín s N koncovou HisTag kotvou.

Indukcia expresie: Ligačnou zmesou pre konštrukt pET-EC a pET-EN sme transformovali kompetentné bunky *E. coli* XL1-Blue a transformantov sme selektovali na Luria-Bertani (LB) tuhom médiu s obsahom kanamycínu (100 µg/ml). Plazmidy sme izolovali varnou minimetódou [4] a analyzovali štiepením restričnými endonukleázami *NcoI*, *SalI* a *NdeI*, *SalI*. Kompetentné bunky *E. coli* BL21(DE3) sme transformovali pripravenými konštruktami pET-EC a pET-EN izolovanými pomocou kitu Qiagen plasmid mini kit. Bunky s plazmidom sme pre expresiu kultivovali v Terrific Broth (TB) médiu na rotačnej trepačke do dosiahnutia $A_{600} \sim 0,4 - 0,5$, a optimalizovali podmienky expresie proteínu pre teplotu 37°C, 30°C a 18°C. Expresiu rekombinantného endolyzínu bakteriofága phiBP sme indukovali pridaním IPTG (izopropyl-β-D-1-tiogalaktopyranozid) do výslednej koncentrácie 0,5 mmol.l⁻¹ a následným kultivovaním buniek pri teplote 37°C, 30°C po dobu 3 hodín alebo 18°C po dobu 16 hodín. Narastené kultúry buniek sme centrifugovali (15 min/6000xg), premyli 0,9% NaCl a zamrazili pri -20°C do analýzy. Bunky sme pre izoláciu proteínu sonifikovali 15x10 sek s 1 min prestávkami na sonifikátore MSE pri amplitúde 14, odobrali sme vzorku celkového lyzátu a supernatant po centrifugácii a vzorky sme analyzovali v 13%

SDS-polyakrylamidovom géli (PAGE).

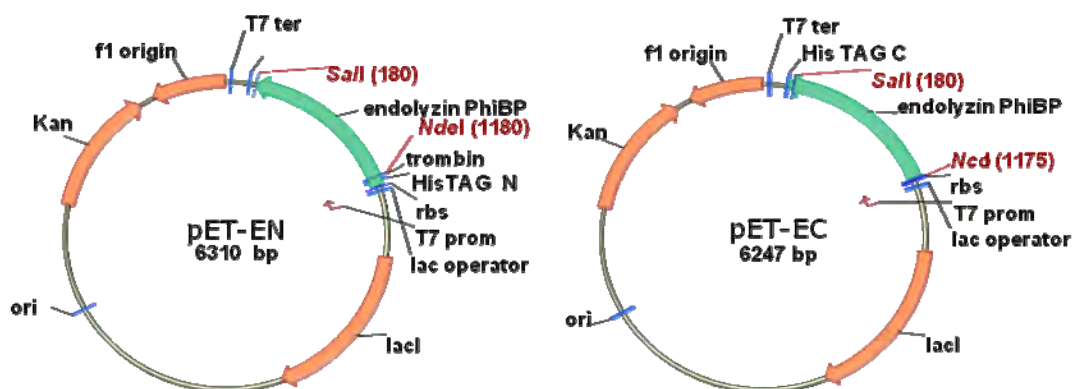
Izolácia a purifikácia proteínu cez diskontinuálnu afinitnú chromatografiu na metalochelátovom nosiči s kobaltom: Nadprodukované proteíny sme izolovali pomocou afinitnej chromatografie na metalochelátovom nosiči s kobaltom v kolónke (Sigma HIS-Select Cobalt Affinity Gel), pri teplote 4°C a podľa postupu odporúčaného výrobcom. Roztoky použité pri izolácii: ekvilibračný a premývací roztok sme použili 50 mmol.l⁻¹ TrisHCl, pH 7,4; 150 mol.l⁻¹ NaCl; proteín bol z nosiča s kobaltom eluovaný skokovým gradientom s 50 mmol.l⁻¹ imidazolom, 100 mmol.l⁻¹ imidazolom, 200 mmol.l⁻¹ imidazolom a 300 mmol.l⁻¹ imidazolom v elučnom roztoku.

Difúzna metóda stanovenia lytickej aktivity: Ako substrát sme použili autoklávované bunky zbierkových kmeňov *Paenibacillus polymyxa* CCM 7400, *Paenibacillus polymyxa* N36, *Paenibacillus polymyxa* S292, *Paenibacillus polymyxa* 1460, *Paenibacillus polymyxa* 1465, *Paenibacillus polymyxa* CCM 2001, *Brevibacterium flavum* CCM 251, *C. glutamicum* RM3, *Bacillus subtilis* PY79, *E. coli* JM110 a *E. coli* XL1Blue pripravené podľa postupu [5] s modifikáciami. K 20 ml 0,7 % rozvarenej agarózy sme pridali 1 ml pripraveného 20 % substrátu buniek, tak aby výsledná koncentrácia buniek bola 1 % a naliali na platňu. Do vyrezaných jamiek sme nanášali 652 pmolov proteínu purifikovaného cez diskontinuálnu afinitnú chromatografiu na kobaltovom nosiči a platňu sme inkubovali cez noc pri 30°C.

Optická metóda stanovenia lytickej aktivity: Pri stanovení lytickej aktivity sme postupovali podľa protokolu Donovan a Foster-Frey s modifikáciami [6]. Ako substrát sme použili bunky *Paenibacillus polymyxa* CCM 7400, *Paenibacillus polymyxa* N36, *Paenibacillus polymyxa* S292, *Paenibacillus polymyxa* 1460, *Paenibacillus polymyxa* 1465, *Paenibacillus polymyxa* CCM 2001, *Brevibacterium flavum* CCM 251, *C. glutamicum* RM3, *Bacillus subtilis* PY79, *P. larvae* 38, *P. larvae* 4486, *P. larvae* 5680, *E.coli* JM110, *E. coli* XL1Blue v strednej fáze exponencionálneho rastu (OD ~ 0,5). Stanovenie lytickej aktivity sme uskutočnili v celkovom objeme 200 µl pri 30°C. 150 pmolov enzýmu sme zriedili s ekvilibračným roztokom (150 mol.l⁻¹ NaCl, 50 mmol.l⁻¹ Tris-HCl pH 7,4) na konečný objem 20 µl a takto zriedený enzým sme aplikovali do 96 jamkovej platničky. Reakciu sme spustili pridaním 180 µl suspenzie substrátu buniek pomocou multikanálovej pipety. V negatívnej kontrole sa nachádzalo 180 µl suspenzie buniek a 20 µl ekvilibračného roztoku. Výsledné OD₆₀₀ sme merali na mikroplatňovom spektrofotometri Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (Biotech) v časových intervaloch 0', 5', 10', 15', 20', 30', 45', 60'.

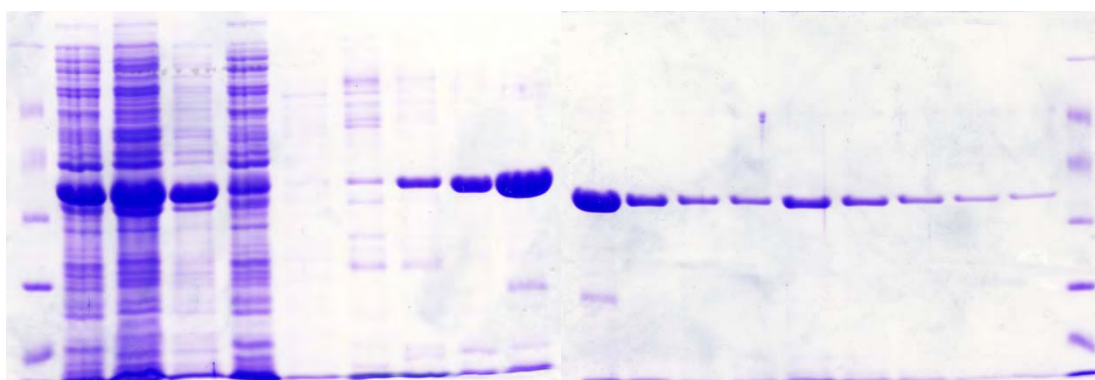
Výsledky a diskusia

Pripravili sme koštrukt pET-EC o veľkosti 6247 bp a koštrukt pET-EN o veľkosti 6310 bp s naklonovaným génom endolyzínu bakteriofága phiBP o veľkosti 993 bp (Obr.1). Z pET-EC sa exprimuje endolyzín phiBP fúzovaný s HisTag kotvou na C konci (37,6 kDa) a z pET-EN endolyzín fúzovaný s HisTag kotvou na N konci (38,1 kDa). Správnosť koštruktov sme overili restričnou analýzou pomocou endonukleáz *NcoI*, *SaII* a *NdeI*, *SaII*.



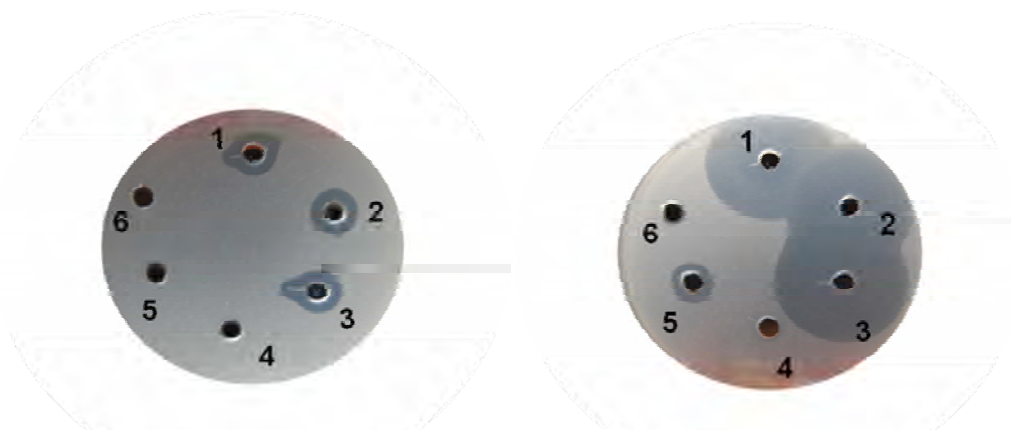
Obr.1 Koštruktory pET-EN (pET28a⁺, endolyzín phiBP, N koncová HisTag kotva) pET-EC (pET28a⁺, endolyzín phiBP, C koncová HisTag kotva)

Koštruktami sme transformovali bunky *E. coli* BL21(DE3) a proteín sme exprimovali. Pre nadexpresiu endolyzínu sme zvolili podmienky: kultivačné médium TB, nárast buniek do A_{600} 0,4 – 0,5; indukcia 0,5 mmol.l⁻¹ IPTG po dobu 3 hodiny pri teplote kultivácie 30°C. Na základe výsledku nadexpresie proteínov sme sa rozhodli ďalej pokračovať s koštruktom pET-EN. Exprimovaný proteín gp1.2 EN (38,1 kDa) sme izolovali cez diskontinuálnu afinitnú chromatografiu na metalochelátovom nosiči s kobaltom. Proteín bol eluovaný v najväčšom množstve pri koncentrácii 100 mmol.l⁻¹ imidazolu (Obr. 2).



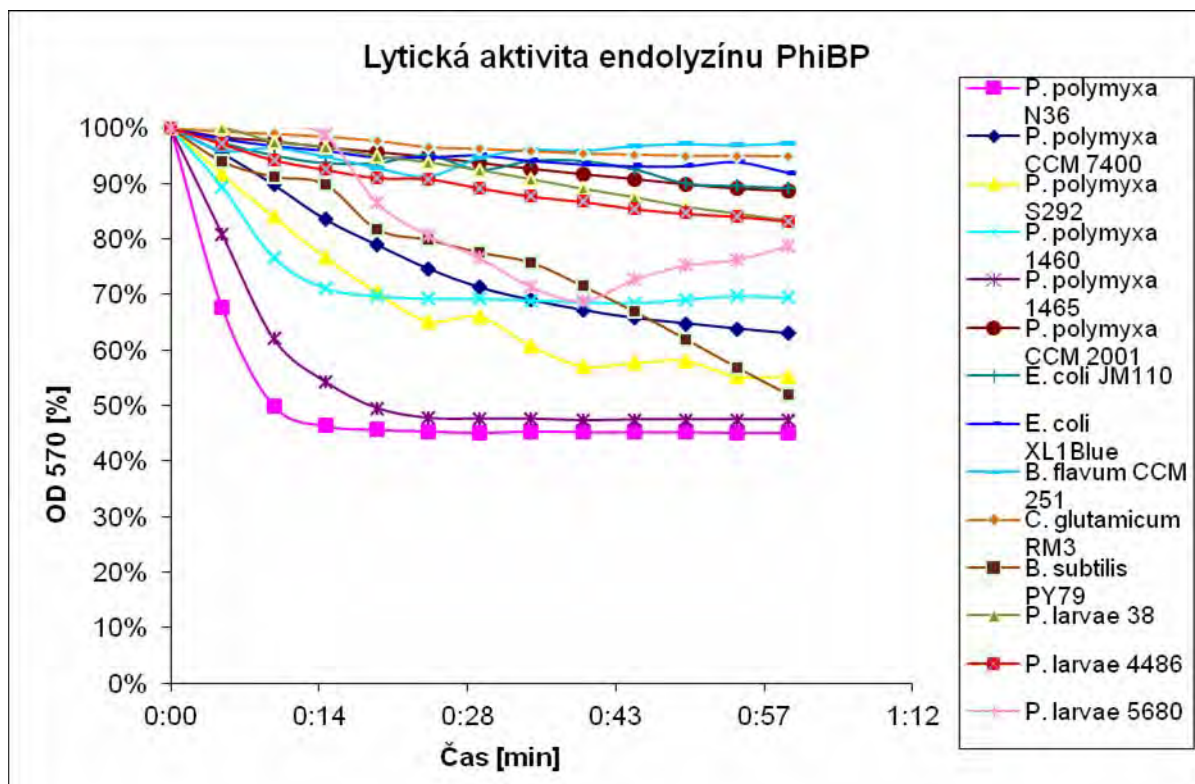
Obr. 2 Izolácia proteínu gp1.2 EN: 1. štandard Fermentas (#SM0431), 2. lyzát pET-EN, 3. supernatnat pET-EN, 4. sediment pET-EN, 5. lyzát pET-EN po nanesení na kolónku, 6.-7. premytie kolónky, 8.-9. gp1.2EN (50 mmol.l⁻¹), 10.-12. gp1.2EN (100 mmol.l⁻¹), 13.-15. gp1.2EN (200 mmol.l⁻¹), 16.-19. gp1.2EN (300 mmol.l⁻¹), 20. štandard Fermentas (#SM0671)

Izolovaný proteín gp1.2EN sme ďalej použili pre stanovenie lytickej aktivity pomocou difúznej metódy. Lytickú aktivitu sme identifikovali vo forme čirej zóny po 24 a 36 hodinách (Obr. 3). Ako kontrolu sme použili frakciu *E.coli* BL21(DE3) s pET28a⁺ (30°C). Kontrola lytickú aktivitu nevykazovala (Obr.3/6). Lytickú aktivitu sme dokázali u kmeňa *Paenibacillus polymyxa* CCM 7400, *Paenibacillus polymyxa* N36, *Paenibacillus polymyxa* S292, *Paenibacillus polymyxa* 1460, *Paenibacillus polymyxa* 1465, *Paenibacillus polymyxa* CCM 2001. Lytickú aktivitu sme nepotvrdili u kmeňa *B. flavum* CCM251, *C. glutamicum* RM3, *B. subtilis* PY79, *E. coli* JM110 a *E. coli* XL1Blue.



Obr. 3 *P. polymyxa* CCM7400 po 24 a 36 h: 1. supernatant gp1.2 EN; 2. eluát gp1.2 EN z frakcie 50mM imidazol; 3. eluát gp1.2 EN z frakcie 100 mM imidazol; 4. eluát gp1.2 CDN; 5. zahustený gp1.2 EN na Amicone ;6. kontrola supernatant z indukovanej kultúry pET28a+

Na stanovenie lytickej aktivity sme tiež použili citlivejšiu optickú metódu meranú pomocou mikroplatňového spektrofotometra Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (Biotech) ako pokles optickej hustoty buniek pri OD₆₀₀ v časovom intervale. Aktivitu sme merali v celkovom objeme 200 µl v časových intervaloch 0', 5', 10', 15', 20', 30', 45', 60' (Graf 1.). Lytickú aktivitu sme potvrdili u kmeňa *Paenibacillus polymyxa* CCM 7400, *Paenibacillus polymyxa* N36, *Paenibacillus polymyxa* S292, *Paenibacillus polymyxa* 1460, *Paenibacillus polymyxa* 1465, *Paenibacillus polymyxa* CCM 2001. Lytickú aktivitu sme nepotvrdili u kmeňa *Brevibacterium flavum* CCM 251, *C. glutamicum* RM3, *Bacillus subtilis* PY79, *P. larvae* 38, *P. larvae* 4486, *P. larvae* 5680, *E.coli* JM110, *E. coli* XL1Blue.



Graf 1. Porovnanie lytickej aktivity endolyzínu na jednotlivých substrátoch meranej pomocou optickej metódy

Záver

Pripravili sme konštrukty pET-EC a pET-EN s naklonovaným endolyzínom bakteriofága phiBP. Získali sme enzymaticky aktívny endolyzín bakteriofága phiBP v rozpustnej frakcii, ktorý sme izolovali a purifikovali cez diskontinuálnu afinitnú chromatografiu na metalochelátovom nosiči s kobaltom. Lytickú aktivitu endolyzínu sme špecifikovali pomocou difúznej a optickej metódy.

Pod'akovanie

Práca bola vypracovaná v Laboratóriu genomiky na Ústave molekulárnej biológie SAV, pod odborným vedením RNDr. Gabriely Bukovskej, CSc. Experimentálna časť bola financovaná z grantových prostriedkov grantu APVV-0098-10.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Lavigne R., Briens Y., Hertveldt K., et al. (2004) Cell. Mol. Life Sci. 61, p. 2753
- [2] Fischetti V.A. (2010) J. Med. Mikrobiol. 300, p. 357
- [3] Halgašová N., Ugorčáková J., Gerová M., et al. (2010) Microbiol Lett. 305, p. 128
- [4] Ausubel., et.al (1992) Current protocols in molecular biology, Wiley New York
- [5] Yokoi K. J, Sugahara K., Iguchi A., et al. (2008) Gene. 416, p. 66
- [6] Donovan, D.M., Foster-Frey, J. (2008) FEMS Microbiol Lett. 287, p22

Genetické determinanty rezistencie voči erytromycínu u potravinových a klinických izolátov *Staphylococcus* spp.

Judita Mezovská, Mária Mikulášová, Romana Chovanová

Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, judit.mezovska@gmail.com

Abstrakt

The aim of this study was to determine the genetic basis of resistance to MLS_B antibiotics in *Staphylococcus* spp. isolates from sheep cheese (bryndza) and to compare it with that of clinical isolates. The phenotype resistance was detected using disc diffusion method, including the D-zone test for detection of inducible resistance and the minimal inhibition concentration of antibiotics was detected by microdilution method. We detected resistance mediated by methylation with *erm(A)*, *erm(B)* and *erm(C)* genes, efflux mechanism encoded by *msr(A)* gene and enzymatic inactivation of macrolides encoded by *mph(C)* gene. The food isolates showed lower rate of resistance in the comparison to clinical isolates.

Kľúčové slová: *Staphylococcus*; rezistencia; erytromycín

Úvod a formulácia cieľa

Erytromycín patrí do skupiny makrolidových antibiotík, ktoré majú podobné spektrum účinku ako penicilíny a často sa predpisujú ľuďom s alergiou na penicilíny. Používajú sa aj na liečbu zvieracích infekcií, konkrétne na liečbu mastitíd u kráv [1]. Ich rozšírené používanie viedlo už po roku klinického užívania k izolácii rezistentných kmeňov *S. aureus* [2, 3]. Rezistentné kmene boli izolované ako z klinických vzoriek, pacientov a personálu tak aj z viacerých potravín živočíšneho pôvodu, hlavne z mäsa a fermentovaných mäsových produktov, ale aj z mlieka, syrov, jogurtov a iných mliečnych produktov [4, 5, 6, 7, 8].

Mechanizmus pôsobenia erytromycínu spočíva v stimulácii odpájania molekúl peptidyl-tRNA od ribozómov v priebehu elongácie peptidového reťazca. Rezistenciu voči erytromycínu podmieňuje u gram pozitívnych ako aj gram negatívnych mikroorganizmov celkom 65 rôznych génov rezistencie [6]. Produkty týchto génov kódujú rôzne mechanizmy rezistencie vrátane efluxných púmp, modifikácie cieľového miesta metyláciou rRNA, alebo enzymatickej inaktivácie makrolidov. Z týchto génov sa u rodu *Staphylococcus* častejšie nachádzajú gény *erm(A)*, *erm(C)* a *msr(A)* a to buď samé alebo v kombinácii [9, 10, 11, 12]. Gény *erm* sú súčasťou transpozónov, ktoré sú uložené na plazmide alebo sa nachádzajú na chromozóme. Metylácia rRNA vedie ku krížovej rezistencii voči makrolidom, linkozamidom a streptogramínu B (MLS_B rezistencia). Táto rezistencia je konštitutívna alebo inducibilná [13].

Ak sa jedná o konštitutívnu rezistenciu *erm* gény sú stále exprimované a kmene preukazujú *in vitro* rezistenciu voči erytromycínu, klindamycínu a iným druhom MLS. V prípade inducibilnej rezistencie *erm* gény vyžadujú induktor aby sa prejavila rezistencia voči klindamycínu. Silným induktorom metylácie je erytromycín. Takéto kmene sú pri *in vitro* testovaní rezistentné voči erytromycínu a citlivé na klindamycín [14, 15, 16, 17]. Na testovanie, či sa jedná o inducibilnú alebo konštitutívnu rezistenciu sa používa disková difúzna metóda (D zónový test) [18]. Kmene, ktoré majú *msr(A)* gén hoci sú rezistentné voči erytromycínu, sú stále citlivé na linkozamidy [17].

Cieľom práce bolo izolovať a identifikovať baktérie rodu *Staphylococcus* z bryndze, stanoviť ich citlivosť na makrolidové antibiotiká fenotypovými metódami a použitím PCR stanoviť prítomnosť genetických determinantov rezistencie voči erytromycínu.

Materiál a metódy

Stafylokoky sme izolovali postupom podľa normy STN EN ISO 8261 z dvoch vzoriek bryndze zakúpených v komerčnej sieti [19]. Vzorky boli identifikované fenotypovými aj genotypovými metódami. Rodovú príslušnosť sme potvrdili modifikovanou multiplex PCR s rodovo špecifickými primermi Tstag422 a Tstag765 postupom podľa Morot-Bizot et al. 2004 [20]. Klinické izoláty sme obdržali z Mikrobiologického ústavu LFUK.

Diskový difúzny test - použili sme disky s erytromycínom (15 µg), klindamycínom (2 µg), linkomycínom (2 µg) (Himedia, India) a Mueller-Hinton agar (Himedia, India). Rezistentné izoláty sme detegovali podľa kritérií uvedených v tab.1. Inducibilnú rezistenciu β MLS_B sme testovali s využitím D zónového testu podľa Fiebelkorn et al. 2003 [18].

Minimálnu inhibičnú koncentráciu (MIC) erytromycínu sme stanovili mikrodilučnou metódou s koncentráciou erytromycínu 1 - 128 µg/l.

Prítomnosť génov kódujúcich rezistenciu voči erytromycínu [*msr(A)*, *erm(A)*, *emr(B)*, *erm(C)*] sme stanovili PCR reakciou s použitím primerov a protokolu podľa Martineau et al., 2000 [21]. Prítomnosť génu *mph(C)* sme stanovil podľa Luthje and Schwarz, 2006 [11].

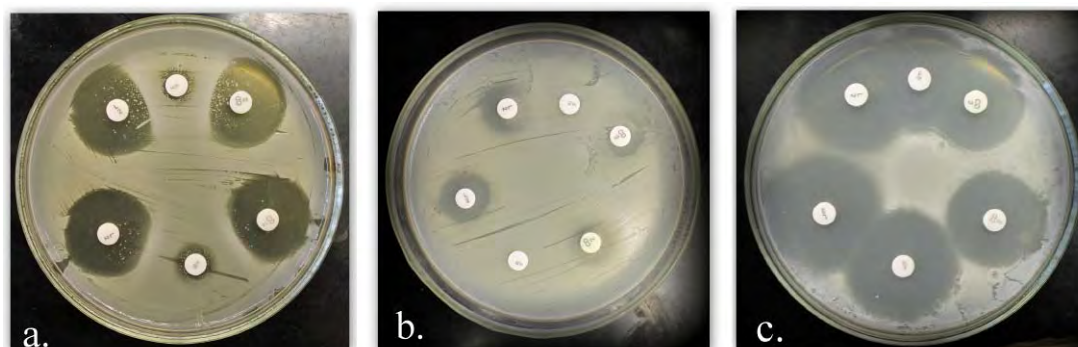
Výsledky a diskusia

V práci sme sledovali rezistenciu voči antibiotikám zo skupiny MLS_B u 26 potravinových a 18 klinických izolátov stafylokokov. Hraničné hodnoty inhibičných zón v diskovom difúznom teste ako aj počet kmeňov citlivých, resp. rezistentných voči sledovaným antibiotikám sú v tab. 1

Tab. 1 Hraničné hodnoty inhibičných zón pre zaradenie bakteriálneho kmeňa ako citlivý (C), intermediárne rezistentný (IR) alebo rezistentný (R) a počet potravinových a klinických izolátov spadajúcich do daných kategórií

	Hraničné hodnoty (mm)			Potravinové izoláty (n=26)			Klinické izoláty (n=18)		
	R	IR	C	R	IR	C	R	IR	C
ERY	≤ 13	14-22	≥ 23	7	5	14	13	1	4
CLI	≤ 14	15-20	≥ 21	6	17	3	6	10	2
LIN	≤ 14	15-20	≥ 21	5	17	4	6	6	6

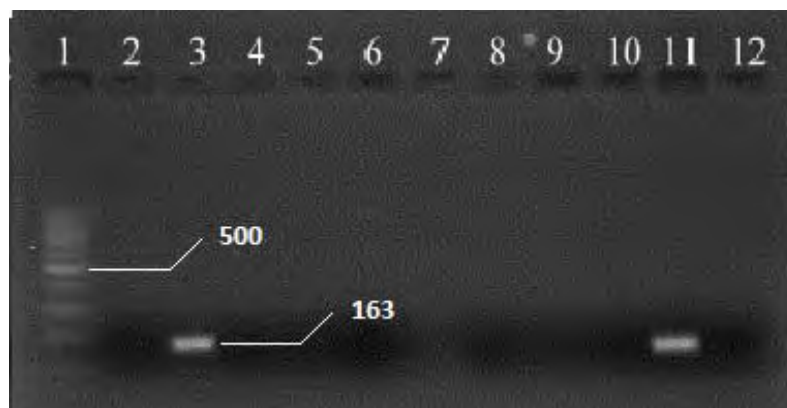
Vyšší počet rezistentných kmeňov sme zaznamenali u klinických izolátov, pričom 12 z 18 kmeňov bolo rezistentných zároveň voči všetkým trom antibiotikám. U 7 kmeňov sa prejavila inducibilná rezistencia voči klindamycínu a linkomycínu (β MLS_B) (Obr. 1). Z 26 potravinových izolátov sme rezistenciu voči erytromycínu zaznamenali len u 7 kmeňov a u 2 kmeňov sme zistili inducibilnú rezistenciu. Minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) erytromycínu stanovená mikrodilučnou metódou u potravinových kmeňov kolíše v rozpätí od 2 μ g/ml po >128 μ g/ml. MIC erytromycínu u všetkých rezistentných klinických izolátov je vysoká, 64 μ g/ml až >128 μ g/ml.



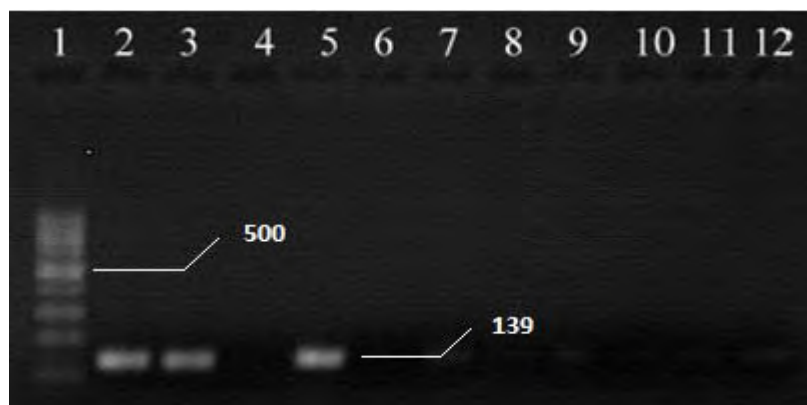
Obr.1 a. Inducibilná rezistencia voči klindamycínu; b. Kmeň rezistentný voči linkomycínu, erytromycínu a klindamycínu; c. Kmeň citlivý na linkomycín, erytromycín a klindamycín. Jednotlivé disky sú uložené v poradí linkomycín, erytromycín, klindamycín

Gény sledované prostredníctvom PCR kódujúce rezistenciu voči erytromycínu sa nachádzali samé alebo v kombinácii vo všetkých rezistentných klinických izolátoch, zatiaľ čo ich výskyt v potravinových izolátoch bol zriedkavejší. U potravinových izolátov bol častejšie zastúpený gén *msr(A)*, ktorý sa nachádzal u 4 izolátov, u jedného v kombinácii s génom *mph(C)*. Zo skupiny génov *erm* sme len u dvoch izolátov potvrdili prítomnosť génu *erm(B)*, gény *erm(A)* a *erm(C)* sme nepotvrdili ani u jedného z potravinových izolátov. U klinických kmeňov bol výskyt génov rezistencie častejší. Gén *msr(A)* sa nachádzal v 10 izolátoch, pričom v kombinácii s génom *mph(C)* sa nachádzal v 7 kmeňoch, z ktorých 6 bolo

identifikovaných ako *S. epidermidis* a jeden kmeň ako *S. aureus*. Gény *erm(A)* a *erm(C)* sa nachádzali v izolátoch len v kombinácii s ďalšími génmi. Súčasná prítomnosť viacerých *erm* génov je popisovaná u stafylokokov [9, 11, 22]. Na obr. 2 - 4 sú PCR produkty získané po amplifikácii bakteriálnej DNA s primermi špecifickými pre jednotlivé gény rezistencie.



Obr. 2 Dráha 1 – štandard molekulevej hmotnosti, dráhy 3, 11 vzorky pozitívne pre gén *msr(A)*



Obr. 3 Dráha 1 – štandard molekulevej hmotnosti, dráhy 2, 3, 5 vzorky pozitívne pre gén *erm(A)*



Obr. 4 Dráha 1 – štandard molekulevej hmotnosti, dráhy 2, 3, 4, 6, 7 vzorky pozitívne pre gén *erm(C)*

Záver

V práci sme porovnali výskyt rezistencie voči antibiotikám zo skupiny MLS_B u stafylokokov izolovaných z potravín a klinických vzoriek. Vyšší výskyt génov kódujúcich rezistenciu sme stanovili u klinických kmeňov, čomu zodpovedajú aj výsledky diskovej difúznej metódy a vysoké hodnoty MIC. Potravínové izoláty boli rezistentné v nižšej miere a sledované gény rezistencie sa nám nepodarilo v mnohých prípadoch dokázať.

Pod'akovanie

Tento príspevok je výsledkom realizácie projektu (ITMS 26240120027) podporeného OPVaV financovaného EFRR a bol podporený projektom VEGA 1/0892/11.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Erskine R. J., Wagner S. A., DeGraves F. J. (2003) *Vet. Clin. North Am. Food Anim.* 19, p. 109
- [2] Schlegelova J., Babak V., Klimova E., et al. (2002) *J. Vet. Med. B.* 49, p. 216
- [3] de Allori M. C., Jure M. A., Romero C., et al. (2006) *Biol. Pharm. Bull.* 29, p. 1592
- [4] Saeed A., Khan A., Mohamed S., et al. (2000) *J. Clin. Microbiol.* 38, p. 1832
- [5] Wilson P., Andrews J. A., Charlesworth R., et al. (2003) *J. Antimicrob. Chemother.* 51, p. 186
- [6] Schlegelova J., Vlkova H., Babak V. et al. (2008) *Vet. Med.* 53, p. 307
- [7] Zdolec N., Dobranić V., Filipović I., et al. (2012) *Folia Vet.* 56, p. 60
- [8] Yurdakul N. E., Erginkaya Z., Ünal E. (2013) *Czech J. Food Sci.* 31, p. 14
- [9] Eady E. A., Ross J. I., Tipper J. L., et al. (1993) *J. Antimicrob. Chemother.* 31, p. 211
- [10] Lina G., Quaglia A., Reverdy M.E., et al. (1999) *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, p. 1062
- [11] Luthje P., Schwarz S. (2006) *J. Antimicrob. Chemother.* 57, p. 966
- [12] Bagcigil F. A., Moodley A., Baptiste K. E., et al. (2007) *Vet. Microbiol.* 121, p. 307
- [13] Weisblum B. (1985) *J. Antimicrob. Chemother.* 16, p. 63
- [14] Lewis J. S. 2nd, Jorgensen J. H. (2005) *Clin. Infect. Dis.* 40, p. 280
- [15] Levin T. P., Suh B., Axelrod P., et al. (2005) *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, p. 1222
- [16] Rao G. G. (2000) *J. Antimicrob. Chemother.* 45, p. 71511
- [17] Drinkovic D., Fuller E. R., Shore K. P., et al. (2000) *J. Antimicrob. Chemother.* 48, p. 315

- [18] Fiebelkorn K. R., Crawford S. A., McElmeel M. L., et al. (2003) *J. Clin. Microbiol.* 41, p. 4740
- [19] Valáriková J. (2012) Diplomová práca, Katedra mikrobiológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, SR
- [20] Morot-Bizot S. C., Talon R., Leroy S. (2004) *J. Appl. Microbiol.* 97, p. 1087
- [21] Martineau F., Picard F. J., Lansac N., et al. (2000) *J. Clin. Microbiol.* 44, p. 231
- [22] Jensen L. B., Frimodt-Moller N., Aarestrup F. M. (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 170, p. 151

Stanovenie divergencie divorastúcich a domestikovaných taxónov pšenice pomocou indexu fixácie (F_{ST})

Veronika Michalcová¹, Maja Al Beyroutiová¹, Miroslav Sabo², Roman Dušínský¹, Miroslav Švec¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra Genetiky, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; michalcova@fns.uniba.sk

²Slovenská Technická Univerzita v Bratislave, Stavebná fakulta, Katedra Matematiky a Deskriptívnej geometrie, Radlinského 11, 813 68 Bratislava, Slovenská republika

Abstrakt

Till this day most of the cultured plants have been characterized as subspecies in correlation with their wild relatives. The degree of divergence was the corner stone of our studies, where we compared the degree of divergence between tetraploid species; *Triticum timopheevii*, *Triticum turgidum*, and their wild ancestors. TERGAP (Transposable Elements – Resistance genes analog polymorphism) polymorphisms provided us with binary data needed for divergence calculation. A high degree of divergence was discovered between domesticated forms and their ancestors, based on the values of fixation index (F_{ST}). The highest divergence was found between *armeniicum* and *timopheevii* subspecies belonging to *Triticum timopheevii* species, also between *diccoides* and *polonicum* subspecies included in *Triticum turgidum* species. No significant degree of divergence was detected among the domesticated subspecies, unlike the wild subspecies *Triticum timopheevii* subsp. *armeniicum* and *T. turgidum* subsp. *diccoides*.

Kľúčové slová: tetraploidná pšenica; index fixácie; TERGAP; divergencia

Úvod a formulácia cieľa

Ako je známe, niektoré kultúrne rastliny majú status druhov, iné sú zase považované za poddruhy. V prípade pšenice sú zaužívané dva rôzne protichodné spôsoby klasifikácie: klasifikácia podľa Dorofeeva [1] a klasifikácia podľa Van Slagerena [2]. Dorofeevov taxonomický systém je starší a je založený na morfolologickej podobnosti. Tento systém definuje každý pšeničný taxón ako samostatný druh, a teda roznáva celkovo 26 druhov [1]. Van Slagerenova klasifikácia je na rozdiel od tej Dorofeevovej založená na genetických poznatkoch a schopnosti jednotlivých taxónov krížiť sa medzi sebou. To znamená, že taxóny, ktoré po krížení produkujú fertílne potomstvo, sú považované za poddruhy. Naopak, taxóny, ktoré nie sú schopné krížiť sa medzi sebou za vzniku fertílného potomstva, sú klasifikované ako druhy [2].

Rastlinné druhy majú špecifickú genetickú konštitúciu, ktorá sa vyvinula predovšetkým na základe existencie reprodukčných bariér. Tieto bariéry chránia genofond rastlín pred inkorporáciou cudzích génov. Samotná existencia reprodukčných bariér však nie je jediným kritériom pri identifikácii druhov medzi divorastúcimi a kultúrnymi rastlinami. Niektoré druhy sú schopné krížiť sa medzi sebou a produkovať fertílne potomstvo

v laboratórnych podmienkach, ale v prírode to nie je možné kvôli rôznym lokalitám, v ktorých rastú. Ďalšou reprodukčnou bariérou medzi pšeničnými druhmi je fakt, že väčšina kultúrnych pšeničných taxónov je samoopelivá, a preto k medzidruhovej výmene genetického materiálu dochádza len veľmi zriedkavo. Z toho vyplýva, že v prírode pšeničné druhy nemajú tendenciu produkovať medzidruhových hybridov [3], takže z tohto hľadiska je logickou Van Slagerenova klasifikácia pšeničných taxónov. Tento taxonomický systém zahŕňa šesť druhov (dva diploidné, dva tetraploidné a dva hexaploidné) a 17 poddruhov. V Génovej Banke v Beltsville, USA (GRIN) [4] bola na základe Van Slagerenových poznatkov odvodená podobná taxonomická klasifikácia.

Práve kvôli nejasnému statusu (druh/poddruh) domestikovaných pšeníc a taktiež kvôli nedostatku poznatkov o divergencii pšeníc sme sa rozhodli skombinovať molekulárne a štatistické metódy za účelom potvrdenia jednej z vyššie spomenutých klasifikácií domestikovaných pšeníc. Na tento účel sme vyvinuli PCR metódu TERGAP (*Transposable Element – Resistance Gene Analog Polymorphism*), ktorá je založená na kombinácii primeru odvodeného z analógu génov rezistencie a primeru odvodeného zo sekvencie retrotranspozónu. Za pomoci tejto technológie sme získali binárne dáta, ktoré sme použili na výpočet indexu fixácie. Index fixácie F_{ST} je mierou genetických vzdialeností a diferenciácie populácií [5, 6]. Vo všeobecnosti sa jeho výpočet zakladá na dátach získaných z polymorfizmov, v našom prípade sú to binárne dáta získané metódou TERGAP. Index fixácie je často vyjadrovaný ako pomer genetickej diverzity vzhľadom ku frekvencii alel medzi jednotlivými populáciami.

Materiál a metódy

Izolácia vzoriek DNA

V experimentoch sme pracovali so vzorkami 50 tetraploidných pšeníc. Vzorky DNA sme izolovali pomocou CTAB extrakčného roztoku [200 mmol.l⁻¹ Tris-HCl (pH 8,0), 1,4 mol.l⁻¹ NaCl, 20 mmol.l⁻¹ EDTA, 2% (w/v) CTAB, 0,2% (v/v) 2-merkaptoetanol] a komerčne distribuovaného kitu High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) zo zŕn pšeníc patriacich do poddruhov *Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii* (Zhuk.) (TIM), *Triticum timopheevii* subsp. *armeniicum* (Jakubz.) (ARM), *Triticum turgidum* subsp. *diccoides* Thell. (DCS), *Triticum turgidum* subsp. *dicoccum* (Schrank) (DIM), *Triticum turgidum* subsp. *turgidum* (TRG), *Triticum turgidum* subsp. *carthlicum* (Nevski) (CAR), *Triticum turgidum* subsp. *durum* (DUR), *Triticum turgidum* subsp. *turanicum* (TRN), *Triticum turgidum* subsp. *polonicum* (PLN) a zo zŕn jedného tetraploidného druhu *Triticum ispahanicum* Heslot (ISP).

Nomenklatúra taxónov použitá v tomto článku zodpovedá nomenklatúre Génovej Banky v Beltsville, USA [4].

TERGAP

Izolovanú DNA sme analyzovali pomocou metódy TERGAP. PCR mix pozostával z: 1 x zmes PCR pufrov 1:1 (GoTaq, Promega; TrueStart, Fermentas); 1 U *Taq* polymerázy (TrueStart, Fermentas); 2,0 mM MgCl₂; 0,25 mM dNTP; 0,4 μM primery a 30 ng templátovej DNA v celkovom objeme 12,5 μl. V experimentoch sme použili 17 primerových kombinácií. PCR prebiehala v nasledujúcich cykloch: počiatková denaturácia 95°C (2 min); 34 cyklov s teplotami 94°C (45 sec), 54°C (45 sec), 72°C (2min); záverečná polymerizácia 72°C (7 min). Výsledky amplifikácie sme hodnotili na 1,5% agarózovom elektroforetickom géli, fragmenty sme separovali 2,5 h pri konštantnom napätí 100 V (3,5 V/cm vzdialenosti elektród) a dofarbovali roztokom etídium bromidu.

Štatistické hodnotenie binárnych dát

Profily DNA bandov sme vizualizovali pomocou Vilber Lourmat Gel Documentation system a detegované bandy sme roztriedili na základe ich veľkostí v bázoých pároch pomocou softvéru Bio-1D (Vilber Lourmat, France). Na základe výstupu z tohto softvéru sme manuálne skonštruovali binárnu maticu, a to pridelením hodnoty 1 ku každému prítomnému bandu určitej veľkosti a hodnoty 0 každému neprítomnému bandu. Na analýzu molekulárnej variácie medzi taxónmi sme použili program AMOVA z balíka štatistických programov Arlequin (verzia 3.5) a na výpočet hodnôt F_{ST} sme si zvolili distančnú metódu „Population pairwise“. Na vizualizáciu divergencie sme si zvolili tvorbu fylogenetického stromu. Pomocou metódy normalizácie hodnôt F_{ST} [7] sme tieto transformovali a fylogenetickú analýzu sme robili v programe PHYLIP, verzia 3.69 [8]. Výsledný fylogenetický strom sme vizualizovali v programe Mega5 [9].

Výsledky a diskusia

V experimentoch sme zisťovali taxonomický status domestikovaných tetraploidných pšeníc. Na dosiahnutie tohto cieľa sme si vybrali výpočet hodnôt indexu fixácie. Výsledky tejto štatistickej metódy boli hodnoty v rozpätí 0 až 1, kde 0 znázorňuje najnižšiu hodnotu diferenciácie a 1 najvyššiu (tabuľka 1).

Tab. 1 Párové hodnoty F_{ST} medzi populáciami získané distančnou metódou „Pairwise differences“. Prázdne bunky znázorňujú diagonálu, čísla nad diagonálou vyjadrujú hodnoty F_{ST} medzi jednotlivými populáciami (taxónmi), čísla pod diagonálou vyjadrujú P-hodnoty so štandardnými odchýlkami

	ARM	TIM	DCS	DIM	ISP	TRG	CAR	DUR	TRN	PLN
ARM		0.74626	0.75865	0.78857	0.86276	0.83807	0.85720	0.87393	0.82108	0.87830
TIM	0.00901± 0.0091		0.80239	0.81647	0.87274	0.86047	0.87220	0.88742	0.83871	0.88457
DCS	0.01802± 0.0121	0.00901± 0.0091		0.34673	0.55356	0.69048	0.69542	0.69393	0.62963	0.71743
DIM	0.00000± 0.0000	0.02703± 0.0194	0.00000± 0.0000		0.31096	0.69585	0.67436	0.71421	0.61907	0.74249
ISP	0.00901± 0.0091	0.00901± 0.0091	0.00901± 0.0091	0.03604± 0.0201		0.78792	0.77711	0.80301	0.71503	0.78916
TRG	0.01802± 0.0121	0.03604± 0.0201	0.00901± 0.0091	0.00000± 0.0000	0.00000± 0.0000		0.35256	0.56458	0.50076	0.66808
CAR	0.01802± 0.0121	0.00000± 0.0000	0.02703± 0.0139	0.00000± 0.0000	0.01802± 0.0121	0.00000± 0.0000		0.51276	0.45976	0.66692
DUR	0.00000± 0.0000	0.00000± 0.0000	0.00901± 0.0091	0.00901± 0.0091	0.01802± 0.0121	0.00901± 0.0091	0.00901± 0.0091		0.40908	0.55543
TRN	0.00000± 0.0000	0.01802± 0.0121	0.00901± 0.0091	0.03604± 0.0148	0.02703± 0.0139	0.01802± 0.0121	0.00000± 0.0000	0.01802± 0.0121		0.41429
PLN	0.00000± 0.0000	0.00000± 0.0000	0.00901± 0.0091	0.00000± 0.0000	0.00000± 0.0000	0.01802± 0.0121	0.02703± 0.0194	0.00901± 0.0091	0.02703± 0.0139	

Porovnávali sme F_{ST} hodnoty domestikovaných pšeníc z poddruhu *timopheevii* a divorastúcich pšeníc z poddruhu *armeniicum*; a domestikovaných taxónov *dicoccum*, *turgidum*, *carthlicum*, *durum*, *turanicum*, *polonicum* a *ispahanicum* s divorastúcim poddruhom *dicoccoides*. Toto porovnanie sme založili na hypotéze, že ak sú hodnoty F_{ST} medzi kultigénom a jeho predkom rovnaké ako medzi populáciami *dicoccoides* a *armeniicum*, môžeme tieto kultigény klasifikovať ako samostatné druhy. Čím je vyššia hodnota F_{ST} , tým je vyššia aj divergencia, a preto ak má mať určitý taxón status poddruhu, musí byť jeho F_{ST} nižšie ako 0,75865 (F_{ST} medzi ARM a DCS). Na základe týchto predpokladov môžeme považovať všetky analyzované taxóny za poddruhy, dokonca aj taxón *Triticum ispahanicum*, ktorý bol Dorofeevom [1] a databázou GRIN [4] klasifikovaný ako samostatný druh. Všetky naše výsledky sú štatisticky preukazné, pretože ich P-hodnoty sú nižšie ako 0,05, čo znamená, že všetky populácie sú od seba odlišiteľné.

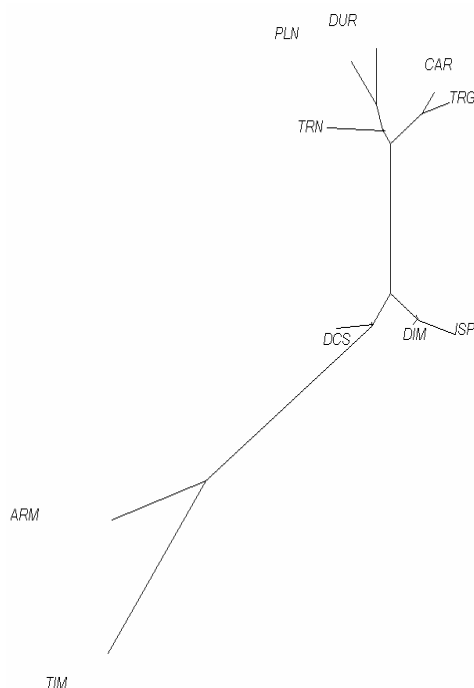
Naše výsledky preukázali, že domestikované plevnaté pšenice DIM a ISP sú menej divergované od divorastúceho plevnatého poddruhu *dicoccoides* ako nahozrnné pšenice TRG, CAR, DUR, TRN a PLN. Domestikovaná plevnatá pšenica dvojrznová (DIM) sa zo všetkých skúmaných taxónov logicky najviac podobala divorastúcej pšenici dvojrznej (DCS). Najviac divergovanou bola populácia *polonicum*.

Do druhu *Triticum timopheevii* sa zahŕňajú len dva poddruhy: divorastúci *armeniicum* a domestikovaný *timopheevii*. Pri porovnaní hodnôt F_{ST} medzi týmito dvomi populáciami s hodnotami F_{ST} medzi divorastúcimi populáciami ARM a DCS boli tieto

hodnoty veľmi podobné, nie však rovnaké, z čoho usudzujeme, že taxóny *timopheevii* a *armeniicum* sú veľmi divergované, ale napriek tomu ich nemožno považovať za samostatné druhy.

Na vizualizáciu divergencie našich vybraných populácií tetraploidných pšeníc sme si zvolili tvorbu fylogenetického stromu (obr. 1), v rámci ktorého sa jasne oddelili vetvy pšeníc nesúcich G genóm (TIM a ARM) od pšeníc s B genómom (pšenice z druhu *T. turgidum*). V tejto skupine sa ďalej oddelili fylogeneticky staršie plevnaté pšenice (DCS, DIM a ISP) od nahozrnných (TRN, PLN, DUR, CAR, TRG). Logické rozdelenie fylogenetického stromu poverdzuje správnosť našich analýz pomocou hodnôt indexu fixácie.

Pre dokonalejšie preskúmanie divergencie tetraploidných pšeníc a potvrdenie našich doterajších výsledkov budú nutné analýzy reprodukčnej izolácie.



Obr. 1 Fylogenetický strom vizualizujúci divergenciu populácií tetraploidných pšeníc

Záver

V našich experimentoch sme určovali taxonomický status a divergenciu tetraploidných pšeníc. Komparatívna analýza hodnôt indexu fixácie medzi populáciami dokázala, že všetky analyzované taxóny by mali byť klasifikované ako poddruhy. Znamená to, že tetraploidné pšenice by mali byť zaradené len do dvoch druhov: *Triticum timopheevii* (poddruhy *T. timopheevii* subsp. *timopheevii* a *T. timopheevii* subsp. *armeniicum*) a *Triticum turgidum* (poddruhy *T. turgidum* subsp. *dicoccoides*, *dicoccum*, *ispahanicum*, *turgidum*,

turanicum, *polonicum* a *durum*). Je zaujímavé, že pšenica *T. ispahanicum*, ktorú Dorofeev aj databáza GRIN klasifikujú ako samostatný druh, sa podľa našich výsledkov zdá byť podobnejšia divorastúcej pšenici dvojrzrovej ako domestikované nahozrné pšenice. Pomocou fylogenetického stromu zostaveného na základe hodnôt indexu fixácie sme vizualizovali divergenciu tetraploidných pšeníc. Vzhľadom na to, že strom je členený podľa našich doterajších poznatkov aj predpokladov, usudzujeme, že výsledky získané z výpočtov indexu fixácie budú prínosom pre ďalšie štúdium divergencie a aj taxonómie rodu *Triticum*. Napriek tomu, že sú naše výsledky štatisticky preukazné, je nutné ich potvrdiť analýzou reprodukčnej izolácie.

PodĎakovanie

"Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmlúv č. APVV-0661-10 a č. APVV-0197-10“.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Dorofeev V. F., Filatenko A. A., Migushova E. F., et al. (1979) Wheat. vol. 1. Flora of Cultivated Plants. Kolos. p. 346
- [2] Van Slageren M. W. (1994) Wageningen Agriculture University Papers. **7**, p. 513
- [3] Goncharov N. P. (2011) Plant Syst. Evol. 259, p. 1
- [4] Germplasm Resources Information Network (GRIN) [Citované 20. február 2013] <<http://www.ars-grin.gov/>>
- [5] Wright S. (1951) Ann.Eugen. 15, p. 323
- [6] Wright S. (1965) Evol. 19, p. 395
- [7] Statkin M. (1995) Genetics. 139, p. 457
- [8] Felsenstein J. (2005) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle
- [9] Tamura K., Peterson D., Peterson N., et al. (2011) Mol. Biol. Evol. 28(10), p. 2731

Activity of plasma membrane redox system after growth stimulation

Soňa Michlíková¹, Bengü Özkan²

¹*Comenius University Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Genetics, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovakia; sona.michlikova@gmail.com*

²*Karadeniz Technical University, Faculty of Science, 61080 Trabzon, Turkey*

Abstract

The plasma membrane redox system (PMRS) presents an important defense mechanism against oxidative stress damage. One of its other functions is the ability to stimulate cell growth as a response to a growth signal. Our short study concerns the time scale between the growth stimulation and the actual PMRS activation. We observed how long after primary growth stimulation the cell reacts by the activation of the plasma membrane redox system. We determined that the cell responds immediately, however it needs approximately 10 minutes to reach the peak of the PMRS activity.

Key words: *Plasma Membrane Redox system; growth stimulation; PMRS activation*

Introduction and purpose

The plasma membrane redox system (PMRS) is an electron transport chain in the plasma membrane that transfers electrons from intracellular donors (NADH, ascorbate) to extracellular acceptors outside the cell (Figure 1). PMRS plays a role in defense against oxidative stress damage and appears to reduce oxidative stress acting as a compensatory mechanism during the aging process. Stimulation of the PMRS might allow the cell to maintain redox homeostasis. It plays a protective role during mitochondrial dysfunction when it provides cells with a survival mechanism by lowering oxidative stress. Up-regulation of PMRS activity leads to cell survival and membrane homeostasis under stress conditions and during calorie restriction [1]. Moreover, PMRS is activated by growth factors and it stimulates cell growth. Many studies have shown that PMRS is an important component in cell growth regulation [2, 3].

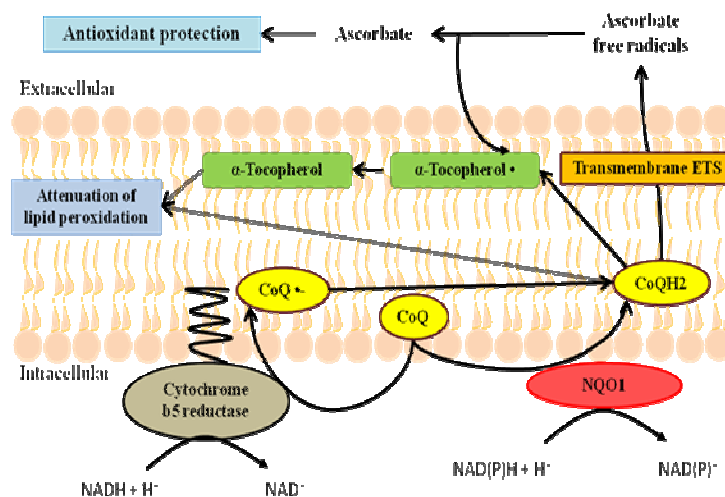


Figure 1 Components of PMRS; Abbreviations: ETS - electron transport system; CoQ - coenzyme Q; NQO1 - NADH-quinone oxidoreductase; modified from [1]

In this experiment we used the PMRS assay to observe changes in activity of plasma membrane redox system after growth stimulation. 3T3 mice fibroblasts were exposed to caloric restriction (serum-free medium) and consequently stimulated to grow by culturing in complete media. Our goal was to determine how long after primary growth stimulation cell reacts to stimulus by activating the PMRS system.

Materials and methods

Organism and culture conditions

3T3 mice fibroblasts were seeded and cultivated for one day at 37°C , according to the obtained protocol.

Next day the cultivated 3T3 mice fibroblasts were transferred to calorie restrictive serum-free media and incubated for one day at 37°C .

Treatments

Starved cells were treated by complete media which served as growth stimuli. A sample for PMRS assay was obtained right after the stimulation and then after 5, 10 and 20 minutes after the growth stimulation. Meanwhile the cells were incubated at 37°C .

Determination of PMRS activity

Obtained PMRS assay protocol was adjusted using cultivated 3T3 mice fibroblasts. We determined the suitable time of incubation to be 20 minutes.

After the growth stimulation PMRS activity was measured by PMRS assay according to adjusted protocol. Absorbance was measured in several time intervals (0, 5, 10 and 20

minutes) starting immediately after stimulation. Increase in absorbance corresponded with increased activity of PMRS.

Results and discussion

We performed previously described procedure three times. Following figures (2-5) reflect changes in PMRS activity in time after primary growth stimulation. Absorbance of starved cells sample without growth stimulation was measured as a control.

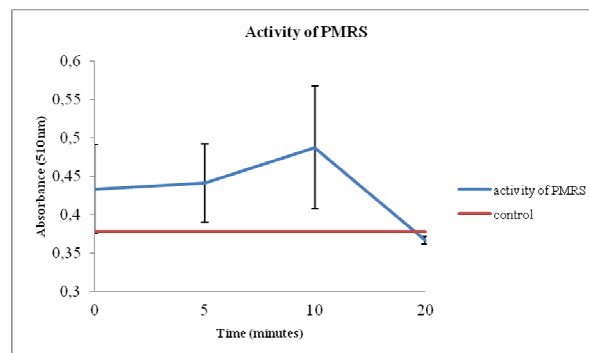


Figure 2 Activity of PMRS, day 1

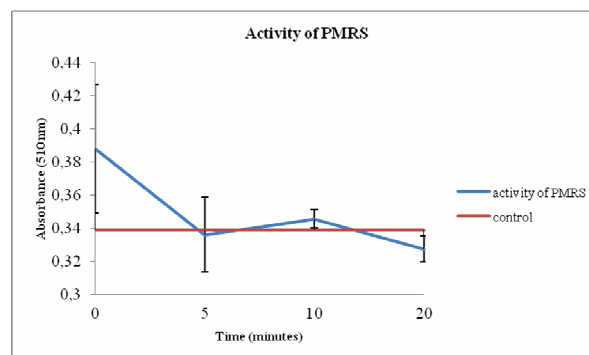


Figure 3 Activity of PMRS, day 2

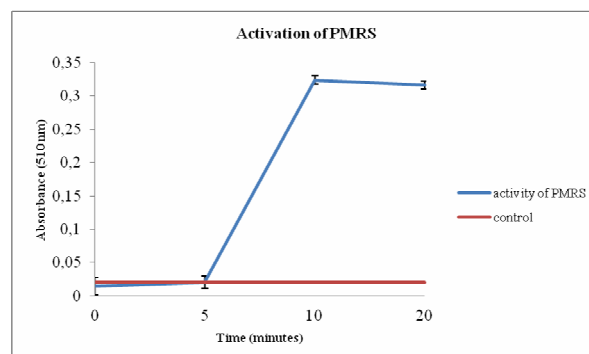


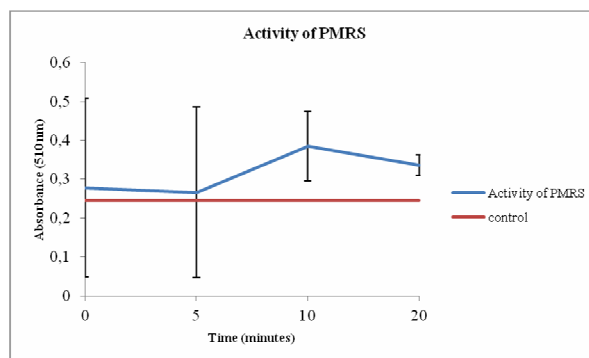
Figure 4 Activity of PMRS, day 3**Figure 5** Activity of PMRS, average of all three experiments

Figure 2 and 3 show immediate increase in PMRS activity right after growth stimulation. In Figure 4 we can see that an apparent error occurred during measurements right after growth stimulation and after 5 minutes. The levels of absorbance in samples were not different from empty wells. The anomaly might have been caused by error during the following of the PMRS assay protocol or the cells were corrupted during the two day incubation. However measurements at 10 and 20 minutes were usable and we can see an increase of absorbation and a peak at 10 minutes and a gradual decrease at 20 minutes.

Figure 5 represents final average graph which shows the changes in activity of the PMRS system after growth stimulation. The relatively big standard error is caused by flaw in third repeat of the experiment.

The plasma membrane redox system is stimulated by growth factors. Since growth factors were not available for this project we imitated the situation by exposing the cells to a calorie-restrictive (serum-free) environment and consequently transferring the cells into complete media. We observed changes in PMRS activity in a time scale from 0 to 20 minutes.

The aim of this project was to determine if and how long after the primary growth stimulation cell responses to the stimuli by activating the PMRS system. We observed immediate increase of the PMRS activity right after the growth stimulation with peak after 10 minutes. After that, the activity gradually decreased.

From these results we can deduce that cell is very flexible in response to growth stimulation, as far as PMRS is concerned. We can also observe a regulatory effect when PMRS activity decreases after the optimal conditions have been restored.

Conclusion

We can conclude that the experiments were consistent with the theory ergo PMRS activity is induced by growth stimulation. However, further experiments are needed, possibly using different analytic method.

Aknowledgements

Our special thanks belongs to our mentors from University of Gothenburg, Sweden, Johanna Gräns and Eva Albertsson for their valuable insight and supervision during the whole project and to Lars Johan Erkell for his practical advice.

References

- [1] Hyun D. H., et al. (2006) Ageing Research Reviews. 5, p. 209
- [2] Crane F. L., Sun I. L., Clark M. G., et al. (1985) Biochimica et Biophysica Acta. 811, p. 233
- [3] Ellem K. A. O., Kay G. F. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 112(1), p.183

Travinno-bylinné spoločenstvá zo zväzov *Cirsio-Brachypodium pinnati* Hadač et Klika ex Klika 1951 a *Geranion sanguinei* Tüxen in Müller 1962 na Devínskej Kobyle (JZ Slovensko) na troch lokalitách mimo územia národnej prírodnej rezervácie

Ján Miškovic, Erik Kerekeš, Andrea Pogányová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra botaniky, Révová 39, 811 02 Bratislava 1, Slovenská republika; miskovic@fns.uniba.sk

Abstrakt

The best explored calcareous grassland communities of Devínska Kobyla Mts. (SW Slovakia) are deforested slopes above the Morava River in a National Nature Reserve. Fragments of the grasslands are situated out of the reserve too. Analyzing of vegetation of these fragments was the aim of our study. We have realized phytocoenological relevés there and we concluded to the classification of the vegetation by the diagnostic and dominant taxa of alliances. Vegetation on the site Devínska lesostep belongs to the alliance *Geranion sanguinei* Tüxen in Müller 1962 and vegetation on the site Úzky les and most of the vegetation on the site Štokeravská vápenka belongs to the alliance *Cirsio-Brachypodium pinnati* Hadač et Klika ex Klika 1951. Species richness is approximately the same at all sites.

Kľúčové slová: *Devínska Kobyla; Geranion sanguinei; Cirsio-Brachypodium pinnati; grasslands.*

Úvod a formulácia cieľa

Výskumom flóry a vegetácie na Devínskej Kobyle, predovšetkým výskumom teplomilných a suchomilných spoločenstiev v národnej prírodnej rezervácii, sa zaoberalo a zaoberá viacero botanikov. Aj keď práce, týkajúce sa niektorých nelesných rastlinných spoločenstiev, boli uverejnené už v prvej polovici 20. storočia [1, 2], prvý prehľad xerothermných travinno-bylinných spoločenstiev rezervácie vznikol v roku 1965 [3]. Nasledovali ďalšie čiastkové práce a nedávno aj aktuálny prehľad travinno-bylinných spoločenstiev rezervácie spolu s analýzou sukcesných zmien [4], ktoré nastali približne po 60. rokoch od ukončenia tradičného spôsobu obhospodarovania, pastvy oviec.

Teplomilné travinno-bylinné spoločenstvá, resp. ich izolované fragmenty, oddelené od seba a od odlesnených častí rezervácie rozsiahlymi lesnými porastmi, sa vyskytujú aj v iných častiach Devínskej Kobyle. Cieľom našej práce bolo prostredníctvom fytoecenologických zápisov zaznamenať nelesnú vegetáciu na troch lokalitách mimo územia rezervácie a po analýze zápisov ju charakterizovať.

Lokality sme si vybrali tri: svah v dolnej časti Prírodnej rezervácie Štokeravská vápenka na severnej strane Devínskej Kobyle nad železničnou traťou (48°12'14,6'' s. š., 17°00'27,4'' v. d.); svah pod žltou značkou značeným turistickým chodníkom z Dúbravky

do Devína na lokalite Úzky les (48°10'54,7'' s.š., 16°59'47,5'' v. d.) a svah na začiatku územia Prírodnej pamiatky Devínska lesostep nad cestou z Karlovej Vsi do Devína (48°10'07,1'' s. š., 16°59'39,7'' v. d.).

Materiál a metódy

Na lokalitách sme realizovali fytoecologické zápisy podľa metód zürišsko-montpellierskej školy [5] s použitím Braun-Blanquetovej kombinovanej stupnice početnosti a pokryvnosti na plochách 25 m². Taxóny machorastov ani ich pokryvnosť sme nezaznamenávali. Fytoecologické zápisy sme zostavili do tabuľky, v ktorej sme vyznačili diagnostické taxóny (druhy) zväzov triedy *Festuco-Brometea* Br.-Bl. et Tüxen ex Soó 1947 a diagnostické taxóny zväzu *Geranion sanguinei* Tüxen in Müller 1962. Travinno-bylinnú vegetáciu na lokalitách sme charakterizovali na základe prítomnosti resp. neprítomnosti diagnostických taxónov zväzov, pokryvnosti dominantných taxónov a druhového bohatstva (species richness) podľa priemerného počtu taxónov v zápise. Názvy taxónov, syntaxónov a diagnostických taxónov zväzov uvádzame podľa nasledovných zdrojov: taxóny [6], diagnostické taxóny zväzu *Geranion sanguinei* Tüxen in Müller 1962 [7], diagnostické taxóny a názvy ostatných syntaxónov [8].

Výsledky a diskusia

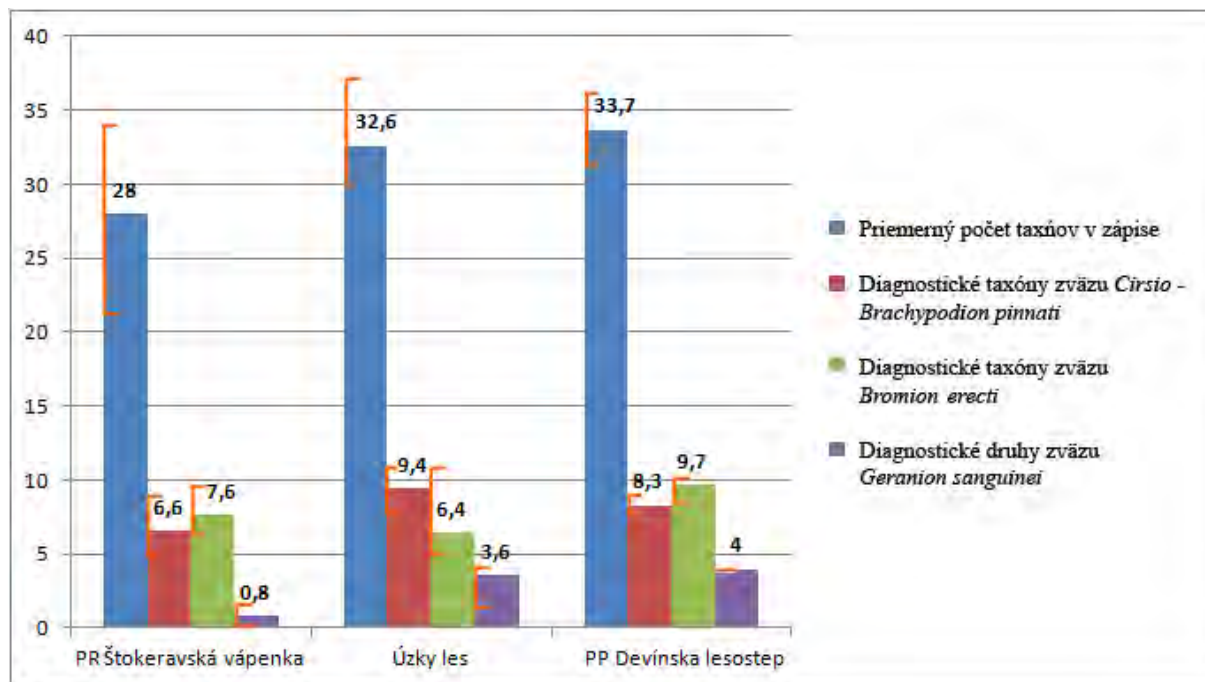
Z fytoecologickej tabuľky (tab. 1) vyplýva, že v porastoch na sledovaných lokalitách sa vyskytujú predovšetkým diagnostické druhy zväzov *Cirsio-Brachypodium pinnati* Hadač et Klika ex Klika 1951 a *Bromion erecti* Koch 1926, prípadne diagnostické druhy spoločné pre obidva zväzy. Zastúpenie jednotlivých diagnostických druhov sa však na lokalitách odlišuje. Týka sa to aj viacerých druhov tráv (čel'ad' *Poaceae*) s vysokou pokryvnosťou, takže porasty na jednotlivých lokalitách majú odlišné dominantné druhy. V Štokeravskej vápenke dominujú *Arrhenatherum elatius* a *Bromus erectus*, pravidelne sa vyskytuje *Anthoxanthum odoratum*, na lokalite Úzky les prevládajú *Bromus erectus* a *Brachypodium pinnatum*, významne je zastúpená *Festuca rupicola*.

Na lokalite Devínska lesostep je situácia odlišná. Dominantou tu nie je tráva, ale *Geranium sanguineum* a dominuje veľmi výrazne. Predovšetkým vzhľadom na túto skutočnosť, v kombinácii s tým, že na lokalite sa konštantne vyskytujú ďalšie diagnostické taxóny zväzu *Geranion sanguinei*, *Peucedanum cervaria* a *Brachypodium pinnatum*, tento porast zaradujeme do zväzu *Geranion sanguinei*.

Tab. 1 Fytocenologická tabuľka zápisov z travinno-bylinných spoločenstiev z lokalít na Devínskej Kobyle. Zápisy 1-5 PR Štokravská vápenka, zápisy 6-10 Úzky les, zápisy 11-15 PP Devínska lesostep

Číslo zápisu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Diagnostické taxóny zväzu <i>Cirsio-Brachypodium pinnati</i>													
<i>Medicago falcata</i>	2a	2b	1	2a	.	1	2a	1	2a	2a	+	1	1
<i>Asperula cynanchica</i>	+	+	+	1	.	+	+	+	+	+	+	.	+
<i>Teucrium chamaedrys</i>	1	2a	1	3	1	1	1	2a	1	1	.	.	.
<i>Securigera varia</i>	1	.	.	2a	+	+	+	2a	.	1	.	.	+
<i>Anthyllis vulneraria</i>	2a	3	2b	2a	1	1	+	+
<i>Linum catharticum</i>	+	.	+	+
<i>Agrimonia eupatoria</i>	+	+	+
<i>Scabiosa ochroleuca</i>	+	+	+
<i>Sanguisorba minor</i>	.	.	.	2a	.	.	+
<i>Ononis spinosa</i>	2a	.	+
Diagnostický taxón zväzov <i>Cirsio-Brachypodium pinnati</i>; <i>Geranion sanguinei</i>													
<i>Tithymalus cyparissias</i>	+	.	2a	2a	.	+	2a	+	+	+	1	+	.
Diagnostický taxón zväzov <i>Cirsio-Brachypodium pinnati</i>; <i>Geranion sanguinei</i>; <i>Bromion erecti</i>													
<i>Brachypodium pinnatum</i>	4	.	3	4	1	2b	2a	2a
Diagnostické taxóny zväzov <i>Cirsio-Brachypodium pinnati</i>; <i>Bromion erecti</i>													
<i>Colymbada scabiosa</i>	.	.	+	.	1	1	+	1	2a	+	1	1	2a
<i>Festuca rupicola</i>	.	+	+	.	.	1	1	1	2a	2a	2b	1	.
<i>Viola hirta</i>	+	.	1	1	.	1	+	1
Diagnostické taxóny zväzu <i>Bromion erecti</i>													
<i>Bromus erectus</i>	2b	4	3	1	1	3	3	3	2a	4	1	+	+
<i>Salvia pratensis</i>	2a	1	2b	1	2a	1	+	.	2b	1	1	+	1
<i>Dactylis glomerata</i>	.	1	2a	1	2a	+	1	.	.	1	+	+	1
<i>Campanula glomerata</i>	+	+	.	+	.	+	.	.	+	.	.	+	+
<i>Anthoxantum odoratum</i>	1	2a	+	1	1	+	.	1
<i>Arrhenatherum elatius</i>	4	2b	3	4	3	2a
<i>Filipendula vulgaris</i>	2a	+	+	1
<i>Chamaecytisus supinus</i>	+	+	+	.
<i>Trommsdorffia maculata</i>	1	1	+	.
<i>Trifolium montanum</i>	.	1	.	1
Diagnostické taxóny zväzu <i>Geranion sanguinei</i>													
<i>Peucedanum cervaria</i>	+	2b	.	+	1	1	2b	1	2b
<i>Geranium sanguineum</i>	2a	.	+	2a	.	4	4	4
Diagnostické taxóny zväzu <i>Festucion valesiacae</i>													
<i>Fragaria viridis</i>	+	1	3	.	1	1	1	1	2a	1	.	.	.
<i>Adonis vernalis</i>	2a	+	2a	.	1
<i>Eryngium campestre</i>	+	+	+	+
<i>Arenaria serpyllifolia</i>	.	+

Číslo zápisu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Diagnostické taxóny zväzov <i>Diantho lumnitzeri-Seslerion</i>; <i>Bromo pannonici-Festucion pallentis</i>													
<i>Anthericum ramosum</i>	2a	2b	2b	4	3	2a	1	2a	2a
<i>Inula ensifolia</i>	+	1	2a	2a	.	.	1	3	+
<i>Helianthemum grandiflorum obscurum</i>	+	1	+	1	+	+	1
<i>Globularia punctata</i>	+
Diagnostický taxón zväzu <i>Bromo pannonici-Festucion pallentis</i>													
<i>Stipa pulcherrima</i>	2a
Diagnostický taxón zväzov <i>Bromo pannonici-Festucion pallentis</i>; <i>Festucion valesiaca</i>													
<i>Bothriochloa ischaemum</i>	2a	1	1	2a	.	.	.
Diagnostické taxóny zväzu <i>Koelerio-Phleion phleoidis</i>													
<i>Phleum phleoides</i>	.	.	+	2a	.	.	.
<i>Trifolium alpestre</i>	+	.	.	.	1	.	.
Diagnostický taxón zväzov <i>Koelerio-Phleion phleoidis</i>; <i>Festucion valesiaca</i>													
<i>Koeleria macrantha</i>	.	.	.	+	.	.	+	.	.	.	+	.	.
Ostatné taxóny (s výskytom aspoň v 2 zápisoch)													
<i>Achillea pannonica</i> + <i>A. setacea</i>	+	+	+	1	1	1	.	2a	1	2a	.	+	.
<i>Astragalus onobrychis</i>	.	+	.	.	.	1	1	.	1	1	1	1	1
<i>Galium glaucum</i>	1	1	2a	1	+	1	+	2a
<i>Thymus pannonicus</i>	.	.	.	1	.	+	1	1	+	1	+	+	.
<i>Briza media</i>	2a	1	1	.	1	+	+	.	+
<i>Galium verum</i>	2a	+	1	+	2b	.	.	.	+	1	.	.	.
<i>Dianthus pontederiae</i>	+	+	+	+	+	.	+
<i>Pyrethrum corymbosum</i>	+	+	.	.	.	+	1	+
<i>Dorycnium pentaphyllum</i>	1	+	1	2a	2a	.	.	.
<i>Genista tinctoria</i>	2a	.	1	2a	.
<i>Hypericum perforatum</i>	.	.	+	+	+	1	+	.	.
<i>Galium album</i>	+	.	.	.	1	.	.	.	+	.	+	.	.
<i>Lotus corniculatus</i>	.	+	.	.	.	+	.	+	1	.	.	.	+
<i>Onobrychis arenaria</i>	2a	.	.	2a	.	1	1	.
<i>Pimpinella saxifraga</i>	+	.	+	+	.	+
<i>Polygonatum odoratum</i>	2a	+	+	.	.	+	.
<i>Rhinanthus minor</i>	1	1	+	.	+	.	.	.
<i>Erysimum diffusum</i>	1	+	.	+	.	.	.
<i>Iris variegata</i>	2b	.	.	1	2b
<i>Jacea pannonica</i>	.	+	1	+
<i>Leontodon incanus</i>	+	.	1	1
<i>Melampyrum nemorosum</i>	+	2a	2a	.
<i>Peucedanum oreoselinum</i>	+	+	+
<i>Plantago media</i>	+	+	.	1
<i>Poa pratensis</i>	.	.	+	.	.	+	+
<i>Scorzonera hispanica</i>	+	.	+	+	.	.	.
<i>Veronica austriaca</i>	+	+	.	.	+



Obr. 1 Priemerný počet taxónov a diagnostických druhov vybraných zväzov v zápisoch na študovaných lokalitách na Devínskej Kobyle. (oranžovou farbou sú znázornené minimálne a maximálne hodnoty)

Porasty v Štokeravskej vápenke a na lokalite Úzky les patria podľa nás do zväzu *Cirsio-Brachypodium pinnati*, aj keď je zastúpenie diagnostických druhov zväzov *Bromion erecti* a *Brachypodium pinnati* na lokalitách pomerne vyrovnané. Ak by sme chceli uvažovať o zaradení do jedného, či druhého zväzu, bolo by potrebné štatisticky vyhodnotiť väčší počet zápisov a porovnať so zápsmi z iných lokalít. Spoločenstvá oboch zväzov bývajú totiž fyziologicky veľmi podobné a nie je rozhodujúce, či je dominantou *Bromus erectus* alebo *Brachypodium pinnatum*, ani to, či je prítomných o niečo viac druhov z jedného alebo druhého zväzu. Takéto, resp. podobné porasty z Národnej prírodnej rezervácie Devínska Kobyla boli zaradené do zväzu *Cirsio-Brachypodium pinnati* [9, 4], v prípade druhej práce na základe štatistickej analýzy väčšieho počtu fytoecologických zápisov (konkrétne ako asociácia *Scabioso ochroleucae-Brachypodietum pinnati* Klika 1933), predpokladáme, že to platí aj pre porasty mimo národnej prírodnej rezervácie. Čo sa týka druhového bohatstva, na základe priemerného počtu druhov v zápise konštatujeme, že porasty sú na všetkých troch lokalitách relatívne druhovo bohaté (obr. 1) a v tomto nie sú medzi lokalitami významnejšie rozdiely. Je potrebné ešte doplniť, že spoločenstvo zo zväzu *Cirsio-Brachypodium pinnati* nie je v Štokeravskej vápenke jediným travinno-bylinným spoločenstvom, na svahu v dolnej časti rezervácie je ale najrozšírenejšie.

Záver

Travinno-bylinné spoločenstvá, uvádzané z Národnej prírodnej rezervácie Devínska Kobyla, sa vyskytujú aj v iných častiach Devínskej Kobyle. Aj keď sú zachované len v podobe navzájom izolovaných fragmentov, sú ešte stále relatívne druhovo bohaté. Okrem lokality Úzky les a podstatnej časti Prírodnej rezervácie Štokeravská vápenka, kde sa vyskytuje spoločenstvo zo zväzu *Cirsio-Brachypodium pinnati* a Prírodnej pamiatky Devínska lesostep s výskytom porastu zo zväzu *Geranion sanguinei*, sa vyskytujú aj na ďalších lokalitách na Devínskej Kobyle, z ktorých zatiaľ nie sú uvádzané.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Domin K. (1931) Věda přír. 12, p. 57
- [2] Nábělek V. (1939) Věda přír. 19, p. 181
- [3] Kaleta M. (1965) Vegetačné pomery Devínskej Kobyle. (Diplomová práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p. 17
- [4] Hegedúšová K., Senko D. (2011) Plant Biosystems. 145, p. 666
- [5] Braun-Blanquet J. (1964) Pflanzensoziologie 3. Auflage. Springer-Verlag, Wien, p. 39
- [6] Marhold K., Goliášová K., Hegedúšová Z. (1998) Paprad'orasty a semenné rastliny. In: Marhold K., Hindák F. (eds.) Zoznam nižších a vyšších rastlín Slovenska. Veda, Bratislava, p. 333
- [7] Hoffmann A. (2007) Svaz THH *Geranion sanguinei* Tüxen in Müller 1961 (§ 2b, nomen nudum). In: Chytrý M. (ed.) Vegetace České republiky 1. Travinná a keříčková vegetace / Vegetation of the Czech Republic 1. Grassland and Heathland Vegetation. Academia, Praha, p. 458
- [8] Janišová M. (2007) Travinno-bylinná vegetácia Slovenska – elektronický expertný systém na identifikáciu syntaxónov. Botanický ústav SAV, Bratislava, p. 29
- [9] Zlínka J. (2004) Biosozologia 2, p. 49

Hodnotenie posturálnej stability žien počas dňa

Miroslava Mokošáková¹, Lucia Kršková¹, František Hlavačka², Michal Zeman¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika,

mokosakova@fns.uniba.sk

²Slovenská akadémia vied, Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Laboratórium regulácie motoriky, Sienkiewiczova 1, 813 71 Bratislava, Slovenská republika

Abstrakt

Maintaining an upright posture is a dynamic process and represents a constant alteration of disrupt and a rapid restoring of balance. Posture monitoring in different parts of day can significantly interact with individual balance control. The aim of the work was to determine the difference in maintenance balance in the morning and in the evening. Postural stability of twenty young healthy women was monitored in eight postural measurements during one month by using inertial measurement device. We observed a significantly better stability of posture in the evening, what may have a negative effect on the results of the measurements of posture, which is commonly carried out irrespective of the time of the measurement. We assume that the gained knowledge can help with timing of measurements of postural stability.

Kľúčové slová: *Posturálna stabilita; rovnováha; postoj.*

Úvod a formulácia cieľa

Rovnováha je nevyhnutná na udržiavanie polohy tela, udržanie stability počas zmeny polohy tela, vykonávanie bežných, každodenných aktivít a na voľný pohyb človeka [1]. V dôsledku segmentálneho usporiadania má telo človeka tendenciu neustále sa vychýľovať z rovnovážnej polohy, takže proces udržiavania stability vzpriameného postoja je spojený s neustálym vyrovnávaním odchýlky tela od vertikály. Pri vzpriamenom postoji v podmienkach zemskej príťažlivosti je rovnovážnou polohou vertikálna poloha tela [2, 3].

Udržiavanie vzpriameného postoja je zabezpečované hierarchicky organizovanými mechanizmami spätnej väzby, ktoré evokujú tvorbu primeraných korekčných pohybov – výchýliek tela. Detekciu výchýliek tela zabezpečujú tri systémy, a to somatosenzorický, vestibulárny a zrakový [4, 5]. Analýza sensorických informácií plní regulačnú funkciu, potom nasleduje centrálné zhodnotenie centrálnym nervovým systémom a vypracovanie koordinovanej nervovo-svalovej odpovede, ktorá je vedená k príslušným kĺbom a svalom zabezpečujúcich bezpečné státie a následne isté držanie tela pri pohybe [6].

Aktivita systémov podieľajúcich sa na posturálnej regulácii sa môže počas rôznych fyziologických stavov meniť. Preto cieľom našej práce bolo zistiť, či je rozdiel v udržiavaní rovnováhy postoja v raňajších a vo večerných hodinách.

Materiál a metódy

Nami realizovaného výskumu sa zúčastnilo 20 zdravých probandov ženského pohlavia vo veku 18 – 23 rokov (priemerný vek 21,3 rokov). Zaradené dobrovoľníčky museli spĺňať nasledovné podmienky – absencia úrazu dolných končatín, vrodených či získaných abnormalít, neurologických a ortopedických ochorení. Pre homogenitu súboru subjektov sme zvolili približne rovnakú vekovú skupinu. Pred meraním boli probandky informované o priebehu merania a všetky s ním dobrovoľne súhlasili podpísaním informovaného súhlasu.

Testovanou úlohou bol prirodzený postoj, počas ktorého sme zaznamenávali predozadné a bočné výchylky tela od vertikály pomocou inerciálneho meracieho zariadenia Xsens (Xsens Technologies B.V., Holandsko). Zariadenie sníma zrýchlenie (3D akcelerometer), uhlovú rýchlosť (3D gyroskop) a namerané údaje prenáša bezdrôtovým prenosom do počítača.

Probandky absolvovali dve posturálne merania za deň, a to v raňajších hodinách (8. – 9. hod.) a vo večerných hodinách (18. – 19. hod.), v pravidelných týždňových intervaloch, v priebehu jedného mesiaca. Dokopy šlo o osem posturálnych meraní v štyroch testovaných situáciách. Monitorovanie postoja: na pevnej podložke s očami otvorenými (OTV) a zatvorenými (ZAT), na mäkkej molitanovej podložke s očami otvorenými (MOT) a zatvorenými (MZA).

Pri monitorovaní postoja sme na chrbát probandky umiestnili 2 inerciálne snímače. Prvý senzor sme upevnili v oblasti piateho lumbálneho stavca (L5) a slúžil na snímanie posturálnych reakcií, teda náklonov dolnej časti trupu. Druhý senzor sme upevnili v oblasti štvrtého torakálneho stavca (Th4) a snímal posturálne reakcie – náklony hornej časti trupu. Inerciálne senzory sme fixovali na telo vyšetrovanej osoby pomocou príslušenstva nazývaného MVN Mounting Straps (Xsens Technologies B.V., Holandsko). Jedná sa o špeciálny kabátik z elastického materiálu a o opasky zo suchých zipsov.

Takto pripravený subjekt pred samotným meraním zaujal vzpriamený postoj bez obuvi s nohami prirodzene vedľa seba, pričom probandka dostala inštrukciu, aby stála vzpriamene a zároveň uvoľnene, s rukami pozdĺž tela a voľne dýchala. Každá testovaná situácia trvala 50 s, počas ktorej subjekt nemohol rozprávať a otáčať sa. Pri meraní postoja s očami otvorenými sa probandka pozerala rovno pred seba na vyznačený bod, ktorý bol vo výške očí vo vzdialenosti 1,5 – 2 m. Pri meraniach postoja s očami zatvorenými mala oči zatvorené. Pri meraniach postoja na mäkkej podložke probandka stála na molitane hrúbky 10 cm. Začiatok a koniec každej situácie bol probandke oznámený. V prípade potreby bola medzi

jednotlivými situáciami krátka prestávka (1 – 3 min), počas ktorej mohol zostať subjekt stáť, alebo sedieť.

Nasnímané posturálne výchylky boli zaznamenávané pomocou príslušného programu Xsens MT Manger, ktorý vykonáva analýzu akcelerometrických a gyroskopických signálov. Vzorkovacia frekvencia digitalizácie signálov bola 100 Hz. Posturálne výchylky tela boli po spracovaní dát, pomocou programu MATLAB, vizualizované na monitore počítača v podobe časových a vektorových záznamov, z ktorých sme získali nasledovné parametre postoja:

- **A_x, A_y** [°] – amplitúdy výchýliek tela v bočnom a v predozadnom smere okolo rovnovážneho bodu,
- **V_x, V_y** [°/s] – rýchlosti výchýliek tela v bočnom a v predozadnom smere,
- **MV** [°/s] – priemerná rýchlosť výchýliek tela v oboch smeroch,
- **TA** [°²] – celková plocha výchýliek tela,
- **RMS** [°] – stredná kvadratická odchýlka výchýliek tela,
- **LI** [mm] – celková trajektória pohybu získaná počas merania v bočnom a v predozadnom smere za čas t .

Parametre **TA** a **RMS** charakterizujú celkovú stabilitu vzpriameného postoja nezávisle na smere výchýliek tela [7].

Štatistické spracovanie dát sme uskutočnili v programe Statistica 7.0 (StatSoft Inc., USA) a použili sme neparametrický Wilcoxonov test.

Výsledky a diskusia

Monitorovaním postoja v dvoch časových intervaloch v rámci dňa sme pozorovali zníženie výchýliek tela a jednotlivých posturálnych parametrov (tab. 1 a 2) vo večerných hodinách, t.j. lepšiu posturálnu stabilitu v porovnaní s ranným meraním, čo dokumentuje aj Litvinenkovej štúdia [8, 9].

Postupné zaťaženie posturálneho systému vyradením zrakovej (zatvorenie očí) a somatosenzorickej (postoj na molitanovej podložke) aferentácie sa prejavilo signifikantnými rozdielmi medzi rannými a večernými meraniami v parametroch postoja – V_x, V_y, MV, LI (tab. 1). Pri postoji na mäkkej molitanovej podložke s očami zatvorenými sa významné časové rozdiely meraní odrazili aj v parametroch – A_y, RMS a TA. V situácii MOT sa preukázal rozdiel v celkovej ploche výchýliek tela a v situácii OTV v strednej kvadratickej odchýlke náklonov tela.

Tab. 1 Porovnanie parametrov postoja získaných z ranných (R) a večerných (V) meraní z oblasti piateho lumbálneho stavca (L5) zaznamenaných v štyroch testovaných situáciách (OTV, ZAT, MOT, MZA)

L5	OTV		ZAT		MOT		MZA	
	R ± SEM	V ± SEM	R ± SEM	V ± SEM	R ± SEM	V ± SEM	R ± SEM	V ± SEM
Ax	0,606 ± 0,058	0,605 ± 0,056	0,622 ± 0,061	0,616 ± 0,063	0,973 ± 0,217	0,961 ± 0,081	1,161 ± 0,112	1,062 ± 0,108
Ay	1,248 ± 0,067	1,213 ± 0,088	1,305 ± 0,080	1,330 ± 0,075	1,570 ± 0,244	1,433 ± 0,048	2,034 ± 0,123	1,856 ± 0,107 **
Vx	1,994 ± 0,123	1,940 ± 0,139	2,086 ± 0,122	1,941 ± 0,133 ***	2,609 ± 0,530	2,424 ± 0,160 **	3,368 ± 0,266	3,012 ± 0,269 **
Vy	1,813 ± 0,077	1,753 ± 0,090	1,902 ± 0,079	1,807 ± 0,083 *	2,267 ± 0,388	2,123 ± 0,107 *	2,987 ± 0,272	2,682 ± 0,207 *
MV	2,994 ± 0,147	2,904 ± 0,175	3,140 ± 0,146	2,947 ± 0,164 ***	3,844 ± 0,681	3,578 ± 0,203 **	5,010 ± 0,409	4,481 ± 0,369 ***
RMS	0,360 ± 0,020	0,351 ± 0,025 *	0,380 ± 0,024	0,379 ± 0,023	0,471 ± 0,078	0,450 ± 0,018	0,606 ± 0,039	0,554 ± 0,035 *
TA	15,868 ± 1,536	15,354 ± 2,201	17,031 ± 1,554	16,366 ± 1,630	27,515 ± 8,234	23,812 ± 1,837 *	46,275 ± 5,519	37,563 ± 4,408 ***
LI	149,714 ± 7,369	145,175 ± 8,734	156,995 ± 7,320	147,329 ± 8,175 **	192,193 ± 34,029	178,895 ± 10,141 **	250,509 ± 20,456	224,044 ± 18,435 ***

Parametre: Ax a Ay – amplitúda výchyliek tela v oboch smeroch, Vx a Vy – rýchlosť výchyliek tela v oboch smeroch, MV – priemerná rýchlosť výchyliek tela, RMS – stredná kvadratická odchýlka výchyliek tela, TA – celková plocha výchyliek tela a LI – trajektória pohybu počas postoja. Situácie: postoj na pevnej podložke s očami otvorenými (OTV) a zatvorenými (ZAT), postoj na mäkkej molitanovej podložke s očami otvorenými (MOT) a zatvorenými (MZA). Hodnoty sú uvádzané ako priemer ± SEM. Štatistické rozdiely sú zvýraznené a hviezdica označuje signifikantnosť rozdielov medzi ranným a večerným meraním v jednotlivých parametroch postoja (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

Zistili sme, že náklony trupu zaznamenané v ranných a večerných hodinách senzorom v oblasti Th4 sa významne líšia v 4 parametroch – Vx, MV, TA, LI – vo všetkých testovaných situáciách (tab. 2). V parametri RMS sme signifikantné rozdiely zistili v situácii postoja na pevnej podložke s očami otvorenými. Na rozdiel od lumbálne umiestneného senzora sa významný rozdiel objavil aj v amplitúde bočných výchyliek tela v situácii MZA.

Tab. 2 Porovnanie parametrov postoja získaných z ranných (R) a večerných (V) meraní z oblasti štvrtého torakálneho stavca (Th4) zaznamenaných v štyroch testovaných situáciách (OTV, ZAT, MOT, MZA).

Th4	OTV		ZAT		MOT		MZA	
	R ± SEM	V ± SEM	R ± SEM	V ± SEM	R ± SEM	V ± SEM	R ± SEM	V ± SEM
Ax	1,267 ± 0,137	1,086 ± 0,063	1,158 ± 0,091	1,074 ± 0,047	1,315 ± 0,082	1,253 ± 0,077	1,524 ± 0,131	1,313 ± 0,083 **
Ay	1,718 ± 0,100	1,616 ± 0,088	1,821 ± 0,086	1,746 ± 0,098	1,997 ± 0,095	1,913 ± 0,113	2,488 ± 0,164	2,335 ± 0,116
Vx	2,315 ± 0,118	2,068 ± 0,125 **	2,317 ± 0,118	2,072 ± 0,127 **	2,551 ± 0,135	2,298 ± 0,145 ***	2,832 ± 0,173	2,530 ± 0,184 **
Vy	1,787 ± 0,097	1,735 ± 0,094	1,876 ± 0,103	1,797 ± 0,093	2,035 ± 0,100	1,976 ± 0,090	2,476 ± 0,164	2,360 ± 0,159
MV	3,247 ± 0,163	3,003 ± 0,167 **	3,313 ± 0,167	3,055 ± 0,167 **	3,628 ± 0,180	3,377 ± 0,179 **	4,193 ± 0,257	3,857 ± 0,263 **
RMS	0,561 ± 0,036	0,503 ± 0,026 *	0,560 ± 0,027	0,530 ± 0,025	0,620 ± 0,027	0,592 ± 0,033	0,755 ± 0,052	0,691 ± 0,035
TA	27,780 ± 2,846	22,343 ± 1,930 ***	27,892 ± 2,405	24,038 ± 1,978 **	33,246 ± 2,580	29,792 ± 2,628 *	48,172 ± 5,869	39,823 ± 4,383 **
LI	162,373 ± 8,172	150,157 ± 8,341 **	165,665 ± 8,327	152,737 ± 8,363 **	181,388 ± 8,964	168,873 ± 8,961 **	209,634 ± 12,840	192,855 ± 13,157 **

Parametre: Ax a Ay – amplitúda výchýliek tela v oboch smeroch, Vx a Vy – rýchlosť výchýliek tela v oboch smeroch, MV – priemerná rýchlosť výchýliek tela, RMS – stredná kvadratická odchýlka výchýliek tela, TA – celková plocha výchýliek tela a LI – trajektória pohybu počas postoja. Situácie: postoj na pevnej podložke s očami otvorenými (OTV) a zatvoreným (ZAT), postoj na mäkkej molitanovej podložke s očami otvorenými (MOT) a zatvorenými (MZA). Hodnoty sú uvádzané ako priemer ± SEM. Štatistické rozdiely sú zvýraznené a hviezdíčka označuje signifikantnosť rozdielov medzi ranným a večerným meraním v jednotlivých parametroch postoja (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

Záver

Zistili sme, že nami testované zdravé probandy mali lepšiu posturálnu stabilitu tela vo večerných hodinách a to aj napriek narušeniu dôležitých senzorických informácií, ktoré sú dôležité pri regulácii postoja.

Pod'akovanie

Ďakujem zúčastneným dobrovoľníckam, grantom VEGA 2/0107/12, 2/0138/13 a APVV – 150.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Lee H. K. M., Scudds R. H. (2003) Age. Ageing. 32(6), p. 643
- [2] Wunsch Z., Dostál C., Veselý A. (1977) Základy lékařské kybernetiky. Avicenum, Praha, p. 492
- [3] Mergner T., Siebold C., Schweigart G., et al. (1991) Exp. Brain. Res. 85(2), p. 389
- [4] Takahashi M., Nakano H., Kanaya K. (1996) Acta. Otolaryngol. 116(2), p. 177
- [5] Peterka R. J. (2002) J. Neurophysiol. 88(3), p. 1097
- [6] Schubert E. (1991). Fyziológia človeka. Osveta, Martin, s. 288
- [7] Hlavačka F., Kunderát J., Křížková M., et al. (1990) Československá neurologie a neurochirurgie. 53/86(2), p. 107
- [8] Litvinenková V. (1970) Acta. Nerv. Super. 12(2), p. 147
- [9] Litvinenková V. (1972) Československá hygiena, 17(8), p. 264

Neproductívna infekcia myšacieho herpetického vírusu MHV-68 *in vitro*

Veronika Mrázová, Miroslava Šupolíková, František Golais

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie
a virológie, Mlynská Dolina B2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika,
Mrazova.Veronika1@gmail.com*

Abstract

Human dermal fibroblasts (DF) and murine NIH 3T3 cells were infected with MHV-68 at a multiplicity of infection (MOI) ranging from 0,001 to 0,01 and cultivated for 24 hours at 41°C, or with an inhibitor of DNA synthesis phosphonoacetic acid (PAA) at a concentration of 100-200 µg/ml. Under these conditions no viral replication took place. Following the temperature shift to 37°C, or the PAA removal the replication of virus reappeared, however, there was a delay (latent period) of 4-5 days. During this latent period in both cases a substance resembling previously described herpes virus related growth factors was detected in the culture medium of infected cells. This new substance was designed MHV growth factor (MHGF). MHGF production increased in the presence of human leucocyte interferon in DF cells or in the presence of mouse fibroblast interferon in NIH 3T3 cells. Both cells cultivated in the presence of interferon and antiserum against MHV acquired the transformed phenotype ("criss-cross" pattern of growth). However, this cell transformation was not stable, when the cells were passaged, a cytopathic effect appeared after 3-4 passages and cells degenerated.

Kľúčové slová: *MHV-68; neproductívna infekcia; vírusový rastový faktor; transformácia buniek*

Úvod a formulácia cieľa

V bunkách neproductívne infikovaných herpetickými vírusmi bola identifikovaná osobitná trieda látok pripomínajúcich rastové faktory s transformačným účinkom na netransformované bunky a potláčajúca transformovaný fenotyp v transformovaných bunkách [1]. Bolo dokázané, že aj myšší herpetický vírus MHV-68 je schopný produkovať takýto faktor, ktorý bol označený ako MHGF [2, 3, 4, 5]. V predkladanej práci sme študovali produkciu rastového faktora kódovaného myšacím herpetickým vírusom na dvoch modeloch neproductívnej infekcie. V prvom modeli sú bunky infikované herpetickým vírusom a kultivované pri 41°C [6, 7, 8], v druhom modeli sú infikované bunky kultivované v prítomnosti inhibítorov syntézy DNA, ako je napr. AraC (Arabinofuranozylcytidín) [9], alebo kyselina fosfónoocetová (PAA) [10].

Materiál a metódy

Vírus a bunkové kultúry. Prototypový vírus MHV-68 bol kultivovaný v ľudských dermálnych fibroblastoch (DF) a v myších bunkách NIH 3T3. Na testovanie transformačnej aktivity MHGF sme používali škrečie bunky BHK-21, alebo NIH 3T3, na dôkaz potláčania

transformovaného fenotypu sme používali bunky HeLa. Všetky bunkové línie boli kultivované v médiu DMEM, ktoré obsahovalo 5-10% inaktívne fetálne bovínne sérum.

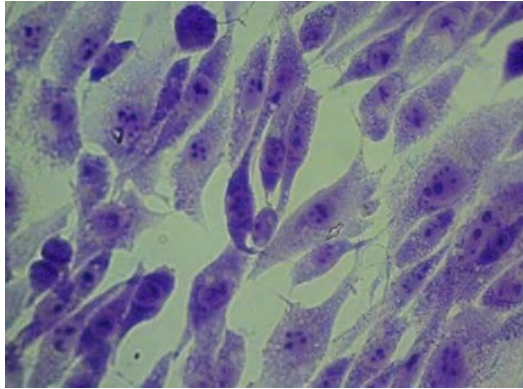
Neproduktívna infekcia s MHV-68. V prvej časti práce boli bunky DF a NIH 3T3 infikované o multiplicitate infekcie (MOI) 0,001 – 0,01 a kultivované 24 hod. pri teplote 41 °C. Potom boli trypsinizované a ďalej pasážované pri 37°C. V jednej kultivačnej fľaštičke boli bunky kultivované v intaktnom médiu, bunkám v druhej kultivačnej fľaštičke bolo pridané 2% králičie antisérum proti MHV a tretia fľaštička s bunkami bola kultivovaná v prítomnosti ľudského leukocytárneho interferónu (IFN) (PBL Interferon source, USA), resp. myšieho fibroblastového IFN (PBL interferon source, USA) (10^5 j./ml) a tretia časť buniek bola kultivovaná aj v prítomnosti protilátok aj IFN. Vo všetkých uvedených prípadoch boli bunky subpasážované 1x do týždňa a kultivované za rovnakých podmienok. Ako kontrola slúžili infikované bunky kultivované pri 37°C.

V druhej časti práce boli bunky DF a NIH 3T3 opracované po dobu 2 hod. s PAA (Alfa Aesar) 100 a 200 µg/ml a potom podobne infikované s MHV-68, PAA bola v médiu ponechaná. Časť buniek kultivovaná bez PAA slúžila ako kontrola. Po 24 hod. bola PAA odstránená, bunky boli trypsinizované a ďalej kultivované ako v prvej časti pokusu.

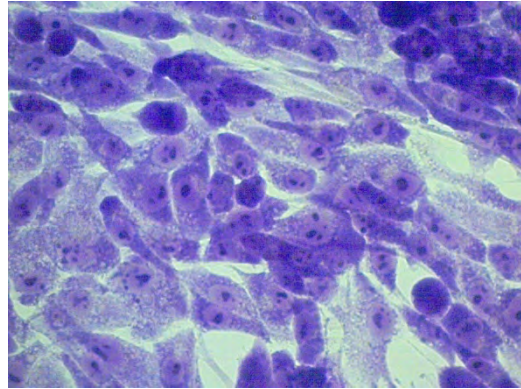
Výsledky a diskusia

V bunkách kultivovaných pri 37°C boli pozorované už po 24 hod. náznaky cytopatického efektu (CPE) a v priebehu ďalších dvoch dní došlo k úplnej degenerácii buniek. Naproti tomu bunky kultivované pri 41°C, alebo v prítomnosti PAA boli bez CPE. CPE sa objavil až po znížení teploty, alebo po odstránení PAA, nie však okamžite, ale až po 4-5 dňoch latentnej bezvírusovej periódy, čo je v súlade s inými publikovanými prácami [6-10]. Počas latentnej periódy nebol v médiu dokázaný infekčný vírus, ak však bolo takéto médium pridané k bunkám BHK-21, alebo NIH 3T3 bunky získali transformovaný fenotyp, oproti tomu v bunkách HeLa došlo k potlačeniu transformovaného fenotypu, čo je možné pripísať MHGF syntetizovanému v bunkách počas latentnej periódy (Obr. 1). Obidve aktivity boli neutralizované dvoma monoklonálnymi protilátkami (MP) voči glykoproteínu B (gB) MHV-68 (MG-1A12, SC-9E8) [11, 12]. IFN prítomný v médiu zvyšoval koncentráciu MHGF (Obr. 2). Zaujímavý efekt bol pozorovaný v bunkách kultivovaných v prítomnosti protilátok a IFN. Tieto bunky získali vzhľad transformovaných buniek. Pokúšali sme sa tieto bunky ďalej pasážovať v snahe udržať ich transformovaný fenotyp, prípadne derivovať z nich líniu buniek transformovaných MHV, v bunkách sa však po 3-4 pasážach objavil CPE (Obr. 3). Niet

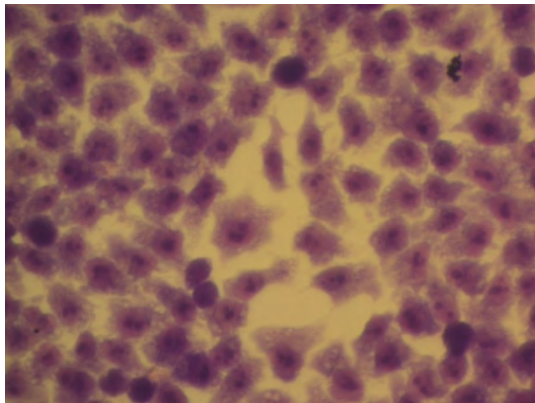
pochýb, že MHV má transformačnú schopnosť *in vitro*, nepodarilo sa nám však úplne potlačiť lytickú schopnosť tohto vírusu. To bude cieľom našich ďalších experimentov.



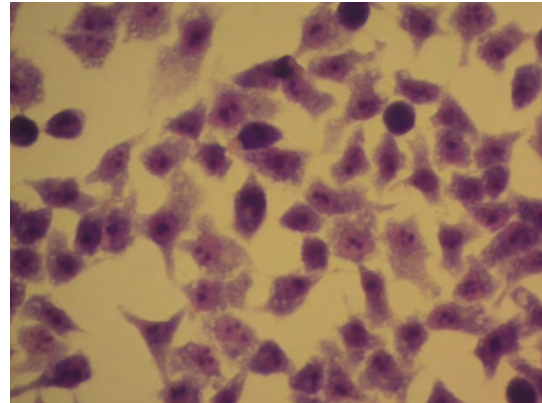
A



B

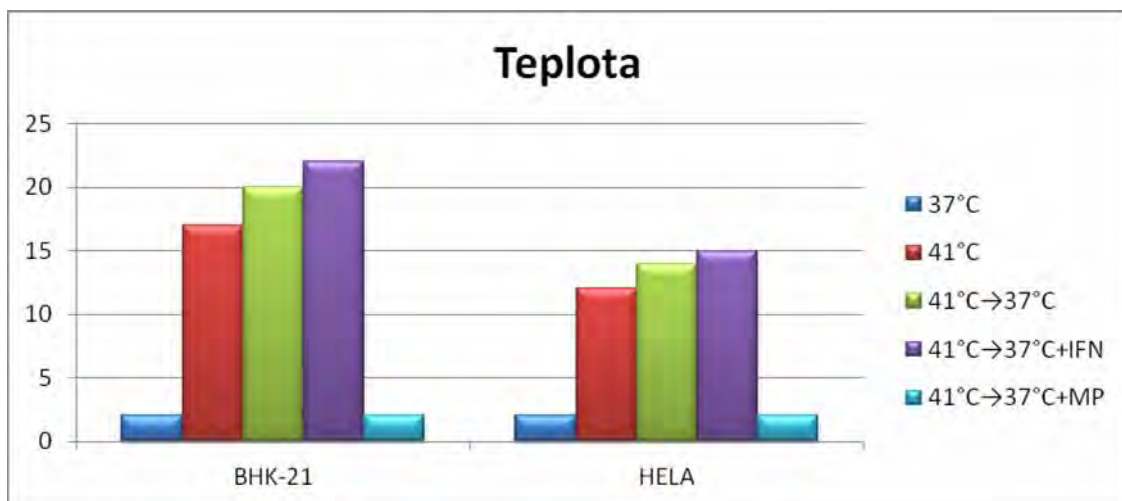


C

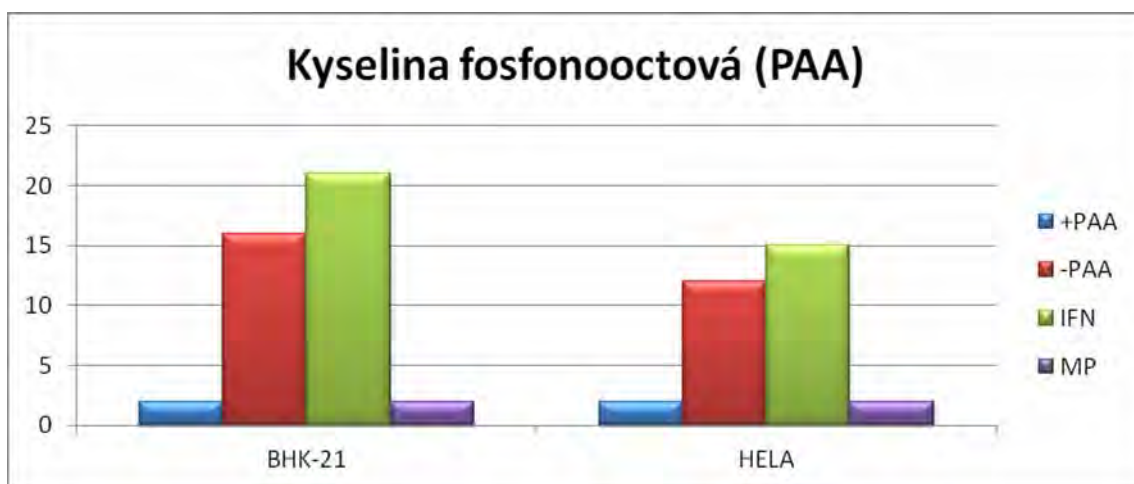


D

Obr. 1 A: kontrolné bunky BHK-21, B: transformovaný fenotyp buniek BHK-21 kultivovaných v prítomnosti MHGF, C: kontrola, bunky HeLa, D: netransformovaný fenotyp buniek HeLa v prítomnosti MHGF

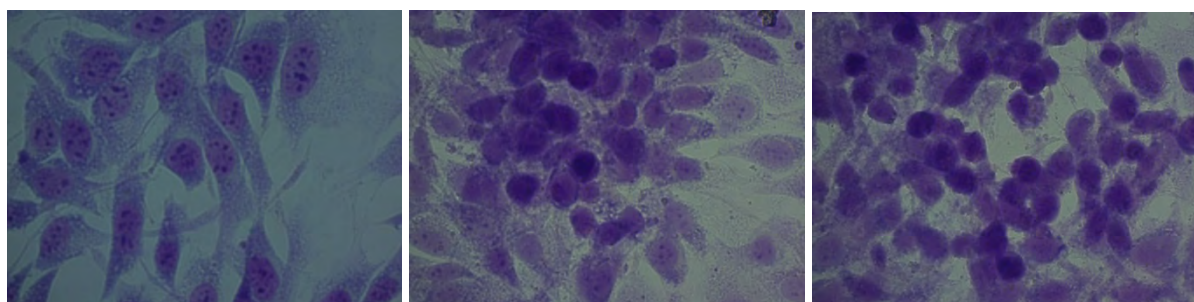


A



B

Obr. 2 Testovanie transformačného a transformáciu potláčajúceho fenotypu MHGF. A: teplota B: PAA
MP- monoklonálne protilátky



A

B

C

Obr. 3 Bunky DF neproduktívne infikované a pasážované v prítomnosti protilátok a IFN. A: transformovaný fenotyp, B: objavujúci sa CPE vo štvrtej pasáži C: výraznejší CPE vo štvrtej pasáži

Záver

Boli definované dva modely neproduktívnej infekcie s myším herpetickým vírusom MHV-68, pri kultivačnej teplote 41°C a v prítomnosti inhibítora syntézy DNA kyseliny fosfónooctovej.

V oboch prípadoch bola neproduktívna infekcia spojená s produkciou rastového faktora MHGF a táto produkcia bola zvyšovaná v prítomnosti IFN.

MHGF, spolu s vírusom je schopný za určitých podmienok navodiť transformáciu buniek *in vitro*, v našom prípade však táto transformácia nebola stabilná, v bunkách sa po určitom čase objavil CPE.

V budúcnosti budeme hľadať podmienky za ktorých by bola lytická a replikačná schopnosť ešte viac potlačená a bolo by možné získať stabilnú líniu buniek transformovaných MHV.

Pod'akovanie

Táto práca bola realizovaná s finančnou podporou VEGA 1/0262/13.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Konvalina I., Gašperík J., Golais F. (2012) Acta Vet. Brno 71, p. 29
- [2] Gašperík J., Ješko J., Golais F. (1996) Boil. Zentbl. 115, p. 71
- [3] Číková, L., Šupolíková M., Marák, J., et al. (2012) Zborník recenzovaných príspevkov 2012, ŠVK, PriF UK Bratislava, SR, p. 92
- [4] Staňová A., Marák J., Šupolíková M., et al. (2012) Advence in Chromatography and Electrophoresis and Chiranal. Medzinárodní konferencie, Olomouc, Univerzita Palackého 2012, p. 160
- [5] Staňová A., Marák J., Šupolíková M., et al. (2012) 19th International Mass Spectrometry Conference Kyoto, Japan 15. – 21. 9. 2012
- [6] Kelleher, J. J., Varani J., Nelson W.W. (1975) Infect Immunity 12, p. 128
- [7] Wrzos H., Rapp F Virus (1987) Virus Res. 8, p 301 .
- [8] Golais F., Sabó A., Rajcáni J., (1978) Acta Virol. 22, p. 6
- [9] O'Neill F. J., Goldberg R. J., Rapp F. (1972) J. Gen. Virol. 14 p. 189
- [10] Colberg-Poley A. M., Isom H., Rapp F. (1979) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 162, p. 235
- [11] Gillet L., Gill M. B., Colaco S., Smith Ch. M., Stevenson P. G. (2006) J. Gen. Virol. 87, p. 3515
- [12] Glauser D. L., Kratz A-S., Gillet L., Stevenson P. G., (2011) J. Gen. Virol. 92, p. 2020

The effect of carbon sources on upstream regulatory regions controlling the expression of the *Candida utilis* α -glucosidase gene

Nina Noskovičová, Hana Halászová, Michaela Osadská, Ján Krahulec, Stanislav Stuchlík, Ján Turňa

Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Molecular biology, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovak republic; n.noskovicova@gmail.com

Abstract

Candida utilis is universally recognised as an important model system that has been approved for use as a GRAS (Generally Recognized as Safe) microorganism by the US Food and Drug Administration. In the last few years it has been demonstrated that *Candida utilis* represents a promising expression host, generating relatively high levels of recombinant proteins. In spite of the industrial importance, the molecular genetics of *C. utilis* is not well understood and up to now, its use for the expression of heterologous proteins is also limited. Consequently, the main goal of our research is to study the strong inducible promoter of alpha-glucosidase gene and find suitable inductors, alternatively repressors, for expression of recombinant proteins.

Key words: *Candida utilis*; α -glucosidase promoter; determination of enzyme activity

Introduction and purpose

Yeasts are an attractive group of lower eukaryotic microorganisms, some of which are used in several industrial processes that include brewing, baking and the production of a variety of biochemical compounds [1]. The development of genetic tools (expression vectors, resistance cassettes and the cre-loxP recombination system) has allowed the efficient production of heterologous products in *Candida utilis*.

Candida utilis has been approved as a GRAS (Generally Recognized as Safe) microorganism by FDA (Food and Drug Administration). Along with *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*, dried *C. utilis* cells have been approved for the use as a food additive [2]. In addition, since efficient methods of *C. utilis* transformation have been developed, the yeast has been used for the heterologous production of industrially and pharmaceutically promising proteins [3]. The strong constitutive promoters chosen to drive the expression of heterologous proteins in *Candida utilis* expression system such as GAP and PGK promoters have been described. On the other hand, the choice of very strong and tightly regulated promoters is essential for the modulation of heterologous gene expression [1].

All known yeasts are able to utilize one or more sugars as their principal source of carbon and energy. Based on various studies, an intracellular α -glucosidase enzyme is responsible for maltose and sucrose utilization in various yeasts such as *H. polymorpha*, *S*

cerevisiae and *C. albicans* [4, 5, 6]. On the other hand, *Candida utilis* α -glucosidase is not well characterized. There is only evidence that the α -glucosidase utilization system of *Candida utilis* is affected by glucose through catabolite repression [7].

Therefore, the aim of this study was to characterize the effect of selected carbon sources on the upstream regulatory regions controlling the expression of α -glucosidase gene.

Material and methods

Strain and cultivation medium

Candida utilis wild-type strain CCY 39-38-18 was used for all experimental work. The yeast cells were cultivated in minimal medium with selected carbon sources. The composition of medium is presented in tab. 1.

Tab. 1 Minimal medium, composition

Minimal medium	Composition
YNB (Yeast Nitrogen Base)	1,34%
Biotin	4×10^{-5} %
Carbon source	2%
K_xPO_4 , pH6	100 mM

Extraction of proteins from *Candida utilis* yeast cells

Yeast cells were grown on different carbon sources until the mid-exponential growth phase and α -glucosidase activity was measured in cell extracts. Cells for the extract preparation were harvested by centrifugation (6000 rpm for 5 min), washed with cold distilled water. Washed cells were suspended in 0,1 ml lysis buffer containing 1% SDS, 0.1 M NaCl, 0.01 M Tris.HCl pH 8.0 and 1 mM EDTA and disrupted using acid-washed glass beads (Sigma) by shaking (20 cycles of 15 seconds at 1-min intervals in an ice bath) in a vortex mixer at maximum speed. Cell-free extracts were obtained by centrifugation of the broken cells suspensions at 13 400 rpm for 5 min. The cell extract was used for measurement of α -glucosidase activity. Protein concentration in the cell extract was determined according to the Bradford protein assay using bovine serum albumin as standard.

Protein determination using the Bradford assay

The Bradford assay is a protein determination method that involves the binding of Coomassie Brilliant Blue G-250 dye to proteins [8]. This methods aims to determine the protein concentration in the cell extract. When the dye binds to protein, it is converted to

a stable blue form. It is this blue protein-dye form that is detected at 595 nm in the assay. For the determination of the protein concentration, 20 µl of the cell extract sample was used. Through the use of the spectrophotometer, the absorbances for proteins in the cell extract were determined.

Determination of α -glucosidase enzyme activity

To determine the activity of α -glucosidase enzyme, we used determination of α -glucosidase activity method by *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNPG). One unit of α -glucosidase was defined as the amount of enzyme needed for hydrolysis of 1 µM of *p*-nitrophenol per minute at 37°C under standard conditions.

Intracellular α -glucosidase activity was measured colorimetrically by the production of *p*-nitrophenol (PNP) from the *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNPG) substrate in the reaction mixture: 800 µl 6 mM PNPG, 199.5 µl 50 mM K_xPO_4 and 0.5 µl cell extract. The reaction was performed for 15 min at 37°C and stopped by addition of 200 µl 1M Na_2CO_3 . PNP formed was measured by absorbance at 405 nm.

The formula used to calculate the enzymatic activity in U/mg is as follows

$$Activity = \frac{A \times V \times 10^6}{m \times t \times \epsilon \times l} \quad [U/mg] \quad [1.]$$

A	absorbance at 405 nm
V	volume (litre)
y	varies according to released unite of product in product definition
m	weight of the sample added to the reaction
t	reaction time (minutes)
ε	molar extinction coefficient for <i>p</i> -nitrophenol
l	thickness of spectrophotometer cuvette

Results and discussion

In the first part of this work we focused on monitoring the growth of wild-type yeast strain *Candida utilis* in minimal media containing selected carbon sources. Based on results summarized from several studies by Kurtzman *et al.* [9], we confirmed the similarity of yeast cells growth in the corresponding minimal media in almost every case, except for soluble starch (tab. 2).

Tab. 2 Overview of selected carbon sources, *Candida utilis* growth monitoring:
+ growth / - no growth observed

Division	Carbon source	Bond	Growth	Kurtzman <i>et al.</i> [9]
Monosaccharides	Arabinose	-	-	-
	Fructose	-	+	+
	Galactose	-	-	-
	Glucose	-	+	+
	Mannose	C2 epimer of glucose	+	+
Disaccharides	Cellobiose	Glc- β (1 \rightarrow 4)-Glc	+	+
	Lactose	Gal- β (1 \rightarrow 4)-Glc	-	-
	Maltose	Glc- α (1 \rightarrow 4)-Glc	+	+
	Sucrose	Glc- α (1 \rightarrow 2)-Fru	+	+
	Trehalose	Glc- α (1 \rightarrow 1)-Glc	+	+
Polysaccharides	Dextran	Glc- α (1 \rightarrow 3)/ α (1 \rightarrow 6)-Glc	-	-
	Soluble starch	Glc- α (1 \rightarrow 4)/ α (16)-Glc	+	-
Alcohols	Ethanol	-	+	+
	Methanol	-	-	-
Sugar alcohols	Glycerol	-	+	+
	Mannitol	-	-	-
	Sorbitol	-	-	-

We assume that the difference could be caused by contamination, alternatively by the ability of yeast *Candida utilis* to hydrolyze and utilize starch used in our laboratory for its growth.

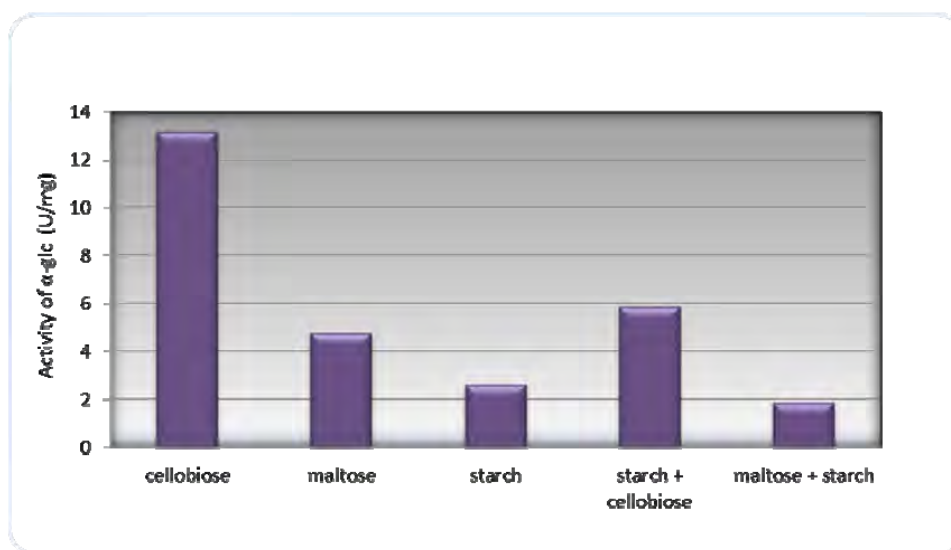
In next part of the work we tested induction of α -glucosidase gene by several saccharides. There are several inductors of α -glucosidase promoter, since α -glucosidase shows affinity for several substrates due to lower substrate specificity. The induction of transcription of *Candida utilis* α -glucosidase promoter is provided by the presence of maltose and trehalose in minimal media [10]. From the results obtained in our study we can conclude, that the presence of cellobiose and starch in the minimal media also trigger the expression of α -glucosidase (tab. 3). Moreover, cellobiose shows an average three times higher activity of α -glucosidase in comparison with maltose (fig. 1).

On the other hand, we focused on identification of potential repressors of α -glucosidase promoter by combining two carbon sources in media (tab. 3).

Tab. 3 Overview of inducers and repressors of α -glucosidase promoter *Candida utilis*

Carbon sources	Inductor	Repressor
Cellobiose	+	
Fructose		+
Glucose		+
Glycerol		+
Lactose		+
Maltose	+	
Soluble starch	+	
Sucrose		+

The aim of the experiment was to select saccharide combination, where one saccharide is primary used for cultivation of yeast cell lines but does not induce the transcription and is also affordable. The other carbon source would not to be used for cultivation purposes, but for induction of protein production at appropriate cell density (fig. 1).

**Fig. 1** Overview of α -glucosidase inducers and selected combination of carbon sources; note: α -glc is α -glucosidase

We have not found the suitable saccharide combination, which would satisfy the above mentioned requirements. This is caused by the repressor effects of the financially more easily available saccharides such as glucose, fructose, and sucrose, which would be used for yeast cell lines cultivation.

Conclusions

In conclusion, we selected new inductors and also repressors of α -glucosidase promoter. At the same time, we confirmed studies from previous years by monitoring the growth of *Candida utilis* yeast in various carbon sources. The only questionable data is still in the case of starch. The selection of suitable carbon source combination for regulated recombinant protein expression under α -glucosidase promoter control still remains unsuccessful. Currently, we are working on the selection of suitable cultivation media composed of wider range of saccharides.

Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: „Industrial research of new drugs based on the recombinant protein” ITMS 26240220034 supported by the Research & Development operation Programme funded by The European Regional Development Fund (ERDF).

References

- [1] Domínguez A., Fermiñán E., Sánchez N., et al. (1998) *Int. Microbiol.* 1(2), p. 131
- [2] Boze H., Moulin G., Galzy P. (1992) *Crit. Rev. Biotechnol.* 12, p. 65
- [3] Tomita Y., Ikeo K., Tamakawa H., et al. (2012) *PLoS ONE.* 7(5), e37226
- [4] Williamson P. R., Huber M. A., Bennett J. E. (1993) *Biochem. J.* 291, p. 765
- [5] Liiv L., Pärn P., Alamäe T. (2001) *Gene.* 26, p. 77
- [6] Krakenaite R. P., Glemzha A. A. (1989) *Biokhimija.* 48, p. 62
- [7] Peinado J. M., Barbero A., Uden N. (1987) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26(2), p. 154
- [8] Bradford M. M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, p. 248
- [9] Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (2011) *The Yeasts. A Taxonomic Study.* Elsevier, Amsterdam, p. 529
- [10] Rolim M. F., Araujo P. S., Panek A. D., et al. (2003) *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36(7), p. 829

Sociálne správanie VPA potkanov – animálneho modelu autizmu

Lucia Olexová, Lucia Kršková

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Mlynská dolina B2, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika;
olexoval@fns.uniba.sk*

Abstrakt

Autism is a neurodevelopmental disorder that is characterized mostly by impaired social behaviour. The other two main symptoms are disturbances in communication and occurrence of stereotypic behaviour. The scientist have created a several animal models of autism, one of them are rats prenatally affected by valproic acid - VPA rats. The aim of our work was to evaluate social behaviour of VPA treated rats, prenatally affected by valproic acid on the 12.5th day of gestation. The animals were tested in sociability test in selected period of ontogeny (25, 46, 76 days *post partum*). VPA treated rats spent significantly more time in the part with unknown animal and in direct interaction with this animal compared to control (K) rats. Latency to initiate direct interaction was significantly decreased in VPA rats. Gender differences were observed in weaning period -VPA females spent significantly more time in direct interaction as K females. Our results suggest that VPA rats are unable to understand intraspecific communicative signals and to perform social behaviors in appropriate contexts.

Kľúčové slová: *autizmus; animálny model; VPA potkany; kyselina valproová; sociálne správanie.*

Úvod a formulácia cieľa

Autizmus je neurovývinové ochorenie charakterizované tzv. triádou poškodení, navonok sa prejavujúcou narušeným sociálnym správaním a komunikáciou a výskytom prvkov stereotypného správania [1]. Vznik tohto ochorenia ostáva doposiaľ neobjasnený, pričom jeho prvé príznaky sa objavujú už vo včasnom postnatálnom období [2].

Porucha sociálneho správania je najtypickejším prejavom autizmu a jej zmeny sú pozorovateľné už v prvých týždňoch života človeka. Už kojenci s neskôr diagnostikovaným autizmom sa vyhýbajú očnému kontaktu a nejavia záujem o ľudské tváre, ako to býva u zdravých jedincov. Nevytvárajú typickú väzbu k matke a málokedy prejavujú strach z odlúčenia od blízkej osoby. Neskôr sa u autistických pacientov rozvíja klasický vzorec narušenia sociálneho správania, ktorý zahŕňa nezaujím o kontakt s inými ľuďmi a slabú alebo žiadnu odpoveď na emócie okolia. Môže dôjsť aj k oneskoreniu vývinu vzťahu k rodine a k zlému používaniu sociálnych signálov [3].

Pre lepšie pochopenie vzniku a priebehu tohto ochorenia vzniklo v súčasnosti viacero animálnych modelov, medzi ktoré patria predovšetkým laboratórne hlodavce (myši a potkany) a tiež voľne žijúci druh (hraboš horský *Microtus montanus*). Niektoré kmene laboratórnych myši alebo rôzne knock-outované zvieratá boli medzi animálne modely

autizmu zaradené na základe toho, že bol u nich popísaný sociálny deficit [4].

Medzi animálne modely autizmu sú zaraďované aj potkany prenatalne ovplyvnené kyselinou valproovou – VPA potkany [5,6]. Kyselina valproová patrí medzi antikonvulzíva a používa sa na liečbu mániodepresívnych stavov [7]. Patrí ale medzi teratogény a jej podanie počas gravidity v čase uzatvárania neurálnej trubice vedie k vzniku malformácii centrálnej nervovej sústavy [8]. Práve aplikácia kyseliny valproovej gravidným samiciam potkana laboratórneho, v kritickej perióde, kedy dochádza k uzatváraniu neurálnej trubice sa používa na vytvorenie tzv. VPA potkanov – animálneho modelu autizmu. Viaceré štúdie odhalili u VPA potkanov jednak neuroanatomické zmeny [5,9] ale aj zmeny v správaní podobné zmenám pozorovaným u autistickej populácie [6, 10, 11, 12, 13].

Štúdie VPA potkanov popísali zmeny v sociálnom správaní, typickom prejave autizmu. Ich sociálne správanie bolo hodnotené v teste priamej interakcie alebo teste sociability, okrem toho u mláďat autori sledovali aj zmeny v hravom správaní. Výsledky odhalili u dospelých VPA potkanov deficit v sociálnom správaní reprezentovaný zníženou sociálnou exploračiou v kombinácii so zvýšenou latenciou k sociálnemu správaniu. U mláďat boli pozorované zmeny v hravom správaní týkajúce sa zníženej frekvencie tzv. „pinningu“ (prvok sociálneho správania kedy jedno zviera leží na chrbte a druhé stojí prednými labami na ňom) [6]. Autori Markram a kolektív [11].u týchto zvierat taktiež potvrdili deficit v sociálnom správaní, VPA potkany sa menej vzájomne explorovali (očuchávali a dotýkali) a zároveň uprednostňovali možnosť ukryť sa pred interakciou s iným zvieraťom. V oboch prípadoch sa jednalo o test priamej sociálnej interakcie. Naopak, autori Narita a kolektív [14]. v spomínanom teste u VPA potkanov nepozorovali žiadne zmeny.

Ďalším testom vyvinutým na odhalenie zmien v sociálnom správaní je test sociability [15]. Testovacia komora tohto testu je rozdelená na tri časti, pričom testované zviera je umiestnené do stredovej časti a ponechané aby sa habituovalo. Do jednej z bočných častí je umiestnená klietka s neznámym zvieraťom, v druhej je umiestnená prázdna klietka. Počas samotného testu sa sleduje či zviera preferuje kontakt s neznámym zvieraťom alebo prázdnu klietkou, počet prechodov medzi jednotlivými časťami testovacej komory, čas, ktorý strávi testované zviera priamou interakciou s neznámym zvieraťom a latencia k prvej priamej interakcii. VPA potkany v tomto teste menej vstupujú do časti s neznámym zvieraťom a zároveň tam trávajú menej času, menej explorajú neznáme zviera a taktiež s ním menej nadväzujú sociálne kontakty [10, 12, 13, 16].

Cieľom našej práce bolo otestovať sociálne správanie VPA potkanov - potkanov

prenatálne (na 12,5-tý deň gravidity) ovplyvnených kyselinou valproovou v teste sociability vo vybraných štádiách ontogenetického vývinu.

Materiál a metódy

V pokuse sme použili potkany kmeňa Wistar (3 kontrolné (K) a 3 ovplyvnené (VPA) vrhy) z chovnej stanice Ústavu experimentálnej farmakológie a toxikológie SAV v Dobrej Vode. Zvieratá boli chované v štandardných svetelných podmienkach, svetlo:tma 12:12 (svetlo o 6:00), pričom vodu a potravu mali k dispozícii *ad libitum*. Výskum bol schválený etickou komisiou PRIF UK v Bratislave.

Samiciam sme na 12,5-tý deň gravidity jednorázovo intraperitoneálne aplikovali valproát sodný (Sigma USA; rozpustený vo fyziologickom roztoku, pH = 7,3; c = 250 mg/ml) v množstve 600 mg/kg živej hmotnosti. Kontrolným samiciam sme na 12,5-tý deň aplikovali rovnaké množstvo fyziologického roztoku. Po pôrode sme samiciam až do odstavu ponechali po 8 mláďat (4 samec a 4 samice). Po odstavu boli zvieratá chované v oddelených klietkach, osobitne samce a osobitne samice v počte 4 zvieratá v jednej klietke.

Testu sociability [15] sme podrobili celkovo 36 jedincov, 18 K (samce n = 9, samice n = 9) a 18 VPA (samce n = 9, samice n = 9). Testovanie prebiehalo v 3 obdobiach ontogenézy: v období odstavu (25. deň PP), v období puberty (46. deň PP) a v období dospelosti (76. deň PP). Testovacia aparátúra pozostávala z plexisklového boxu o rozmeroch 70x70x50 cm. Bola rozdelená na 3 časti: stredová časť (24x70x50 cm) a 2 bočné časti (23x70x50 cm). V prvej fáze testu sme do stredovej časti umiestnili testované zviera, ponechali 10 minút, aby sa habituovalo, pričom dvierka do postranných častí testovacieho boxu boli zatvorené. Následne sme do jednej bočnej časti komory umiestnili klietku s neznámym zvieraťom, v druhej bočnej časti komory bola umiestnená prázdna klietka, otvorili dvierka do postranných častí komory a počas 10 minút sledovali vybrané behaviorálne parametre: počet vstupov a čas strávený vo všetkých častiach testovacej komory (s neznámym zvieraťom, v stredovej časti, s prázdnu klietkou), čas strávený priamou interakciou (očuchávaním) s neznámym zvieraťom a čas strávený očuchávaním prázdnej klietky. Zaznamenávali sme aj latenciu k prvej priamej interakcii.

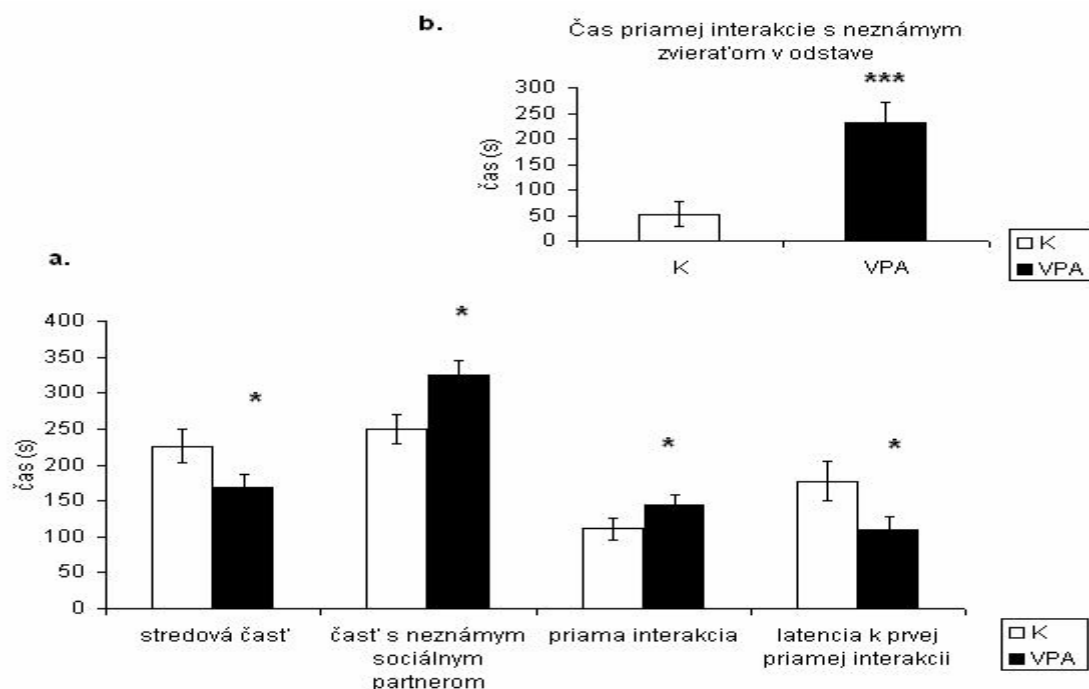
Získané dáta sme spracovali za využitia programu Statistica (v 7.0, StatSoft Inc., USA) a použili sme multifaktorovú analýzu rozptylu s opakovaním s fixnými faktormi skupina, pohlavie a vek. Variabilitu medzi vrhmi sme v analýze zohľadnili ako faktor vrhu testovaný v rámci skupiny. Na *post hoc* analýzu dát sme použili Fisher LSD.

Výsledky a diskusia

Za využitia multifaktorovej analýzy rozptylu sme v parametri čas strávený v stredovej časti zistili signifikantný efekt skupiny ($F_{1,28} = 6,7768$, $p < 0,05$) a podobne tomu bolo aj v parametri čas v časti s neznámym zvierateľom ($F_{1,28} = 7,5131$, $p < 0,05$) a latencia k prvej priamej interakcii ($F_{1,28} = 6,8421$, $p < 0,05$). V parametri čas strávený priamou interakciou s neznámym zvierateľom sme okrem efektu skupiny ($F_{1,28} = 4,5396$, $p < 0,05$) zároveň zaznamenali aj signifikantný efekt interakcie vek*skupina*pohlavie ($F_{2,56} = 4,5233$, $p < 0,05$).

VPA potkany trávili v stredovej časti testovacej komory menej času ako K. Zároveň sa u nich prejavila nižšia latencia k prvej priamej interakcii s neznámym zvierateľom. VPA potkany tiež v porovnaní s kontrolou trávili signifikantne viac času v časti s neznámym zvierateľom a zároveň s ním viac priamo interagovali - viac ho očuhávali (obr. 1 a.).

Čo sa týka medzipohlavných rozdielov, podarilo sa nám zistiť ich prítomnosť iba v období odstavu, kedy VPA samice trávili signifikantne viac času priamou interakciou s neznámym jedincom ako K samice ($p < 0,001$) (obr. 1 b.).



Obr. 1 Signifikantné rozdiely medzi skupinou prenatálne ovplyvnenou kyselinou valproovou (VPA) a kontrolnou (K) skupinou v teste sociability (a.). Rozdiely v čase priamej interakcie s neznámym zvierateľom medzi VPA a K samicami v teste sociability v období odstavu (b.). Dáta sú prezentované ako priemer na jedno zviera a jedno obdobie testovania \pm SEM. Hviezdička znázorňuje signifikantnosť rozdielov medzi VPA a K skupinou (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

Na rozdiel od našich výsledkov, väčšina prác zameraných na zmeny v sociálnom správaní potkanov odhalila skôr pokles času stráveného v časti so sociálnym zvierateľom

a menej vzájomného explorovania [10, 12, 13, 16]. Narita a kolektív [14] však u VPA potkanov vo veku 14 týždňov žiadne zmeny v sociálnom správaní neodhalili.

Podľa autorov Schneider a Przewlocki [6] môže deficit v hravom správaní pozorovaný u VPA potkanov vo veku 30-50 dní súvisieť v dospelosti s neschopnosťou pochopiť a vyjadriť vnútrodrohové signály a vykonávať prvky sociálneho správania v správnom poradí a kontexte.

Zvýšený kontakt s neznámym jedincom v teste sociability môže, ako uvádza Talarovičová [17], súvisieť s neschopnosťou zvierat rozpoznať signály vysielané neznámym jedincom. Podobné neporozumenie sociálnym signálom, prípadne ich zlé používanie bolo pozorované aj u autistickej populácie [3].

Nejednotnosť získaných údajov týkajúcich sa sociálneho správania u VPA zvierat so sebou prináša potrebu detailnejšieho štúdia mozgových štruktúr a neurotransmiterov zodpovedných za túto formu správania.

Záver

VPA potkany trávili v teste sociability viac času v časti s neznámym sociálnym zvierateľom a zároveň viac času priamou interakciou s týmto zvierateľom. Latencia k prvej priamej interakcii bola u týchto potkanov znížená. Medzipohlavné rozdiely sme pozorovali iba v parametri čas priamej interakcie s neznámym zvierateľom, kedy touto aktivitou trávili viac času VPA samice v odstavce. Uvedené behaviorálne zmeny môžu podľa nás súvisieť s narušenou schopnosťou VPA zvierat rozpoznať a pochopiť vnútrodrohové sociálne signály.

PodĎakovanie

Práca bola podporená grantmi VEGA 1/0686/12 a VEGA 2/0107/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] American Psychiatric Association (2000) Dig. Dis. Sci. 45, p. 723
- [2] Levy S. E., Mandell D. S., Schultz R. T. (2009) Lancet. 374(9701), p. 80
- [3] Hrdlička M., Komárek V. (2004) Dětský autismus. Portál, Praha, ČR, p.36
- [4] Olexová L., Talarovičová A., Lewis-Evans B., et al. (2012) Neurosci. Res. 74(3-4), p. 184
- [5] Rodier P. M., Ingram J. L., Tisdale B., et al. (1996) J. Comp. Neurol. 370(20), p. 247
- [6] Schneider T., Przewlocki R. (2005) Neuropsychopharmacol. 30(1), p. 80

- [7] Matička R., (2006) Psychiatr. prax. 1, p. 11
- [8] Ornoy A. (2009) *Reprod. Toxicol.* 28(1), p. 1
- [9] Rodier P. M., Ingram J. L., Tisdale B., et al. (1997) *Reprod. Toxicol.* 11(2-3), p. 417
- [10] Dufour-Rainfray D., Vourc'h P., Le Guisquet A. M., et al. (2010) *Neurosci. Lett.* 470(1), p. 55
- [11] Markram K., Rinaldi T., La Mendola D., et al. (2008) *Neuropsychopharmacol.* 33(4), p. 901
- [12] Kim K. C., Kim P., Go H. S., et al. (2011) *Toxicol. Lett.* 201(2), p. 137
- [13] Kim P., Park J. H., Kwon K. J., et al. (2012) *Food. Chem. Toxicol.* 51, p. 288
- [14] Narita M., Oyabu A., Imura Y., (2010) *Neurosci. Res.* 66(1), p.2
- [15] Crawley J. N. (2004) *Ment. Retard. Dev. D. R.* 10(4), p. 248
- [16] Bambini-Junior V., Rodrigues L., Behr G. A., et al. (2010) *Brain. Res.* 1408, p.8
- [17] Talarovičová A. (2010) Vplyv prenatálne zvýšených hladín androgénov na postnatálny vývin mláďat cicavcov. (Dizertačná práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p. 108

Molekulárna genetika ochorenia Chronická myeloická leukémia

Barbora Onderová, Renáta Lukačková

*Medirex a.s., Galvaniho 17/C, 821 04 Bratislava, Slovenská republika;
basshka@centrum.sk*

Abstrakt

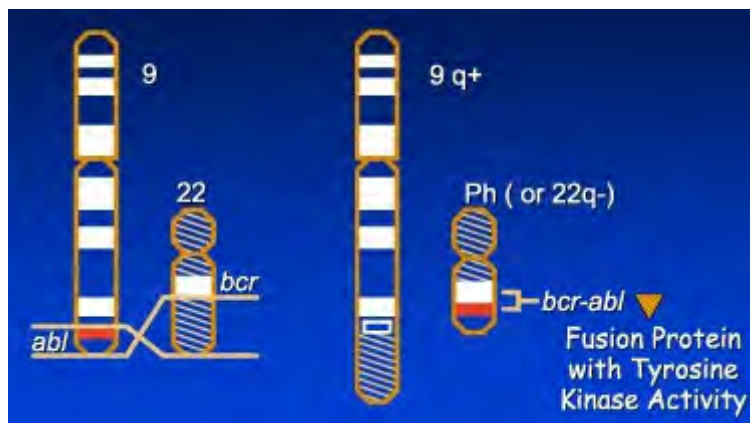
Chronic myeloid leukemia (CML) is the first human cancer associated with a specific chromosomal abnormality, the Philadelphia chromosome (Ph). It is a relatively common hematopoietic stem cell disease with clonal expansion of terminally differentiated myeloid cells. CML is usually taken as a model of cancer, because of the discovery of a *BCR-ABL* oncogene, the functional result of a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22 that generates the mentioned Philadelphia chromosome. The Ph chromosome is found in over 90% of patients with clinical features of CML. Patients with CML who lack Ph chromosome demonstrate molecular evidence of *BCR-ABL* fusion. Our paper presents the importance of molecular methods for the detection of *BCR-ABL* fusion gene.

Kľúčové slová: *chronická myeloická leukémia; translokácia; identifikácia fúzneho génu*

Úvod a formulácia cieľa

Leukémie, nádory krvotvorných tkanív, sú charakterizované prítomnosťou nezrelých zhubných krvných buniek infiltrujúcich a nahrádzajúcich kostnú dreň, ktorá predstavuje primárne miesto krvotvorby u detí a dospelých. Štúdie molekulárnej podstaty leukémií boli ovplyvnené analýzou špecifických chromozomálnych abnormalít spojených s týmito ochoreniami [1]. Vo svojej práci sa sústreďujeme na chronickú myeloickú leukémiu (CML), ktorá patrí do skupiny myeloproliferatívnych ochorení (MPN). Typická je malígnou transformáciou na úrovni kmeňovej krvotvornej bunky s následnou diferenciáciou do myeloidného radu. Klonálnou transformáciou buniek sa zvyšuje proliferácia a znižuje sa apoptóza, čím dochádza k neregulovanej proliferácii a akumulácii myeloidných buniek v kostnej dreni, periférnej krvi, pečeni a slezine [2,3].

Abnormálny chromozóm (Philadelphia chromozóm) u pacientov s CML bol prvou cytogenetickou abnormalitou identifikovanou v ľudskom zhubnom nádore. Následný výskum ukázal, že tento abnormálny chromozóm je výsledkom fúzie dlhých ramienok chromozómov 9 a 22, ktorá produkuje neobvyklý gén s onkogénnymi vlastnosťami. Tento onkogén vyplýva z fúzie *BCR* (*breakpoint cluster region*) a *ABL1* (*v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*) tyrozínkinázového génu [Obr.1] [1]. CML predstavuje klinický model pre molekulovú detekciu, keďže bola prvou známou leukémiou asociovanou so špecifickou chromozomálnou prestavbou [4].



Obr.1 Philadelphia chromozóm t(9;22): *BCR-ABL* gén produkujúci *Bcr-Abl* fúzny proteín s tyrozínkinázovou aktivitou.

CML je relatívne časté ochorenie s incidenciou 1/100000 ročne a mediánom 45-50 rokov. Tvoria 15-20% všetkých leukémií. Väčšina (95%) prípadov má spomínanú charakteristickú chromozomálnu translokáciu t(9;22)(q34;q11) [5].

Onkogén *BCR-ABL* kóduje chimerický onkoproteín *Bcr-Abl* s tyrozínkinázovou aktivitou nachádzajúci sa výlučne iba v cytoplazme. Veľkosť onkoproteínu závisí od miesta zlomu v géne *BCR*, na základe čoho sa potom výsledné fúzne transkripty označujú: b2a2, b3a2, e1a2, e19a2. Pre CML sú najčastejšie sa vyskytujúce produkty b2a2 a b3a2 [3].

Cieľom mojej diplomovej práce bolo identifikovať základný fúzny molekulový marker *BCR-ABL* pomocou multiplexovej PCR slúžiacej ako vstupný monitoring pacientov s podozrením na myeloproliferatívne ochorenie.

Ďalším cieľom bolo v našom súbore CML pacientov overiť inou vhodnou metódou správnosť získaných výsledkov, určiť typy fúznych transkriptov, porovnať koreláciu jednotlivých výsledkov získaných prostredníctvom dvoch metódik (multiplex PCR a metódy melting point so SYBR greenom), ďalej u každého pacienta s diagnostikovanou CML v našom súbore urobiť QRT-PCR a kvantifikovať hladinu expresie fúzneho produktu *BCR-ABL*.

Materiál a metódy

Na oddelení lekárskej genetiky MEDIREX, a.s. sme v období od 1.10. 2011 – 21.11. 2012 vyšetrili 491 vzoriek pacientov s podozrením na myeloproliferatívne ochorenie (MPN). Doručené vzorky pacientov boli získané z periférnej krvi (PK) alebo kostnej drene (KD). V tomto období bola vypracovaná táto štúdia, počas ktorej sa podrobilo molekulovej analýze všetkých 491 pacientov. Väčšina vzoriek súboru si vyžadovala vyšetrenie z dôvodu

monitorovania liečby a menšiu časť súboru CML pozitívnych pacientov tvorili tzv „de novo pacienti“.

Prítomnosť fúzneho génu sme dokazovali 4 metódami molekulovej biológie:

- Multiplex PCR
- Agarózová gélová elektroforéza vs. Bioanalyzér
- RQ-PCR s použitím TaqMan sondy
- Melting curve analýza s použitím SybreGreen

Multiplex PCR- príprava vzoriek pre agarózovú gélovú elektroforézu (Seplex® Leukemia BCR/ABL PCR mix, Seegene)

Na základe tejto reakcie sme detekovali *BCR-ABL* fúzne transkripty zo vzoriek cDNA periférnej krvi alebo kostnej drene pacientov.

Agarózová gélová elektroforéza vs. Bioanalyzér

Elektroforéza patrí v molekulárnej biológii k najpoužívanejším separačným technikám pri analýze nukleových kyselín. cDNA pacientov sme po PCR zafarbili a naniesli na gél. Po dokončení elektroforézy sme identifikovali polohy jednotlivých vzoriek podľa veľkostného markera a analyzovali [6].

Rýchlejší priebeh elektroforézy v porovnaní s bežnou agarózovou elektroforézou predstavuje prístroj Bioanalyzer 2100 (*Agilent technologies*). Celý prístroj sa skladá z čipovej stanice a čipu, do ktorého sa nanášajú jednotlivé vzorky a komponenty kitu Agilent DNA 1000. Po dobehnutí elektroforézy sme výsledky vyhodnotili pomocou počítačového programu.

Kvantitatívna Real-Time PCR (QRT-PCR) s využitím TaqMan sond

TaqMan sondy sú oligonukleotidy, ktoré sú dlhšie ako primery a majú na 5'konci fluorescenčnú značku a na 3'konci zhášač. Sonda sa viaže na vnútornú časť amplifikovanej sekvencie a ak vytvára homoduplex, je rozložená 5'exonukleázovou aktivitou *Taq* DNA polymerázy, čo spôsobuje ukončenie zhášania a emisiu fluorescencie [6]. Na našom pracovisku sme používali na stanovenie počtu *BCR-ABL* transkriptov v pomere k house-keeping génu vo vzorke hydrolyzačnú sondu a ako kontrolný gén sme použili *ABL*. Výsledné číslo NCN (normalised copy number), sa zaznamenávalo do grafu (deje sa tak aj pri monitorovaní liečby). Postupným vnášaním NCN hodnôt do grafu sme mohli sledovať progres alebo pokles ochorenia u pacienta [7].

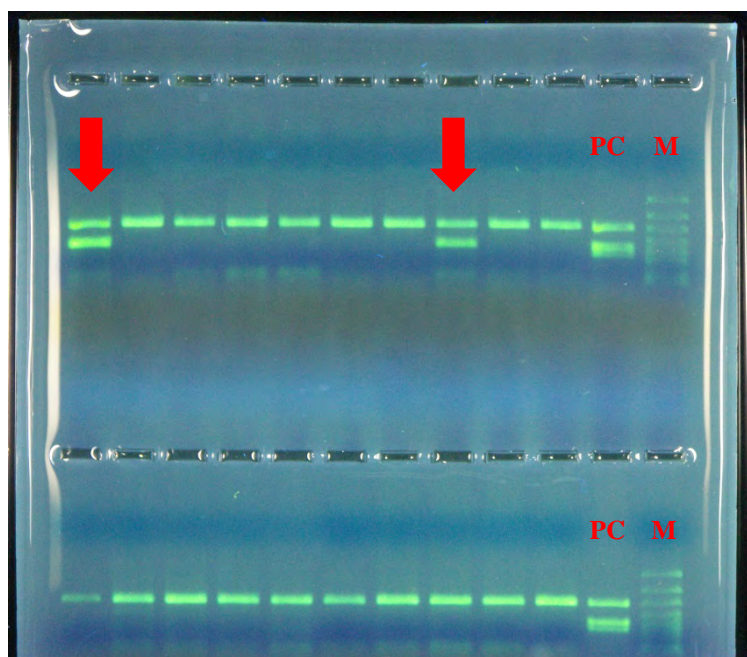
Kvantitatívna Real-Time PCR (QRT-PCR) kombinovaná s analýzou bodu topenia s využitím SybreGreen-u

Na našom pracovisku bola zavedená nová jednoduchá metóda na detekciu najčastejších zlomov *BCR-ABL* fúznych transkriptov analýzou denaturačného bodu topenia použitím SYBR Greenu. Táto metóda môže byť prevádzaná súčasne s *BCR-ABL* kvantifikáciou, ktorá využíva TaqMan próby pri Real-time PCR systéme.

Melting curve analýza s použitím SYBR Greenu sa ukázala ako vhodná na určenie fúznych transkriptov. Z derivačnej krivky amplikónov sme zistili teplotu topenia $T_m = 78,3 \pm 0,5^\circ\text{C}$ pre b2a2 a $T_m = 80,6 \pm 0,5^\circ\text{C}$ pre b3a2. Amplifikačný profil bol identický ako pri TaqMan kvantifikácii, ale s prídavným disociačným krokom [8].

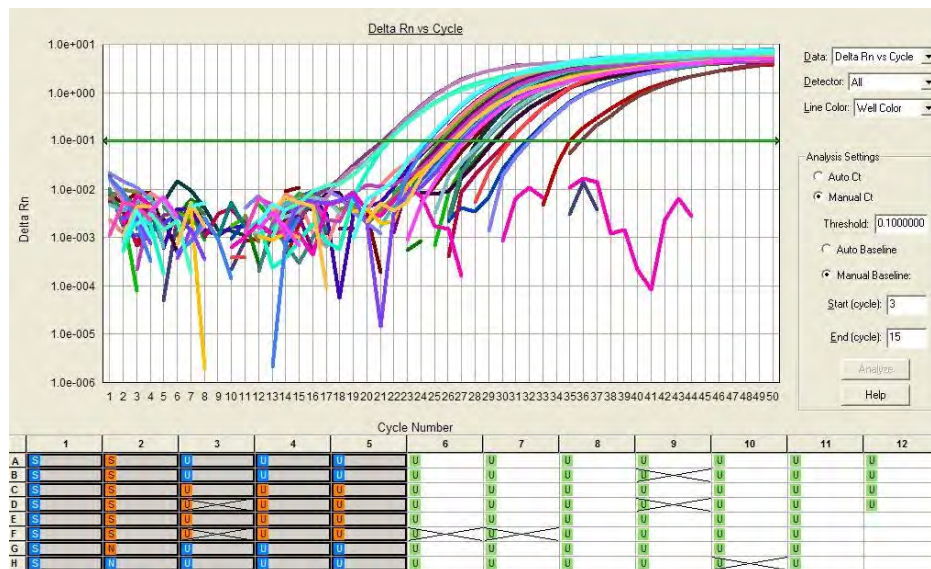
Výsledky a diskusia

Počas dvojročnej práce v laboratóriu klinickej genetiky Medirexu, a.s. sme sa zamerali na vyšetrenie vzoriek periférnej krvi a kostnej drene pacientov s podozrením na myeloproliferatívne ochorenie v období 1.10. 2011- 21.11. 2012. Zo súboru pacientov pozitívnych na takéto ochorenia sme vybrali tých s pozitívnym nálezom fúzneho produktu *BCR-ABL* a vytvorili skupinu CML pacientov. Z celkového počtu myeloproliferatívnych pacientov 491 bolo CML pozitívnych 78. Pozitivitu alebo negativotu CML vzoriek periférnej krvi alebo kostnej drene sme určovali pomocou multiplex PCR a agarózovej gélovej elektroforézy [Obr.2].



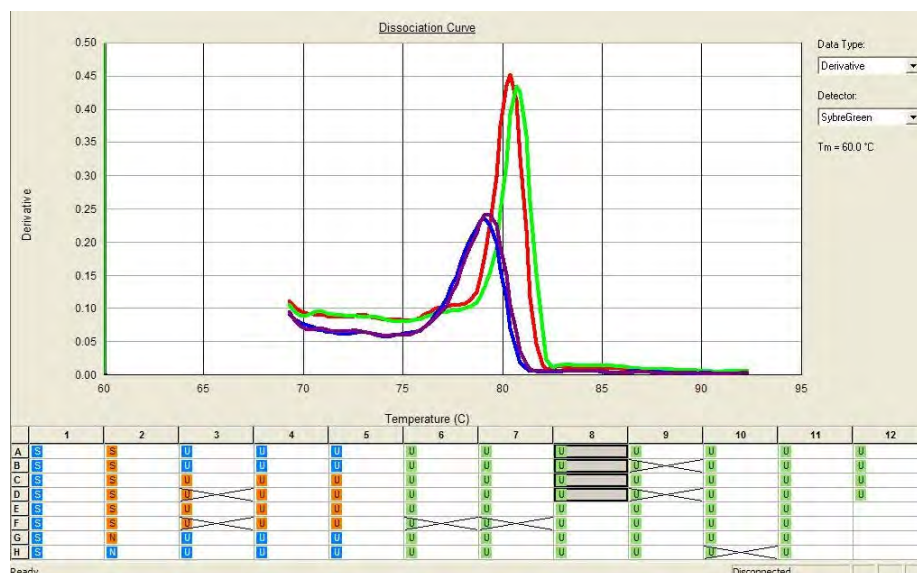
Obr.2 Výsledok gélovej elektroforézy: šípky označujú vzorky pozitívne na CML, PC predstavuje pozitívnu kontrolu a M marker.

Pomocou metódy Real-Time PCR sme kvantifikovali množstvo fúzneho a kontrolného génu [Obr.3]. Hodnota ich pomeru sa udáva ako normalizovaný počet kópií (NCN). Hodnota IS (international scale) vychádza z nameranej NCN hodnoty vynásobenej špecifickým koeficientom.



Obr.3 Výsledok QRT-PCR: krivky znázorňujúce pozitivitu pacientov.

Typ *BCR-ABL* zlomu sme určovali melting curve analýzou v Real-time PCR systéme použitím SYBR Greenu a univerzálnych primerov pre *BCR-ABL* fúzne transkripty b3a2 a b2a2, ktoré boli použité aj v QRT-PCR [Obr.4].



Obr.4 Výsledok melting curve analýzy v Real-Time PCR systéme použitím SYBR Greenu: dvaja pacienti s odlišným fúznym transkriptom na základe teploty topenia. Pacient s modrou a fialovou krivkou ($T_m \approx 78,3^\circ\text{C}$) predstavuje CML s fúznym transkriptom b2a2, pacient so zelenou a červenou krivkou ($T_m \approx 80,6^\circ\text{C}$) zas b3a2.

Záver

V našej práci sme sa snažili poukázať na dôležitosť molekulárnej biológie a jej metód aj v diagnostike ochorení. Cytogenetické a molekulovo-genetické metódy, ktorými monitorujeme chronickú myeloickú leukémiu stále napredujú. Štúdie CML v podstatnej miere podporili výskum v oblasti farmakológie, ktorého výsledkom sú účinné ciele formy terapie ochorenia založené na inhibícii tyrozínkináz. Takéto inhibítory bránia realizácii účinku leukemického génu a výrazne zlepšili prežívanie pacientov potlačením rastu leukemického klonu, aj keď pravdepodobne CML nedokážu vyliečiť. Pacienti s týmto ochorením sú vďaka nášmu pravidelnému monitoringu informovaní o svojom stave a prípadnej zmene terapie.

PodĎakovanie

Touto cestou by som sa chcela poďakovať svojej odbornej školiteľke, RNDr. Renáte Lukačkovej, za jej rady a pripomienky k mojej práci, a taktiež priateľskému prístupu, ktorý mi celý čas poskytovala.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Look A. T., Ferrando A. A. (2003) Leukemias and Lymphomas: Genetics. In: Cooper D. N. (eds.) Encyclopedia of the Human Genome, Volume 3. Nature Publishing Group, The Macmillan Building, 4 Crinan Street, London N1 9XW, UK, p.682
- [2] Adam Z., Krejčí M., Vorlíček J. a kol. (2008) Grada Publishing, a.s., U Prúhonu 22, Praha 7, p.41
- [3] Chrappa Maksinová S. (2012) Myeloproliferatívne neoplázie a molekulová genetika (Rigorózna práca) Vysoká škola zdravotníctva a sociálnej práce sv. Alžbety, Bratislava, p.18
- [4] Demitrovičová Ľ., Copáková L., Mikušková E., Leitnerová M. (2012) Onkológia 7(2), p.110
- [5] Albitar M. (2003) Myeloproliferative diseases: Molecular Genetics. In: Cooper D. N. (eds.) Encyclopedia of the Human Genome, Volume 4. Nature Publishing Group, The Macmillan Building, 4 Crinan Street, London N1 9XW, UK, p.256
- [6] Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J (2010) Metody molekulární biologie. Vydala Masarykova univerzita, Tisk Coprint, Brno- Kraví Hora, p. 13
- [7] Hojsíková I. (2008) Genetické vyšetrovacie metódy pri chronickej myeloickej leukemii, ich význam a využitie (Rigorózna práca), Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p.45
- [8] Hanušovská E., Marková K., Križan P. (2009) Haematologica 94(s2), p.569

Vplyv laktátu sodného ako signálnej molekuly na expresiu a funkciu CA IX

Elena Ondrisková, Eliška Švastová, Silvia Pastoreková

Slovenská akadémia vied, Virologický ústav, Oddelenie molekulárnej medicíny, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava, Slovenská republika; e.ondriskova@gmail.com

Abstrakt

HIF-1 (hypoxia inducible factor-1) is a transcription factor facilitating expression of broad spectrum of genes involved in tumor progression. One of them is *CA9* that encodes Carbonic anhydrase IX (CA IX), a transmembrane protein induced in many solid tumors. HIF-1 consists of 2 subunits HIF-1 α and HIF-1 β . HIF-1 β is stable even in normoxia (21 % oxygen), whereas HIF-1 α is posttranslationally regulated by hydroxylation of prolines and asparagine with oxygen-dependent prolyl and asparaginyl hydroxylases, which is the prerequisite for HIF-1 α degradation in normoxia. However, lactate and pyruvate, the end products of glycolysis, can stabilize HIF-1 α even in normoxia. Here we provide the evidence that sodium lactate increases CA IX protein and mRNA levels in normoxic conditions, supposedly acting through stabilization of HIF-1 α . Furthermore, sodium lactate may have an impact on activity of PKA that phosphorylates treonine in the intracellular tail of CA IX and thereby induces its catalytic performance.

Kľúčové slová: *HIF-1 α ; hypoxia inducible factor-1; CA IX; karbonická anhydráza IX; laktát sodný; PKA; proteín kináza A*

Úvod a formulácia cieľa

Rakovinové bunky vykazujú vysokú hladinu aeróbnej glykolýzy a produkujú veľké množstvá jej konečných produktov, laktátu a pyruvátu [1]. Tento fenomén, ktorý prebieha aj za normoxických podmienok sa nazýva Warburgov efekt [2]. Hypoxia (obmedzený prísun kyslíka) je ďalším charakteristickým znakom mnohých pevných nádorov, ktorý súvisí s malígnym fenotypom, metastázami a rezistenciou na liečbu [3]. Adaptácia rakovinových buniek na hypoxiu je sprostredkovaná pomocou transkripčného faktora HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*), ktorý zabezpečuje zvýšenie expresie série génov zahrnutých v glykolytickom metabolizme, angiogenéze, bunkovom prežití a erythropoéze. Medzi tieto gény patrí VEGF (*vascular endothelial growth factor*), EPO (erythropoetín), GLUT (glukózové transportéry), niekoľko glykolytických enzýmov [4, 5] a bunkových transportérov [6]. Jedným z proteínov indukovaných v hypoxii pomocou transkripčného faktora HIF-1 je aj karbonická anhydráza IX (CA IX), transmembránový glykoproteín katalyzujúci reverzibilnú konverziu $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ na $\text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$, čím sa podieľa na regulácii pH. HCO_3^- môže byť transportovaný do vnútrobunkového priestoru, kde po interakcii s H^+ vzniká CO_2 , ktorý difunduje do extracelulárneho priestoru, pričom CA IX túto difúziu urýchľuje [7]. CO_2 sa spolu s H^+ podieľa na acidifikácii extracelulárneho pH, ktoré stimuluje invazívny fenotyp nádorov [8].

HIF-1 je transkripčný faktor pozostávajúci z dvoch podjednotiek HIF-1 α a HIF-1 β . HIF-1 α podjednotka je stabilizovaná v hypoxii, a v normoxii (21 % O₂) je rapidne degradovaná. Na tejto degradácii sa zúčastňuje proteín VHL (von Hippel-Lindau) [9, 10, 11], ktorý sa viaže na HIF-1 α a zabezpečuje jeho degradáciu v proteazóme. Väzba HIF-1 α a VHL vyžaduje posttranslačnú hydroxyláciu prolínových zvyškov Pro⁴⁰² a Pro⁵⁶⁴ v rámci ODD domény (*oxygen-dependent degradation domain*) HIF-1 α O₂ dependentnými prolyl hydroxylázami [12, 13]. K danej modifikácii nedochádza počas hypoxie, takže HIF-1 α nadobúda stabilitu a viaže sa k HIF-1 β , čo vedie k tvorbe kompletného transkripčného faktora HIF-1, ktorý po translokácii do jadra zvyšuje expresiu svojich cieľových génov. Ďalej môže v podmienkach normoxie dochádzať k hydroxylácii asparagínu Asp⁸⁰³ v HIF-1 α C-terminálnej transaktivačnej doméne pomocou O₂ dependentných asparaginyl hydroxyláz, čo inhibuje interakciu HIF-1 s p300/CBP koaktivátorom, čím je v prítomnosti O₂ blokována jeho transkripčná aktivita [14].

Mechanizmus stabilizácie HIF-1 α nezávislý od hypoxie je taktiež dôležitý pre progresiu nádorov a významné hladiny tohto proteínu boli pozorované aj v oksyložených oblastiach tumoru a metastatických lézií [15]. Lu a kol. (2002) vo svojej štúdií demonštrovali, že konečné produkty glykolytického metabolizmu laktát a pyruvát môžu zabezpečiť HIF-1 α proteínovú stabilitu a aktivovať HIF-1 indukovateľnú génovú expresiu už v normoxických podmienkach [16].

Cieľom našej práce bolo overiť vplyv laktátu sodného na stabilizáciu HIF-1 α v normoxii prostredníctvom sledovania jeho vplyvu na HIF-1 cieľový gén CA9. Ďalej sme sa zamerali na štúdium vplyvu laktátu sodného na proteín kinázu A (PKA), ktorá fosforyluje tretonín T⁴⁴³ v intracelulárnom (IC) konci CA IX, čím môže zohrávať úlohu pri kontrole jej enzymatickej aktivity.

Materiál a metódy

Bunková kultivácia – SiHa, HeLa a MDCK (*Madine-Darby canine kidney cells*) bunky a ich transfekované deriváty konštitutívne exprimujúce CA IX [17] sme kultivovali v médiu DMEM (Biochrom) s 10 % fetálnym teľacím sérom (Biochrom) v termostate pri 37°C, 5 % CO₂, 21 % O₂. Bunky sme ovplyvnili 10 mM a 20 mM laktátom sodným (Sigma) 7, 24 a 48 hodín.

Imunoprecipitácia – 2 μ g protilátky voči fosfotreonínu 443 na IC konci CA IX sme inkubovali v roztoku RIPA spolu s Proteín-A Sefarózou (GE Healthcare) 2 hodiny pri 4°C. Lyzáty sme prečistili so suspenziou sefarózy s roztokom RIPA a následne pridali k naviazanej

protilátke. Inkubovali sme cez noc pri 4°C. Imunokomplexy uvoľnené zo sefaryzy sme vizualizovali pomocou metódy Western blot za použitia protilátky M75 konjugovanej s peroxidázovou aktivitou.

PAGE a Western blot – proteíny sme separovali na 10 % polyakrylamidových géloch. Rozdelené proteíny boli prenesené na IMMOBILON-P^{SQ} membránu (Lambda Life). Membrány sme inkubovali v primárnej protilátke MAb voči CA IX M75 (VÚ SAV) a voči aktínu (SantaCruz Biotechnology), následne sekundárnej protilátke Anti-Mouse (CA IX) IgG (Sigma) a PAb Anti-Goat Ig (aktín) (Dako) konjugovaných s peroxidázovou aktivitou. Vizualizovali sme po pridaní substrátu H₂O₂.

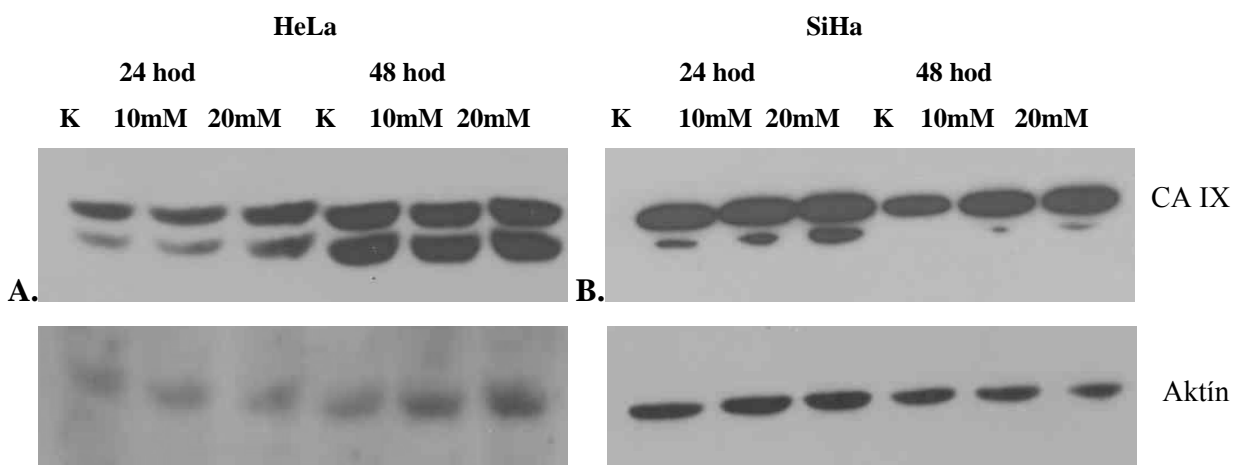
Quantitative Reverse Transcription PCR – celkovú RNA sme extrahovali za použitia komerčného roztoku InstaPure (Eurogentec). RNA sme reverzne transkribovali za použitia reverznej transkriptázy MultiScribe (Applied Biosystems) a náhodných heptamérnych oligonukleotidov. Kvantitatívna RT-PCR analýza prebiehala v Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems), pričom sme použili Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) a nasledovné oligonukleotidy:

CA9-S	5'-AGTGCCTATGAGCAGTTGCT-3'
CA9-A	5'-TAGCCGAGAGTCACCAGGTC-3'
actin-S	5'-TCCTCCCTGGAGAAGAGCTA-3'
actin-A	5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGAC-3'

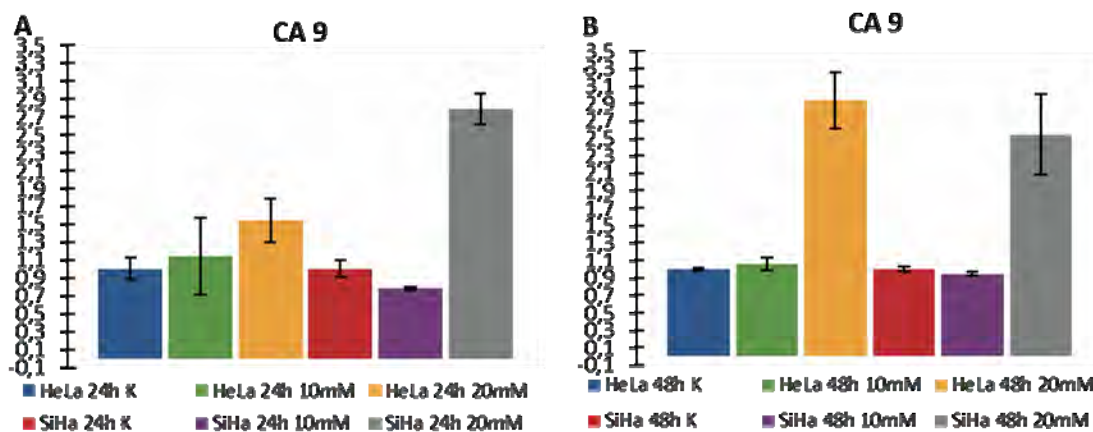
Výsledky a diskusia

Vplyv laktátu na stabilizáciu HIF-1 α v normoxických podmienkach (21 % O₂) sme otestovali pomocou sledovania HIF-1 cieľového génu CA9. Na stanovenie proteínovej hladiny CA IX sme použili metódu Western blot a hladiny mRNA metódu qPCR. Testovali sme bunky cervikálneho karcinómu SiHa a HeLa, pričom SiHa bunky, ktoré sa vyznačujú silnejšou indukciou CA IX v porovnaní s HeLa, boli jeden týždeň pred ovplyvnením vyriedené, aby sa inhibovala expresia CA IX, ktorá môže byť okrem hypoxie indukovaná aj bunkovou hustotou [18]. Bunky sme ovplyvnili 10 mM a 20 mM koncentráciou laktátu sodného a sledovali hladinu CA IX v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou po 24 a 48 hodinách. V experimentoch sme zvolili používanie laktátu sodného, ktorý nespôsobuje acidifikáciu extracelulárneho pH v porovnaní s kyselinou mliečnou z dôvodu určenia vplyvu laktátu ako signálnej molekuly a vylúčenie podielu účinku extracelulárnej acidózy na sledovanom efekte. V oboch experimentoch sme potvrdili vplyv laktátu sodného na

zvyšovanie hladiny CA IX, pričom 20 mM koncentrácia ovplyvňovala hladiny výraznejšie (Obr. 1, Obr. 2).



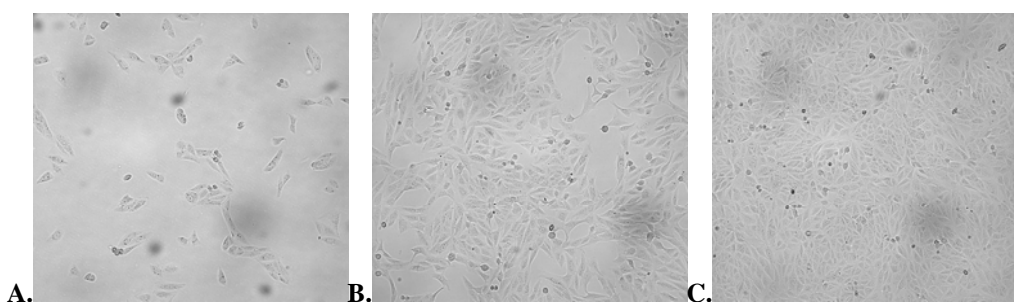
Obr. 1 Vplyv laktátu sodného na hladinu CA IX vo Western blot analýze. Bunky SiHa (A) a HeLa (B) analyzované 24 a 48 hodín po pôsobení 10 mM a 20mM koncentrácie laktátu sodného v porovnaní s kontrolou (K).



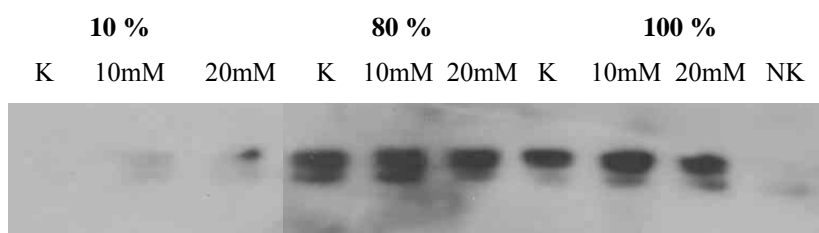
Obr. 2 qRT-PCR analýza úrovne expresie génu CA 9 v HeLa a SiHa bunkách 24 hodín (A) a 48 hodín (B) po pôsobení 10 mM a 20 mM laktátu sodného v porovnaní s kontrolou (K). Hodnoty sú udávané v relatívnych číslach vzhľadom ku kontrole (hodnota 1).

Intracelulárny (IC) chvost CA IX obsahuje tri fosforylačné miesta, a to T⁴⁴³, S⁴⁴⁸ a Y⁴⁴⁹, pričom fosforylácia T⁴⁴³ a defosforylácia S⁴⁴⁸ zohrávajú úlohu pri kontrole enzymatickej aktivity CA IX. Kľúčovým enzýmom zabezpečujúcim fosforyláciu T⁴⁴³ je proteín kináza A (PKA) [19]. V ďalších experimentoch sme sa zamerali na štúdium vplyvu laktátu sodného na aktivitu PKA, a tým fosforyláciu T⁴⁴³ v IC konci CA IX. V bunkách MDCK ektopicky exprimujúcich CA IX sme pomocou imunoprecipitácie za použitia protilátky voči fosforylovanému T⁴⁴³ a následnej analýzy Western blot sledovali mieru jeho fosforylácie pri rôznych bunkových hustotách (Obr. 3). Bunky sme ovplyvnili 10 mM a 20 mM laktátom

sodným a vyhodnotili jeho účinok po 7 hodinách pôsobenia. Pri nízkej konfluencii buniek (10 %) sme pozorovali mierny nárast hladiny fosforylovanej formy CA IX po pôsobení 10 mM a 20 mM laktátu sodného v porovnaní s kontrolou. Vo vyšších hustotách sa miera fosforylácie už ďalej nemenila (Obr. 4). Pri nízkej bunkovej hustote je vytvorených málo medzibunkových kontaktov a nedochádza k fosforylácii pravdepodobne z dôvodu nízkej hladiny PKA, ktorá môže byť indukovaná bunkovou hustotou. Laktát túto fosforyláciu potencuje, čím môže mať vplyv na zvyšovanie hladiny PKA už pri malom počte medzibunkových kontaktov.



Obr. 3 MDCK bunky konštitutívne exprimujúce CA IX v rôznych bunkových konfluenciách. Konfluencia buniek 10 % (A), 80 % (B) a 100 % (C). Pôvodné zväčšenie 5 x.



Obr. 4 Fosforylovaná forma CA IX na T⁴⁴³ v MDCK bunkách konštitutívne exprimujúcich CA IX pri rôznych bunkových hustotách. K – kontrola; 10 mM a 20 mM – koncentrácie laktátu sodného (7 hodinové pôsobenie), NK – negatívna kontrola (imunoprecipitácia prebiehala bez prítomnosti lyzátu za prítomnosti protilátky voči fosforylovanému T⁴⁴³).

Záver

Pomocou metód Western blot a qRT-PCR sme dokázali vplyv laktátu sodného na zvyšovanie hladiny CA IX kódovanej HIF-1 cieľovým génom CA9. Laktát sodný teda môže pôsobiť na stabilizáciu HIF-1 α , avšak ďalšie experimenty dokazujúce vplyv laktátu sodného na hladinu HIF-1 α a zvyšovanie expresie iných cieľových génov HIF-1 budú v budúcnosti uskutočnené na potvrdenie stanovenej hypotézy. Taktiež bude v ďalších štúdiách potrebné určiť úroveň pôsobenia laktátu sodného v signálnej dráhe vedúcej k zvyšovaniu expresie CA IX.

Pomocou imunoprecipitácie sa nám podarilo dokázať vplyv laktátu sodného na zvyšovanie fosforylácie treonínu v IC konci CA IX pri nízkych bunkových hustotách. Tento

vplyv môže súvisieť s pôsobením laktátu na zvyšovanie hladiny PKA a tým fosforylácie T⁴⁴³. Laktát je teda významnou signálnou molekulou, ktorá sa môže podieľať na nádorovom fenotype buniek.

Pod'akovanie

Táto štúdia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt s ITMS kódom: 26240120027, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Galarraga J., Loreck D. J., Graham J. F., et al. (1986) *Metab. Brain Dis.* 1(4), p. 279
- [2] Semenza G. L. (2000) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35(2), p. 71
- [3] Hockel M., and Vaupel P. (2001) *J. Natl. Cancer Inst.* 93(4), p. 266
- [4] Maxwell P. H., Pugh C. W., Ratcliffe P. J. (2001) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11(3), p. 293
- [5] Semenza G. L. (2000) *J. Appl. Physiol.* 88(4), p. 1474
- [6] Ullah M. S., Davies A. J., Halestrap A. P. (2006) *J. Biol. Chem.* 281(14), p. 9030
- [7] Pastoreková S., Ratcliffe P. J., Pastorek J. (2008) *BJU Int.* 101(4), p. 8
- [8] Swietach P., Vaughan-Jones R. D., Harris A. L. (2007) *Cancer. Metast. Rev.* 26(2), p. 299
- [9] Salceda S., Caro J. (1997) *J. Biol. Chem.* 272(36), p. 22642
- [10] Huang L. E., Gu J., Schau M., et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95(14), p. 7987
- [11] Maxwell P. H., Wiesener M. S., Chang G. W., et al. (1999) *Nature* 399, p. 271
- [12] Ivan M., Kondo K., Yang H., et al. (2001) *Science* 292(5516), p. 464
- [13] Jaakkola P., Mole D. R., Tian Y. M., et al. (2001) *Science* 292(5516), p. 468
- [14] Lando D., Peet D. J., Gorman J. J., et al. (2002) *Genes Dev.* 16(12), p. 1466
- [15] Semenza G. L. (2003) *Nat. Rev. Cancer.* 3(10), p. 721
- [16] Lu H., Forbes R. A., Verma A. (2002) *J. Biol. Chem.* 277(26), p. 23111
- [17] Švastová E., Hulíková A., Rafajová M. (2004) *FEBS Lett.* 577, p. 439
- [18] Kopáček J., Baráthová M., Dequiedt F., et al. (2005) *Biochim. Biophys. Acta.* 1729(1), p. 41
- [19] Ditte P., Dequiedt F., Švastová E. (2011) *Cancer Res.* 71(24), p. 7558

Localization of VP1 in pancreas of infected mice

Lenka Pačutová¹, Soňa Šarmírová², Pavol Gomolčák³, Shubhada Bopegamage²,

¹*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Microbiology and Virology, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovak Republic; compicl@gmail.com*

²*Slovak Medical University, Faculty of Medicine, Institute of Microbiology, Department of Virology, Limbová 12, 833 03 Bratislava, Slovak Republic*

³*Cytopathos s.r.o., Limbová 5, 833 01 Bratislava, Slovak Republic*

Abstract

Enteroviruses are highly prevalent human pathogens, and often cause non-specific and mild febrile illnesses. Occasionally these viruses result in acute infections of the central nervous system, heart and pancreas. In infants particularly the course of the disease can be severe. Group B coxsackieviruses (CVBs) cause aseptic meningitis and may also have a role in the development of type I diabetes in humans. They have the potential of infecting different tissues. Individual members of the CVB have tropism for certain tissues presenting as various clinical outcomes. Aim of the study was to investigate the persistence of viral RNA in mouse pancreatic tissue. Mice were orally infected with CVB4 isolates from different organs of a mouse previously infected with patient's isolate from cerebrospinal fluid. Immunohistochemical analysis was used for detection of viral protein 1 (VP1). Viral RNA was detected by PCR. We observed prolonged presence of enteroviral RNA in organs till day 45 post infection (p.i.).

Keywords: *Coxsackieviruses; Aseptic meningitis; Pancreatitis; Tissue tropism*

Introduction and formulation of aim

Enteroviruses (EVs) exist worldwide. They comprise of a number of serotypes and their non-structural genes have a potential of frequent recombinations to produce new virus variants [1] resulting in differences in tissue tropism and virulence based on very few or even single amino acid differences may occur. Therefore it may be expected that EV serotypes may have undergone genomic modifications (mutations and recombinations) giving rise to the emergence of novel EVs [2].

Human enteric viruses are shed in high concentrations in faecal matter of infected patients and are discharged into sewage which may contaminate surface water sources for drinking water, recreational activities, aquaculture and irrigation [3].

Studies of the pathogenesis of enterovirus infections in humans are complicated because different enteroviruses cause similar clinical manifestations, and the same serotype can cause diverse symptoms due to different host and viral determinants. Interactions between a virus and its specific receptor are determined by viral structural proteins, and are thought to be crucial factors in tissue tropism. The interaction between the virus and its specific receptor(s) is determined by the capsid proteins [4].

The development of disease depends on the infecting viral strain and the genetic predisposition of the host. Enteroviruses may cross the blood–brain barrier and become disseminated to the central nervous system (CNS) from the bloodstream, infected leukocytes or neural cells and induce neurological diseases [5]. Meningitis and myelitis represent common and very infrequent viral infections of the central nervous system, respectively. Clinical disease observed in patients with viral meningitis can vary with the host's age and underlying immune status [6].

In humans, coxsackievirus infections have been linked to diseases of both the exocrine and endocrine pancreas i.e., pancreatitis and type I diabetes (T1D). Pancreatitis is characterized by inflammation, edema and necrosis of the exocrine pancreas [7]. Type 1 diabetes (T1D) is a multistage T cell-mediated autoimmune disease that cause specific destruction of pancreatic islet β -cells, resulting in a slow and progressive loss of insulin secretion. The mechanisms leading to the disease involve interactions between the virus, host target tissue (pancreas) and the immune system [8].

Present study was carried out to follow up the presence of viral RNA and viral capsid protein VP1 in pancreas tissues after mouse passage with virus isolates originally derived from patient's cerebrospinal fluid identified as Coxsackievirus B4.

Materials and methods

Viruses: A mouse was selected from a group of mice infected with Coxsackievirus B4 (CVB4) from the cerebrospinal fluid of a patient with aseptic meningitis. This mouse showed persistence of viral RNA at day 45 p.i. in the brain of 1/5 mice (day 5 p.i.). Mouse isolates from selected organs brain, pancreas and stool were collected on day 5 post infection. Stocks were prepared from each isolate.

Mice: CD-1 outbred mice (Harlan Laboratories, Italy).

Infection: 15 mice per group were orally infected at a dose of 0.2×10^7 TCID₅₀/ml with CVB4 isolates (from brain, pancreas and stool). Mock infected (with PBS) mice served as controls. Mice were sacrificed on days 5, 10 and 45 p.i. Portions of pancreas were collected and snap frozen.

RNA isolation: Total RNA from the organs was extracted with PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen) according to the supplier's manual for purifying total RNA from animal tissue.

Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction and Nested PCR: The details of the reverse transcription-PCR followed by nested PCR have been described previously [9].

For cDNA synthesis and amplification in a single tube the SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen) was used. The PCR products were detected and analyzed on 2% agarose gel.

Histology: Serial 4–7 mm thick sections of formalin-fixed, paraffinembedded samples of pancreas were stained with haematoxylin and eosin.

Immunohistochemistry: Staining for VP1 was performed as reported previously [9] with some modifications. Paraffin-embedded pancreas sections were stained by hematoxylin and eosin. The specimens were heated three times for 5 min in a 10 mM citrate buffer in a microwave oven. The sections were then cooled and immersed in 3% H₂O₂ for 15 min to inhibit endogenous peroxidase activity. To block non-specific antigen sites, sections were blocked with 5% soya nonfat milk for 20 min at room temperature. The primary antibody (monoclonal mouse anti-VP1 antibody, clone 5-D8/1; DAKO) diluted 1:150 was mixed with biotinylated reagent (modified biotinylated anti-mouse immunoglobulin) and pre-incubated for 15 min ('antibody mix'). Animal Research kit (DAKO) was used to minimize background staining from antimouse immunoglobulin. After background blocking, the 'antibody mix' was applied to the specimens and incubated for 15 min. Immunoreactivity was detected by using the streptavidin-peroxidase substrate. After a single PBS wash, the hydrogen peroxidase substrate (diaminobenzidine chromogen solution, DAB) was added for 2-10 min to reach the appropriate intensity and slides were rinsed with distilled water to stop the staining reaction. Immunostained sections were counterstained with haematoxylin for 1 min, bathed under tap water, rinsed with distilled water and dehydrated in increasing ethanol concentrations followed by xylene (each treatment for 5 min). Finally, the slides were mounted with a coverslip in a non-aqueous permanent mounting medium, Entellan. Slides were analysed by light microscopy. A dark brown reaction product is indicative of positive staining for the marked protein.

Results and discussion

Virus was present in all pancreatic tissues on day 5 p.i., as expected during the acute infection. As indicated in tables 1, 2 and 3 viral RNA was present in all the mice at day 45 post infection indicating that the pancretropism and persistence of the viral RNA was independent of the origin of the virus. Detection of viral persistence in pancreas for prolonged time after inoculation, on 45 day in comparison with the original isolate from the CSF of patient which showed 40% pancreas positive at day 5 p.i., may be interpreted as altered tropism and escape from the immune response and leading to persistence [10, 11].

Tab. 1 Detection of CVB4 brain isolate by PCR and VP1 by immunohistochemistry in pancreas tissue

BRAIN B4	D5		D10		D45	
	PCR	IHC	PCR	IHC	PCR	IHC
M1	+	+	-	-	+	+
M2	+	+	+	+	+	+
M3	+	+	+	+	+	+
M4	+	+	+	+	+	+
M5	+	+	+	+	+	+

D = days p.i.; M = mouse; (+) positive, (-) negative

Tab. 2 Detection of CVB4 pancreas isolate by PCR and VP1 by immunohistochemistry in pancreas tissue

PANCREAS B4	D5		D10		D45	
	PCR	IHC	PCR	IHC	PCR	IHC
M1	+	+	+	+	+	+
M2	+	+	+	+	+	+
M3	+	+	+	+	+	+
M4	+	+	+	+	+	+
M5	+	+	-	-	+	+

D = days p.i.; M = mouse; (+) positive, (-) negative

Tab. 3 Detection of CVB4 stool isolate by PCR and VP1 by immunohistochemistry in pancreas tissue

STOOL B4	D5		D10		D45	
	PCR	IHC	PCR	IHC	PCR	IHC
M1	+	+	+	+	+	+
M2	+	+	+	+	+	+
M3	+	+	+	+	+	+
M4	+	+	+	+	+	+
M5	+	+	+	+	+	+

D = days p.i.; M = mouse; (+) positive, (-) negative

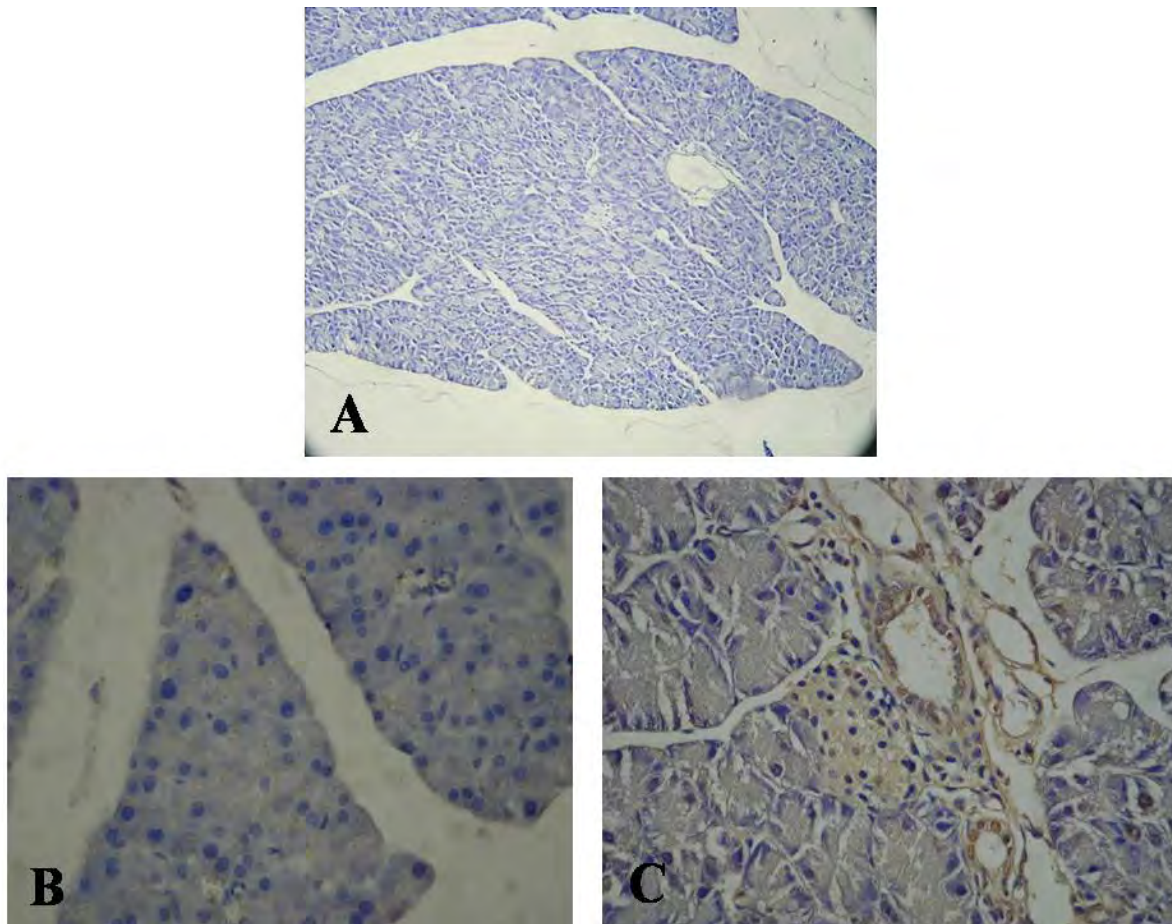


Fig. 1 Presence of the enteroviral capsid protein VP1 in pancreas. A – negative control (not infected), B – negative, C – positive specimen (magnification A 200x , B 400x, C 400x)

Coxsackievirus B4 has been shown to induce severe pancreatitis in mice which is characterized by degeneration and necrosis of the acinar cells (exocrine pancreas) with an accompanying inflammation. Pathological changes are generally not observed in the islets of Langerhans (endocrine pancreas) [12]. In our study enteroviral VP1 was found in endocrine and exocrine pancreas mainly in the pancreatic acinar and duct cells and also in the adipose tissue. Inflammation was not observed (Fig. 1).

Conclusion

We show a prolonged persistence of viral RNA and viral capsid protein in pancreatic tissues. We conclude that a single passage in the mouse increased the pancreotropism of CVB isolates.

Acknowledgments

This work was supported by the Norwegian Financial Mechanism, Mechanism EEA

and Slovak Government and the State Budget of the Slovak Republic (SK 0082) and grant Ministry of Health of the Slovak Republic 2007/03- RUVZ 01. This article was created by the realisation of the project "Center of excellence of environmental health", ITMS No.24240120033, based on the supporting operational Research and development program financed from the European Regional Development Fund.

References

- [1] Lukashev A. (2005) *Rev. Med. Virol.* 15, p. 157
- [2] Necitas L., Apostol G., Imagawa T., et al. (2012) *Virus Genes* 45, p. 207
- [3] Wyn-Jones A. P., Sellwood J. (2001) *J. Appl. Microbiol.* 92, p. 945
- [4] Evans J. D., Almond J. W. (1998) *Trends Microbiol.* 6, p. 198
- [5] Feuer R., Mena I., Pagarigan R. et al. (2003) *Am. J. Pathol.* 163, p. 1379
- [6] Irani D. N. (2008) *Neurol. Clin.* 26(3), p. 635
- [7] Vella C., Brown C. L., McCarthy D. A. (1992) *J. Gen. Virol.* 73, p. 1387
- [8] Kyvik K. O., Nystrom L., Gorus F., et al. (2004) *Diabetologia* 47, p. 377
- [9] Bopegamage S., Kováčová J., Vargová A. et al. (2005) *J. Gen. Virol.* 86, p. 3271
- [10] Vignuzzi M., Stone J. K., Arnold J. J., et al. (2006) *Nature* 439(7074), p. 344
- [11] Pačutová L., Šarmírová S., Štípalová D. et al. (2012) Študentská vedecká konferencia, Zborník recenzovaných príspevkov, PriF UK Bratislava, SR, p. 528
- [12] See D. M., Tilles J. G. (1995) *J. Infect. Dis.* 171, p. 1131

Vplyv zvýšenej hladiny angiotenzínu II na materské správanie samíc potkana laboratórneho

Zuzana Panáková, Lucia Kršková

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika;
zu.panakova@gmail.com*

Abstrakt

The mother plays a very important role in the life of the young. The object of our research was to test the effect of increased levels of angiotensin II (Ang II) during pregnancy on maternal behavior in the period from tenth day of pregnancy to weaning. At the sixth day of pregnancy, an osmotic pump that continuously excreted Ang II in the amount of 2 µg/kg/hr for 14 days, were operatively inserted into an angiotensin group (Ang: n=5). Sham surgery was applied to a control group (K: n=4). Animals were observed at their home cage. Their behavior, related and unrelated to maternal care, was recorded using One-Zero sampling method. We have found, that the behavior associated with maternal care of Ang females was similar to that of control females during the whole experiment. On the other hand, significant changes were observed in the unrelated behavior. This suggests, that the effect of increased levels of Ang II during pregnancy does not affect maternal care.

Kľúčové slová: *angiotenzín II; Rattus norvegicus; materské správanie; domáca klietka.*

Úvod a formulácia cieľa

Cicavčia matka predstavuje so svojim intrauterínne sa vyvíjajúcim potomstvom symbiotický organizmus, ktorý veľmi citlivo reaguje na zmeny okolitého prostredia. Tie sa môžu potomstva týkať priamo (majú fyziologický, morfológický alebo behaviorálny charakter) alebo nepriamo (samica sa adaptuje fyziologickými zmenami, ktoré ovplyvňujú spôsob jej materskej starostlivosti) [1].

Výsledky viacerých klinických a experimentálnych štúdií poukazujú na skutočnosť, že práve adaptácie na suboptimálne intrauterinné podmienky majú za následok vznik viacerých závažných civilizačných ochorení v dospelosti vrátane hypertenzie [2, 3].

Výskumy poukázali na spojitosť medzi vysokým krvným tlakom u matiek a zvýšeným krvným tlakom ich potomkov, pričom priame spojenie medzi zvýšeným tlakom u otcov a ich detí sa nepreukázalo [2].

Pri vzniku hypertenzie hrá kľúčovú úlohu renín-angiotenzín-aldosterónový systém (RAAS) [4]. Jedným z jeho najvýznamnejších komponentov je angiotenzín II (Ang II) [5], ktorý spôsobuje systémovú a renálnu vazokonstrikciju, ale taktiež zvyšuje reabsorpciu sodíka [6]. Pôsobí ako neurotransmitter, vyvoláva pocit smädu, potreby pitia a sekréciu antidiuretického hormónu (ADH, arginín-vazopresín), uľahčuje sekréciu adrenokortiko-

tropného hormónu (ACTH) a ovplyvňuje sekréciu luteinizačného hormónu (LH) [7]. V interakcii s katecholamínmi, serotonínom, prostaglandínmi a inými peptidmi spôsobuje zmeny v motivácii (smäd, bolesť), pamäti, kontrole motorickej aktivity a zasahuje aj do kognitívnych procesov a regulácie emočných odpovedí [8-10].

U spontánne hypertenzných zvierat (SHR) aplikácia Ang II zvyšuje frekvenciu pitia [11-14], potrebu príjmu soli [15, 16] a znásobuje odpovede na stres [17].

Pri výskume materského správania SHR potkanov sa zistilo, že matky v porovnaní s normotenznou kontrolou svoje mláďatá častejšie a intenzívnejšie olizovali [18].

Informácie o bezprostredných účinkoch Ang II na materské správanie potkanov laboratórnych však v nami dostupnej literatúre absentujú.

V našej práci, ktorá je súčasťou rozsiahlejšieho projektu zameraného na výskum prenatálneho vystavenia zvýšeným hladinám Ang II na postnatálne správanie potomstva, sme svoju pozornosť upriamili na správanie matiek, ktorým bola počas gravidity zvýšená hladina tohto hormónu. Vychádzali sme pritom z predpokladu, že množstvo aplikovaného Ang II, ako aj interval jeho uvoľňovania nespôsobia zmeny v rodičovskom správaní.

Materiál a metódy

Nami testovanú skupinu predstavovali štyri kontrolné (K) a päť angiotenzínových samíc (Ang), ktoré pochádzali z VELAZ Praha, CZ.

Zvieratá boli chované v akreditovanom zverinci Katedry živočíšnej fyziológie a etológie PRIF UK v Bratislave, v plastových klietkach o rozmeroch 57x37x19 cm s hoblinovou podstielkou, v počte 2-3 jedince v jednej klietke. V miestnosti bol zabezpečený regulovaný svetelný režim svetlo:tma 12:12 so začiatkom svetelnej fázy o 7:00 hod. SEČ, priemerná teplota $21 \pm 2^\circ\text{C}$ a relatívna vlhkosť $55 \pm 5\%$. Po povinnej 7-dňovej karanténe boli samice-matky rozdelené na základe výsledkov testu otvoreného poľa do dvoch z hľadiska emocionality vyvážených skupín – K a Ang. Následne boli pripustené v pomere 3 samice : 1 samec. Fázu ovulačného cyklu, ako aj graviditu, sme u samíc určili prostredníctvom metódy Gleich a Frohberg [19].

Ang samiciam sme na 6. deň gravidity implantovali osmotické pumpičky (Alzet model 2002), z ktorých bol Ang II (koncentrácia $1,36 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ vo fyziologickom roztoku) uvoľňovaný kontinuálne, v množstve $2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{hod}$ počas 14 dní. K samice sme na ten istý deň podrobili Sham operácii, počas ktorej sme im implantovali oválny predmet z intaktného materiálu rovnakého tvaru a veľkosti ako alzetová pumpička.

Ako narkózu sme použili roztok ketamín (c = 135mg/ml) a xylazín (c = 18mg/ml). Potom boli zvieratá chované individuálne za rovnakých podmienok ako pred zákrokom až do pôrodov.

Po pôrode sme K aj Ang vrhy optimalizovali a pod samicou sme ponechali až do odstavu po 8 mláďat (4 samice : 4 samce). Každá samica so svojím vrhom mala k dispozícii vlastnú kletku. Vodu a potravu mali zvieratá k dispozícii *ad libitum*.

Každú matku sme pozorovali po dobu 10 minút, v dvoch etapách – od 10. dňa gravidity do pôrodu a od prvého dňa po pôrode až do odstavu mláďat (21. deň). Za využitia One-Zero sampling metódy pozorovania sme denne (v čase od 8:00 do 9:00 hod.) do vopred pripravených protokolov registrovali vybrané formy správania samíc uvedené v tab. 1 a 2.

Tab. 1 Sledované formy správania gravidných samíc-matiek v období od 10. dňa gravidity do pôrodu a ich stručná charakteristika

Sledovaná forma správania	Stručná charakteristika	
Správanie gravidných samíc - matiek súvisiace so starostlivosťou o potomstvo	Nepriama starostlivosť	
	Manipulácia s pilinami	- prenášanie pilín po priestoroch kletky
	Stavba hniezda	- navŕšenie pilín do tvaru hniezda
	Jedenie	- konzumácia granulovaného krmiva
Správanie gravidných samíc - matiek nesúvisiace so starostlivosťou o potomstvo	Správanie podmienené metabolickými procesmi	
	Pitie	- príjem vody z napájačky
	Defekácia	- defekovanie obvyčajne do rohov kletky
	Urinácia	- močenie obvyčajne do rohov kletky
	Komfortné správanie	
	Spánok	- oddychovanie v ľahu so zavretými očami
	Ležanie s otvorenými očami	- oddychovanie v ľahu s očami otvorenými
	Samočistenie	- olizovanie povrchu tela, škrabanie
	Exploračné správanie	- vertikálna alebo horizontálna motorická aktivita, plíženie, očuchávanie stien a podlahy
	Stereotypné správanie	- „rúčkovanie“ na kovovom kryte plastovej kletky, naháňanie si chvosta

Tab. 2 Sledované formy správania samíc-matiek v období od prvého dňa po pôrode do odstavu a ich stručná charakteristika

Sledovaná forma správania	Stručná charakteristika	
Správanie matiek súvisiace so starostlivosťou o potomstvo	Priama starostlivosť	
	Olizovanie tela mláďat	- olizovanie tela mláďat okrem anogenitálnej oblasti
	Olizovanie anogenitálnej oblasti	- olizovanie oblasti hrádze
Správanie matiek nesúvisiace so starostlivosťou o potomstvo	Nepriama starostlivosť	
	Prenášanie mláďat	- prenášanie mláďat v papuli
	Pasívne kojenie	- samica pri kojení pasívne leží
	Úprava hniezda	- hrabanie a prenášanie podstielky do/od hniezda
	Manipulácia s podstielkou	- prenášanie pilín v kletke
	Správanie podmienené metabolickými procesmi	
	Jedenie	- konzumácia granulovaného krmiva, pilín alebo výkalov
	Pitie	- príjem vody z napájačky
	Defekácia	- defekovanie obvyčajne do rohov kletky
	Urinácia	- močenie obvyčajne do rohov kletky
	Komfortné správanie	
	Odpočinok bez kontaktu s mláďatami	- oddych alebo spánok bez kontaktu s mláďatami
	Samočistenie	- olizovanie povrchu tela, škrabanie
	Exploračné správanie	- vertikálna alebo horizontálna motorická aktivita, plíženie, očuchávanie stien a podlahy
	Stereotypné správanie	- „rúčkovanie“ na kovovom kryte plastovej kletky, naháňanie si chvosta

Štatistické spracovanie dát získaných One-Zero sampling metódou sme realizovali za využitia programu Microsoft Office Excel 2011 a parametrického t-testu programu Statgraphic (verzia 3.0.0.0).

Výskum bol schválený etickou komisiou PRIF UK v Bratislave.

Výsledky a diskusia

Na základe našich pozorovaní sme zistili, že v čase od 10. dňa gravidity do pôrodu Ang samice-matky v porovnaní s K menej často pili, čistili sa a explorovali a naopak viac spali (tab. 3). Uvoľňovanie Ang II pumpičkou teda neovplyvnilo správanie súvisiace (aj keď v tomto období ešte nepriamo) so starostlivosťou o potomstvo.

V čase od prvého dňa po pôrode do odstavu mláďat, čiže v čase kedy už Ang II nebol pumpičkou vylučovaný, sme v súlade s našimi predpokladmi žiadne zmeny materského správania u Ang matiek nezaznamenali. Ang matky sa od K líšili iba v pití vody, pričom podobne ako počas gravidity pili menej často ako K (tab. 4).

V oboch nami sledovaných etapách môže zmenený príjem vody súvisieť s narušením RAAS, aj keď na základe nami dostupných informácií o účinkoch zvýšenej hladiny Ang II [12-15] na túto formu správania sme skôr očakávali, že Ang zvieratá budú piť častejšie ako K. Treba si však uvedomiť, že informácia o frekvencii pitia nevytvorí nič o množstve vypitej tekutiny.

Tab. 3 Správanie angiotenzínových (Ang) a kontrolných (K) samíc v období od 10. dňa gravidity do pôrodu

Pozorované aktivity		K (n=4)	Ang (n=5)	
Správanie gravidných samíc-matiek súvisiace so starostlivosťou o potomstvo	Manipulácia s pilinami	0,02±0,02	0,05±0,02	
	Stavba hniezda	0,38±0,12	0,18±0,08	
Správanie gravidných samíc-matiek nesúvisiace so starostlivosťou o potomstvo	Správanie podmienené metabolickými procesmi	Jedenie	0,38±0,20	0,05±0,05
		Pitie	0,40±0,14	0,02±0,01*
		Defekácia	0,02±0,02	0,00±0,00
		Urinácia	0,05±0,02	0,00±0,00
	Komfortné správanie	Spánok	3,57±0,24	4,87±0,13**
		Samočistenie	0,63±0,15	0,27±0,07*
		Ležanie s otvorenými očami	0,92±0,21	0,40±0,17
	Exploračné správanie	0,64±0,09	0,33±0,09*	
Stereotypné správanie	0,00±0,00	0,00±0,00		

Hodnoty, ktoré sme získali spracovaním parametrickým t-testom, sú udávané ako priemerný počet časových intervalov v ktorých sa daná aktivita vyskytovala za deň ± S.E.M. Hviezdička vyjadruje signifikantnosť rozdielov medzi Ang a K skupinou zvierat (* p<0,05, ** p<0,01).

Tab. 4 Rozdiely v správaní angiotenzínových (Ang) matiek (vystavených počas gravidity zvýšeným hladinám Ang II) a kontrolných (K) matiek v období od pôrodu do odstavu mláďat

Pozorované aktivity		K (n=4)	Ang (n=5)	
Prejavy súvisiace so starostlivosťou o mláďa	Kojenie	Aktívne	0,75±0,28	0,26±0,08
		Pasívne	1,38±0,29	1,22±0,11
	Olizovanie/Čistenie	Tela mláďat	0,71±0,14	0,55±0,14
		Anogenitálnej oblasti	0,99±0,15	0,72±0,09
	Prenášanie mláďat		1,12±0,63	0,42±0,13
Prejavy nesúvisiace so starostlivosťou o mláďa	Správanie podmienené metabolickými procesmi	Jedenie	1,27±0,34	0,90±0,15
		Pitie	0,93±0,17	0,48±0,05*
		Defekácia	0,02±0,01	0,07±0,03
		Urinácia	0,02±0,01	0,04±0,02
	Komfortné správanie	Odpočinok bez dotyku s mláďatami	6,77±5,99	1,74±0,40
		Samočistenie	5,27±3,58	1,16±0,13
	Exploračné správanie		1,67±0,51	0,87±0,12
	Stereotypné správanie		0,00±0,00	0,00±0,00

Hodnoty, ktoré sme získali spracovaním parametrickým t-testom, sú udávané ako priemerný počet časových intervalov v ktorých sa daná aktivita vyskytovala za deň ± S.E.M. Hviezdička vyjadruje signifikantnosť rozdielov medzi Ang a K skupinou zvierat (* p<0,05).

Uvedené zistenia majú význam pre naše ďalšie štúdium správania potomstva prenatálne ovplyvneného zvýšenou dávkou Ang II, nakoľko dokazujú, že prípadné zmeny v repertoári správania týchto zvierat nie sú podmienené rozdielmi v materskej starostlivosti.

Záver

Vystavenie samíc potkanov zvýšeným hladinám Ang II počas gravidity neovplyvnilo v žiadnej z nami sledovaných etáp správania súvisiace so starostlivosťou o potomstvo.

Pod'akovanie

Tento projekt bol zrealizovaný vďaka grantu VEGA 1/0686/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Macúchová E. (2011) Vplyv zvýšenej hladiny testosterónu v období gravidity na materské správanie samíc potkana laboratórneho (*Rattus norvegicus*). (Diplomová práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p. 10
- [2] Barker D. J. (1998) Mothers, Babies and Health in Later Life. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, p. 115

- [3] Bezek Š., Mach M., Dubovický M., et al. (2008) Epigenetické programovanie chronických ochorení. In: Böhmer D, Danišovič L. (2008) Aktuality súčasného biomedicínskeho výskumu II. Bratislava: Asklepios, p. 3
- [4] Sninčák M., Kujaník S. (2004) Vojenské zdravotnícke listy, 73, p. 130
- [5] Silbernagl S., Despopoulos A. (1993) Atlas fyziologie člověka. Grada Avicenum, Praha, ČR, p. 148
- [6] Brewster U. C., Perazella M. A. (2004) Am J Med Sci 327(6), p.341
- [7] Gard P. R. (2002) European Journal of Pharmacology 438, p.1
- [8] Phillips M. I. (1987) Annu Rev Physiol. 49, p. 413
- [9] Saavedra J. M. (2005) Cell Mol Neurobiol. 25(3-4), p.485
- [10] Von Bohlen, Halbach O., Albrecht D. (2006) Cell Tissue Res. 326, p. 599
- [11] Wright J. W., Sullivan M. J., Quirk W. S., et al. (1987) Brain Res. 420, p. 289
- [12] Casto R, Phillips M. I.(1985) Am J Physiol. 249, p. R341
- [13] Wright J. W., Jensen L. L., Cushing L. L., Harding J. W. (1988) Pharmacol Biochem Behav. 30, p. 343
- [14] Matsuda T., Shibata K., Abe M., et al. (1987) Life Sci. 41, p.749
- [15] Dinicolantonio R., Hutchinson J. S., Mendelsohn F. A. O. (1982) Nature 298, p. 846
- [16] Takata Y., Yamashita Y., Takishita S., et al. (1986) Clin Exp Hypertens. 8, p. 1149
- [17] Berecek K. H., Coshatt G, Narkates A. J., et al. (1988) Hypertension, 11[Suppl 1], p. 144
- [18] Cierpial M. A., Shasby D. E., McCarty R. (1987) Physiology & Behavior 39, p. 633
- [19] Gleich, J., Frohberg, H. (1977) General teratological techniques. In: Neubert, D. et al. (Ed.). Methods in prenatal toxicology. Evaluation of embryotoxic effects in experimental animal. Massachusetts: PSG Publishing, pp. 94

Vplyv zinku na *Rumex crispus* L., rastlinu využívanú v tradičnej juhoafrickej medicíne

Soňa Pastorková, Marek Vaculík

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyziológie rastlín,
Mlynská dolina, 842 15, Bratislava 4; sona.pastorkova@gmail.com

Abstrakt

Many of plant species naturally grown in South Africa contain several pharmacologically important secondary metabolites in their tissues. Because of increased mining activities in this area, plant species used in traditional medicine accumulate several toxic compounds in their tissues. Toxic substances negatively influence plants growth and cause different changes in anatomy, morphology as well as physiology. The aim of this contribution was to evaluate excess level of Zn on growth of important South African medicinal plant *Rumex crispus* L.. Seedlings of *R. crispus* L. were grown in perlite in various treatments: control (Hoagland solution) Zn 100 and Zn 200. The length of roots, fresh and dry weight of bellow- and aboveground biomass, and concentration of Zn in roots and shoots has been determined. We found that plants treated with Zn were considerably smaller and their bellow- and aboveground biomass was significantly lower when compared with control. The concentration of Zn was higher in roots than in shoots and increased significantly with increased Zn concentration in the medium.

Kľúčové slová: Juhoafrická flóra; *Rumex crispus*; ťažké kovy; zinok; toxické prvky.

Úvod a formulácia cieľa

Kapská floristická oblasť je územie, ktoré sa rozkladá na juhozápadnom pobreží Južnej Afriky. Napriek svojej malej rozlohe (len 90 000 km²) sa na nej nachádza extrémne vysoké množstvo rastlinných druhov, z ktorých vysoké percento tvoria endemity. V tejto oblasti sa vyskytujú domorodé kmene Khoikhoi a San, ktoré rôzne druhy týchto rastlín, vďaka vysokému obsahu účinných látok, antimikrobiálnym, antibakteriálnym, antimalarickým či prychotropným účinkom využívajú na terapeutické účely. V súčasnosti sa svetové farmakologické firmy orientujú stále viac na prírodné produkty a tak sa aj táto oblasť stáva pre nás čoraz viac atraktívnejšou [1]. Územie Južnej Afriky a jeho pôdy sú však kvôli ťažbe zlata a iných nerastných surovín jednou z najznečistenejších oblastí na svete. Ťažké kovy, ktoré sa lúhujú do pôdy a spodných vôd sa prirodzenou cestou dostávajú až do rastlinných pletív. Tie sa potom využívajú v tradičnej medicíne a ťažké kovy z nich môžu spôsobiť hnačky, zvracanie, zápaly, v niektorých prípadoch spôsobujú dokonca mutagenézu [2].

Zinok (Zn) patrí medzi esenciálne prvky a v optimálnej koncentrácii je nevyhnutný pre správny priebeh fyziologických reakcií a fungovanie metabolizmu rastlín. Je známe, že prítomnosť Zn v nadmernom množstve pôsobí na rastliny toxicky [3]. Práve preto sme si vybrali za cieľ nášho výskumu vplyv zvýšených koncentrácií zinku na rastliny druhu *Rumex*

crispus, ktorý sa vo veľkej miere v tradičnej juhoafrickej medicíne využíva.

Materiál a metódy

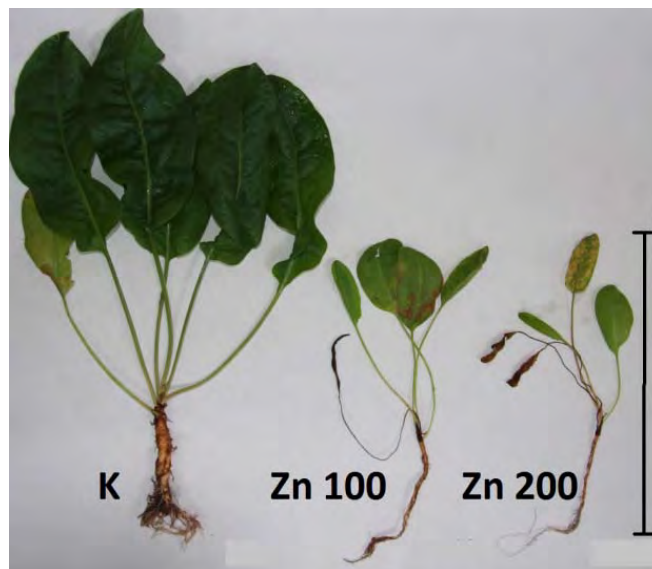
Ako experimentálny materiál sme použili rastliny štiavu kučeravého (*Rumex crispus* L.), ktorých semená sme získali z Botanickej záhrady Univerzity Kwa-Zulu Natal v Pietermaritzburgu v Juhoafrickej Republike. Semená sme vysadili do kvetináčov s perlitom, ktoré sme uložili do kultivačnej komory s kontrolovaným teplotným režimom 25°C/23°C deň/noc a fotoperiódou 16/8 hodín svetlo/tma. Relatívna vlhkosť vzduchu v komore dosahovala 60% a intenzita osvetlenia bola 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Rastliny sme pestovali v troch variantoch: kontrolný (Hoaglandov roztok), Zn 100 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ s koncentráciou 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$) a Zn 200 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ s koncentráciou 200 $\mu\text{mol l}^{-1}$). Od prvého dňa kultivácie sme rastliny vo všetkých variantoch každých sedem dní polievali 300 ml Hoaglandovým živným roztokom s plnou koncentráciou živín [4]. Po štyroch týždňoch kultivácie sme začali pri Zn variantoch do média pridávať Zn a rastliny sme kultivovali ďalších 8 týždňov. Rastliny sme teda celkovo pestovali 12 týždňov.

Na konci kultivácie sme rastliny vybrali z kvetináčov, korene zbavili zvyškov perlitu, dôkladne umyli v destilovanej vode a osušili medzi dvoma hárkami filtračného papiera. Následne sme pri každej rastline oddelili nadzemnú a podzemnú časť, zmerali jej čerstvú, a po vysušení (7 dní v sušičke pri teplote 70°C) aj suchú hmotnosť. Na meranie hmotnosti sme použili analytické váhy Sartorius MC1 Analytic AC120S. V nadzemných aj podzemných orgánoch jednotlivých rastlín sme zisťovali aj koncentráciu zinku. Jednotlivé vzorky sme pripravili homogenizáciou rastlinného materiálu v trecej miske, ktorú sme medzi jednotlivými vzorkami dôkladne premyli destilovanou vodou a osušili, aby nedošlo ku ich vzájomnej kontaminácii. Stanovenie obsahu Zn metódou atómovej hmotnostnej spektrofotometrie (AAS) bolo vykonané na Ústave laboratórneho výskumu geomateriálov Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave.

Výsledky a diskusia

Medzi jednotlivými variantmi sme zaznamenali vizuálne rozdiely v raste, najvýraznejšie boli medzi kontrolným a oboma zinkovými variantmi (Zn 100 aj Zn 200), pričom tieto dva sa od seba veľmi neodlišovali. V nadzemnej časti sa toxicita zinku prejavila výraznou redukciou celkového rastu, zníženým počtom listov, chlorózami a nekrotami listov. Podobný vplyv Zn na rast inej liečivej rastliny juhoafrickej flóry pozorovali [5]. Pri podzemnej časti rastlín sme zaznamenali podobný trend, dĺžka hlavného aj bočných koreňov

nebola v zinkových variantoch redukovaná. Naopak, korene boli dlhšie, no výrazne tenšie ako korene kontrolného variantu (Obr. 1).

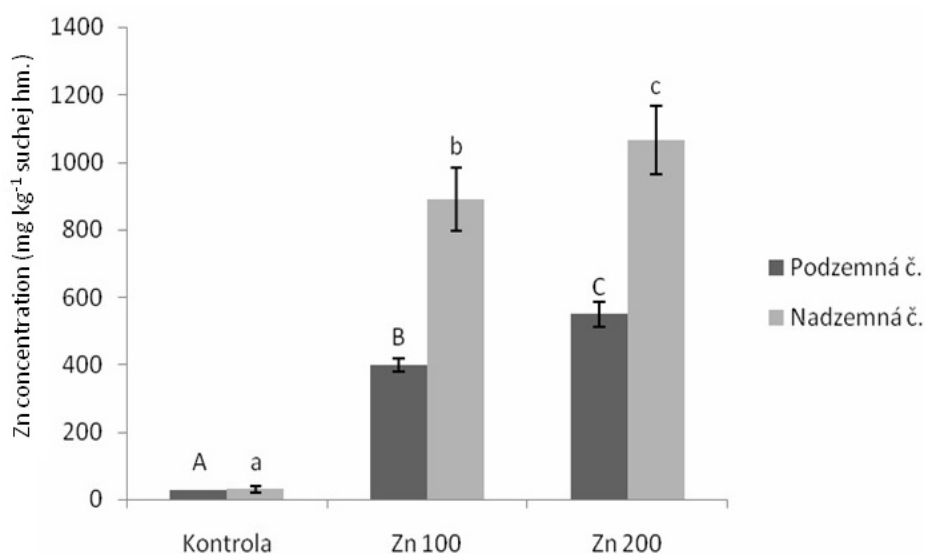


Obr. 1 Celkový pohľad na nadzemnú a podzemnú časť 12-týždňových rastlín *R. crispus*. Varianty: **K** – kontrola, **Zn 100** a **Zn 200**. Mierka 30 cm

Podobné výsledky sme zaznamenali aj pri meraní čerstvej hmotnosti nadzemnej a podzemnej časti rastlín. V prípade oboch Zn variantov klesla hmotnosť čerstvej biomasy nadzemnej aj podzemnej časti oproti kontrole o viac ako 90 %. Pri porovnávaní hmotnosti sušiny sme zistili, že v prípade nadzemnej časti klesla hmotnosť pri Zn 100 o 88% a pri Zn 200 o 90% v porovnaní s kontrolou. Podobne sme zistili, že so stúpajúcou koncentráciou Zn v médiu klesla hmotnosť sušiny podzemnej časti o 92% pri Zn 100 a o 94% pri Zn 200 v porovnaní s kontrolou.

Pri stanovení koncentrácie Zn v nadzemných a podzemných častiach hydroponicky pestovaných rastlín sme zistili, že v oboch Zn variantoch bola až dvojnásobne vyššia koncentrácia Zn v nadzemných častiach rastlín. V prípade kontrolného variantu sme nezistili výrazné rozdiely v koncentrácii Zn medzi podzemnou a nadzemnou časťou rastlín (Obr. 2). Pri väčšine rastlinných druhov je známe, že koncentrácia Zn je vyššia v koreňoch ako v nadzemných častiach [3]. Na základe analýzy koncentrácie Zn v pletivách predpokladáme, že druh *R. crispus* sa vyznačuje dobrou translokáciou Zn do nadzemných častí. Keďže hlavným predmetom zberu pre farmaceutické účely je práve podzemná časť, vysoká účinnosť translokácie môže byť z tohto pohľadu výhodou. Okrem toho, listy tohto druhu je možné využiť pri príprave vegetariánskych pokrmov alebo ako alternatívu k inej listovej zelenine.

Preto zvýšená akumulácia Zn v listových pletivách by mohla doplniť nedostatok Zn vo výžive.



Obr. 2 Koncentrácia Zn v nadzemných a podzemných častiach rastlín *R. crispus* v jednotlivých variantoch (mg kg⁻¹ suchej hmotnosti)

Záver

Z našich experimentov vyplýva, že zvýšená koncentrácia Zn v médiu negatívne ovplyvnila rast rastlín druhu *R. crispus*, čo sa prejavilo najmä na zníženej tvorbe biomasy podzemnej a nadzemnej časti. Medzi aplikáciou ZnSO₄·7 H₂O s koncentráciou 100 μmol l⁻¹ a ZnSO₄·7 H₂O s koncentráciou 200 μmol l⁻¹ sme nezaznamenali výraznejšie rozdiely. Nižšia koncentrácia Zn v koreni ako v nadzemnej časti naznačuje, že zber podzemných orgánov tejto rastliny na farmakologické účely by sa mohol realizovať aj v pôdach mierne kontaminovaných Zn.

Pod'akovanie

Táto práca bola súčasťou riešenia projektov podporených Agentúrou pre podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0140-10 a APVV SK-FR-0020-11, ako aj súčasťou riešenia projektu podporeného grantovou agentúrou VEGA 1/0817/12 a je súčasťou COST Action FA0905. Autori ďakujú Dr. M. G. Kulkarni (Pietermaritzburg, Južná Afrika) za poskytnutie semien.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Light M. E., Sparg S. G., Stafford G. I., et al. (2005) *J. Ethnopharmacol.* 100, p. 127
- [2] Fennel C. W., Lindsey K. L., McGaw L. J., et al. (2004) *J. Ethnopharmacol.* 94, p. 205
- [3] Broadley M. R., White P. J., Hammond J. P., et al. (2007) *New Phytol.* 173, p. 677
- [4] Hoagland D. R., Arnon D. I. (1950) *Circ. Univ. Calif. Agric. Exp. Station, Berkley* p. 347
- [5] Street R. A., Kulkarni M. G., Stirk W. A., et al. (2007) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 79, p. 371

Vplyv Elm1 proteín kinázy na kvasinkový septínový komplex

Csilla Patasi, Marian Farkašovský

Ústav molekulárnej Biológie SAV, Oddelenie molekulárnej mikrobiológie, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovenská republika; csilla.patasi@savba.sk

Abstract

Septins are a conserved GTP-binding and filament-forming proteins, that play important role in cytokinesis and other cellular processes. They serve as a diffusion barrier between the mother and daughter cells and form a scaffold for the binding of other proteins. Protein kinases are potential regulators of septins, because mutations in these genes lead to defects in the organization of septins. We have expressed and isolated a protein kinase Elm1, which is suggested to be involved in the regulation of septins. In the presence of protein kinase Elm1, we have observed changes in the filaments organization *in vitro*. The results suggest that Elm1p belongs to the protein kinases which has an important role in the regulation of higher-order septine structures.

Kľúčové slová: septin complex; Elm1 protein kinase; cytokinesis

Úvod a formulácia cieľa

Septíny patria do skupiny evolučne konzervovaných génov, ktoré majú dôležitú úlohu v bunkovom delení. Tvoria rodinu proteínov, ktoré sa počas cytokinézy usporiadajú do vysoko organizovaných štruktúr [1]. Septíny formujú na rozhraní materskej bunky a tvoriaceho sa púčika filamentárny prstenec, ktorý je potrebný pre normálny priebeh cytokinézy buniek [2, 3].

V eukaryotických organizmoch sa nachádza viac génov kódujúcich septíny. V kvasinkách bolo identifikovaných sedem génov: *CDC3*, *CDC10*, *CDC11*, *CDC12*, *SHS1*, *SPR28*, *SPR3*, z ktorých posledné dva gény sa exprimujú len počas sporulácie [4, 5]. Tieto gény majú konzervované sekvencie, architektúra génov a génovej kontroly sú nápadne podobné u ľudí a v kvasinkách [6]. Septíny interagujú prostredníctvom svojich konzervovaných domén s rôznymi proteínmi [7].

Na regulácii asemblácie septínov sa podieľa viacero proteínov, ako sú napríklad proteín kinázy. Jednou z nich je Elm1 proteín kináza, ktorá je prítomná v najväčšom množstve na konci bunkového cyklu [8]. Elm1p proteín kináza bola identifikovaná pri hľadaní substrátov mitotických cyklínov [9]. Zistilo sa, že lokalizácia Elm1 proteínu závisí od septínu Cdc12 a naopak je táto kináza súčasne potrebná pre lokalizáciu septínov Cdc12 a Cdc11 [8, 10]. Súčasná delécia G1 cyklínov a *ELM1* je letálna pre bunku, čo naznačuje jeho dôležitú úlohu aj na začiatku bunkového cyklu [11]. Elm1p nie je esenciálna pre bunku, ale delécia génu vedie k poruchám rastu buniek a bunkový fenotyp pripomína fenotyp mutantov

závadných vo funkciách septínov [12, 13, 14]. Elm1 proteín kináza v spolupráci s ďalšími kinázami je dôležitá pre stabilitu a funkciu septínového prstenca, čo je nevyhnutné pre normálnu cytokinézu. Naším cieľom bola expresia a purifikácia Elm1 proteín kinázy ako aj zistenie vplyvu proteín kinázy na tvorbu filamentov a štruktúr vyššieho poriadku septínov.

Materiál a metódy:

Použité bakteriálne kmene: *S. cerevisiae* BJ 5628, Genotyp: *MATa/alpha ura3-52/ura3-52 +trp1 leu2d1/+ his3d200/his3d200 pep4::HIS3/pep4::HIS3 prb1d1.6R/prb1d1.6R can1/can1 GAL/GAL*

E. coli DH5 α , Genotyp: F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80*dlacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ -

Plazmidy: Pri príprave expresných plazmidov sme použili expresný vektor pYES2/TH.

Izolácia plazmidovej DNA: QIAprep®Spin Miniprep Kit (Qiagen)

Izolácia DNA fragmentu z agarózového gélu: QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen)

Enzymy a primery: Expresný vektor sme štiepili enzýmami SacI+XhoI a PCR produkt sme štiepili enzýmami SacI a Sall (New England, Biolabs). Na ligáciu sme použili T4 DNA ligázu (New England, Biolabs).

PCR amplifikácia: Reakčná zmes (50 μ l) obsahovala 1 μ M každého primeru, 20 ng templátu, 2,5mM MgCl₂ (Fermentas), 1x Pfu buffer-MgCl₂ (Fermentas), 0,2 mM dNTP, 1U *Pfu* polymerázu (Fermentas), 1,5 U *Taq* DNA polymerázy (Qiagen). Sekvencie primerov sú uvedené v tabuľke 2.

Tab. 1 PCR cyklus

Cyklus	Teplota	Čas	Opakovanie cyklu
začiatočná denaturácia	95°C	3min	1x
denaturácia	95°C	30s	30x
anelácia	48°C	30s	
polymerizácia	72°C	2:30+10s v každom cykle	
záverčná polymerizácia	72°C	7min	1x
záverčné chladenie	4°C	∞	1x

Tab. 2 Sekvencie primerov Elm1

Primer	Sekvencia
Elm1_N	5'CCAAGAGCTCATGTACCTCGACAGCTTATAACC'3
Elm1_C	5'CCAAGTCGACTATTTGACCATTATCTGCAAAGTTC'3

Elektroporácia *E. coli*: Electro Cell Manipulator 630, Elektroporácia 4,8 ms, 200 Ω , 2500 V, 25 μ F (BTX)

Transformácia kvasinkových buniek: podľa Gietz R.D. a Woods R.A., 2002 [15]

Indukcia expresie: 2% galaktóza (Sigma) do tekutej kvasinkovej kultúry pri OD₆₀₀ = 0,6

SDS polyakrylamidová gélová elektroforéza: podľa Laemmli, 1970 [16]

Farbiaci roztok: 1g CCB R-250 metanol:kyselina octová:H₂O=5:1:5

Homogenizácia: Mechanicky, v mažiari s tekutým dusíkom

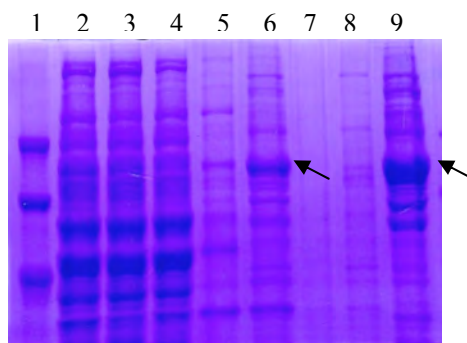
Purifikácia: Cez Ni-NTA kolónku (5 ml). Tlmivý roztok základ: 25mM NaHPO₄ pH 7,8; 0,3M NaCl; 0,5mM MgCl₂; 5mM 2-Merkaptoetanol; Proteinázové inhibítory (Roche); 0,2mM PMSF a rôzne koncentrácie imidazolu: A. 6mM imidazol na ekvilibráciu kolónky a na prvé premývanie; B. 10mM imidazol a 0,5M NaCl na druhé premývanie; C. 300mM imidazol a 0,5M NaCl na elúciu. Po nariadení elučnej frakcie 6x pufrom 25mM NaHPO₄ pH 7,8 sa nanáša na HiTrap-Q sepharózovú kolónku (1 ml) ekvilibrovaný tlmivým roztokom: 20mM Tris-Cl pH 7,9; 1mM MgCl₂; 5mM 2-Merkaptoetanol; 0,1M NaCl, ďalej sa premýva tým istým tlmivým roztokom s obsahom 0,2M NaCl a eluuje sa 0,5M NaCl.

Western blot: podľa Burnette W.N., 1981 [17]. Použité protilátky: His probe (H-15) Rabbit polyclonal IgG (Biotechnology), Anti rabbit IgG HRP (Promega).

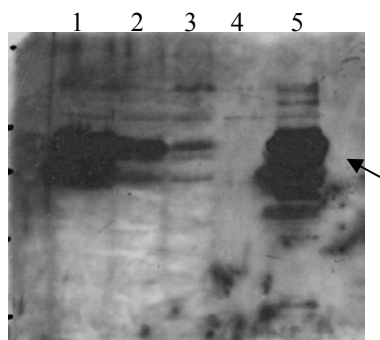
Výsledky a diskusia:

PCR metódou získaný gén *ELM1* sme klonovali do kvasinkového expresného vektora pYES2/TH. Vektor pYES2/TH obsahuje GAL1 promótor, ktorý zabezpečuje vysokú úroveň expresie v kvasinkových bunkách v prítomnosti galaktózy [18]. Selekcia transformantov je zabezpečená *URA3* génom pYES2/TH plazmidu a His-Tag kódujúca sekvencia na plazmide vytvorí histidínové zvyšky na koniec naklonovaného proteínu. Pripravený konštrukt sme transformovali chemickým spôsobom do kmeňa *S. cerevisiae* BJ 5628 a testovali sme expresiu proteínu. Po afinitnej chromatografii na Ni-NTA agaróze prostredníctvom väzby histidínových zvyškov exprimovaného Elm1 proteínu a po ionomeničovej chromatografii sme

získali prečistený proteínový produkt (Obr. 1). Pomocou Western blot analýzy sme overili exprimovaný proteín vo veľkosti 72 kDa (Obr. 2).

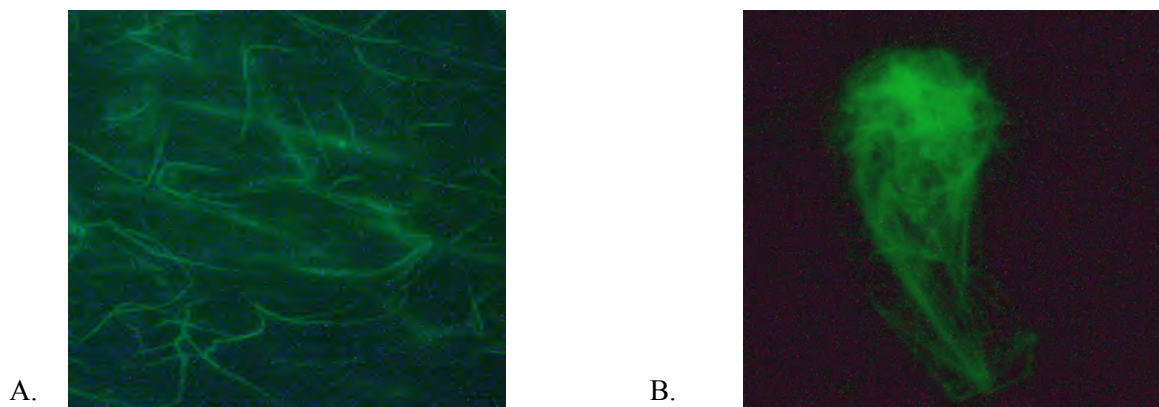


Obr. 1 9% SDS-PAGE – Expresia proteínu Elm1 v bunkách *S.cerevisiae* BMA 5628 - Dráha 1: Ladder (Ge healthcare), 2: homogenát vzorky, 3: vzorka po nanášaní na Ni-NTA kolónku, 4: po premytí izolačným pufrom A, 5: po premytí izolačným pufrom B, 6: eluovaný proteín vo veľkosti 72kDa, 7: vzorka po nanášaní na sepharózovú kolónku, 8: po premytí pufrom 0,2M NaCl, 9: eluovaný purifikovaný proteín vo veľkosti 72kDa.



Obr. 2 Western blot proteínu Elm1 1: homogenát vzorky, 2: vzorka po nanášaní na Ni-NTA kolónku, 3: po premytí izolačným pufrom A, 4: po premytí izolačným pufrom B, 5: eluovaný proteín vo veľkosti 72kDa.

Na zistenie vplyvu proteín kinázy na tvorbu filamentov septínov sme pridali purifikovaný Elm1 proteín k purifikovanému septínovému komplexu po dialýze (izolované podľa Farkašovský a kol., 2005) [19], ktorý bol značený GFP. Na zabezpečenie kinázovej aktivity proteínu bolo potrebné pridať aj $MgCl_2$ a ATP. Fluorescenčným proteínom značené filameny sme pozorovali vo fluorescenčnom mikroskope (Leica DM2500). Na Obr. 3A. je vidieť polymerizované filameny septínového komplexu, ktoré sa tvoria pri nízkych koncentráciách solí. Po pridaní purifikovaného proteínu Elm1 k septínovému komplexu sme zaznamenali zmeny v usporiadaní septínových filamentov len keď bolo zároveň prítomné ATP (Obr. 3B.).



Obr. 3 Obrázky z fluorescenčne značených filamentov – A, Septínový komplex pred pridaním proteínu Elm1. B, Septínový komplex po pridaní Elm1 proteínu.

Podľa týchto výsledkov predpokladáme, že prítomnosť Elm1 proteín kinázy môže mať dôležitú úlohu v regulácii septínových filamentov. Zosieťovanie septínových vlákien v prítomnosti Elm1 proteín kinázy má pravdepodobne stabilizačnú funkciu a môže napomôcť vytváraniu vysoko organizovanej štruktúry septínov.

Záver

Podarilo sa nám izolovať proteín kinázu Elm1 v preparatívnom množstve a overili sme exprimovaný proteín Western blot analýzou. Po pridaní izolovaného proteínu k septínovému komplexu sme zistili, že Elm1 má vplyv na organizáciu septínových filamentov.

Pod'akovanie

Moje poďakovanie patrí môjmu školiteľovi RNDr. Marianovi Farkašovskému, CSc. za cenné rady a pomoc v laboratóriu. Projekt je financovaný z VEGA grantu 2/0050/11.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Byers B. and Goetsch L. (1976) J. Cell Biol. 69, p. 717
- [2] Lippincott J., Shannon K.B., Shou W., Deshaies R. J., Li R. (2001) J. Cell Sci. 114, p. 1379
- [3] Longtine M.S. and Bi E. (2003) Trends Cell Biol. 13 (8), p. 403
- [4] Hartwell L. (1971) Exp. Cell. Res. 69, p. 265
- [5] Fares H. Goetsch L. and Pringle J.R. (1996) J. Cell Biol. 132, p. 399
- [6] Caudron F. and Barral Y. (2009) Dev Cell. 16, p. 493
- [7] Nakahira M., Macedo J. N., Seraphim T. V. et al. (2010) PLoS One. 5(11), p. 13799

- [8] Bouquin N., Barral Y., Courbeyrette R. et al. (2000) *J. Cell Sci.* 113, p.1435
- [9] Ubersax J.A., Woodbury E.L., Quang P.N. et al. (2003) *Nature* 425, p.859-64.
- [10] Thomas C.L., Blacketer M.J., Edgington N.P. and Myers A.M. (2003) *Yeast* 20, p. 813
- [11] Sreenivasan, A., Bishop, A., Shokat, K. and Kellogg, D. (2003) *Mol. Cell. Biol.* 23, p.6327
- [12] Barral Y., Parra M., Bidlingmaier S. and Snyder M. (1999) *Genes Dev.* 13, p.176
- [13] Cvrcková F., De Virgilio C., Manser E. et al. (1995) *Genes Dev.*, 9 (15), p. 1817
- [14] Longtine M.S., Fares H. and Pringle J.R. (1998) *J. Cell Biol.* 143 (3), p. 719
- [15] Gietz R.D. and Woods R.A. (2002) *Methods Enzymol.* 350, p. 87
- [16] Laemmli U. K. (1970) *Nature.* 227 (5259), p. 680
- [17] Burnette W. N. (1981) *Anal. Biochem.* 112 (2), p. 195
- [18] Giniger E., Barnum S.M., and Ptashne M. (1985) *Cell.* 40, p. 767
- [19] Farkasovsky M., Herter P., Voss B., Wittinghofer A. (2005) *Biol. Chem.* 386, p. 643

Drug combination study on histone deacetylase inhibitors and hypericin-mediated photodynamic therapy

Andrea Perrone Halaburková, Ján Koval', Rastislav Jendželovský, Jaromír Mikeš,
Lucia Mikešová, Peter Fedoročko

*P. J. Šafárik University in Košice, Faculty of Science, Institute of Biology and Ecology,
Moyzesova 11, 040 01 Košice, Slovakia, andrea.halaburkova@gmail.com*

Abstract

Deregulation of epigenetic modifications on histones and DNA activates and deactivates genes involved in tumorigenesis. Therefore, inhibitors of histone deacetylase (HDIs) are a new promising group of anticancer drugs. Photodynamic therapy (PDT) uses tumour-localizing agent (photosensitizer) that when activated with light of a specific wavelength triggers different processes leading to cell death. We analysed the impact of two groups HDIs; the hydroxyamic acid derivatives and the short chain fatty acids alone and in combination with hypericin-mediated photodynamic therapy (HY-PDT) on a human adenocarcinoma cell line. A significant effect of HDIs alone on total cell number, mitochondrial membrane potential and viability/metabolic activity of cells was noted. Combination of HDIs with HY-PDT induced more pronounced changes in the observed parameters. This knowledge provides the basis for the possible application of HDIs in the augmentation of HY-PDT effects.

Keywords: *histone deacetylase inhibitors, acetylation, photodynamic therapy, hypericin.*

Introduction

Histone deacetylase inhibitors (HDIs) are a new promising group of anticancer drugs. Acetylation of histones along with other epigenetic modifications has been described as the main epigenetic regulators controlling cell fate [1]. HDIs induce hyperacetylation of proteins/histones, thus decondensing chromatin structure, which subsequently increases accessibility of DNA to transcription factors and activates specific genes, tumor suppressor, oncogenes and non-histones proteins implicated in differentiation, proliferation, cell cycle and apoptosis. Moreover, HDIs through processes described above, may enhance the cytotoxicity of drugs targeting DNA. HDIs are of both natural and synthetic origin and have demonstrated potent anticancer activity in many pre-clinical and clinical trials either as monotherapies or in combination with conventional chemotherapy [2, 3]. These include derivatives of hydroxamic acid: suberoylanilid hydroxamic acid (Vorinostat, SAHA) used for treatment of cutaneous T-cell lymphoma and trichostatin A (TSA), an antifungal antibiotic, and a group of short-chain fatty acids HDIs: valproic acid (VPA) used to treat epilepsy and sodium phenylbutyrate (NaPB) used to treat disorders of the urea cycle.

Photodynamic therapy (PDT) is a less invasive method using tumor-localizing agent that is activated by irradiation with light of specific wavelength. This starts the production of

reactive oxygen species (ROS), subsequently triggering processes implicated in irreversible changes to various cellular targets leading to cell death [4]. Hypericin (HY), a naturally occurring aromatic polycyclic diantraquinone from St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.), has unique photocytotoxic properties.

Remodeling of chromatin structure may contribute to enhanced sensitivity to photochemical and photobiological processes caused by PDT, increasing the ability of oxygen radicals to attack DNA thus influence cell differentiation and cell death. The aim of this study was to evaluate the impact of HDIs alone and in combination with hypericin-mediated photodynamic therapy (HY-PDT) on the response of a human colon adenocarcinoma cell line.

Materials and methods

HT-29 (human colon adenocarcinoma cell line) cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (PAA Laboratories GmbH, Austria) and 7.5% NaHCO₃ (10 ml.l⁻¹), penicillin 100 U.ml⁻¹, streptomycin 100 mg.ml⁻¹ and amphotericin 25 mg.ml⁻¹ (Invitrogen, USA) in a Heraeus CO₂ incubator (HeraCell 240, Thermo Scientific, UK) at 5% CO₂, 37°C and 95% humidity.

For the experiments, cells were seeded (for metabolic activity: in 96-well plates; for cytometric and cytokinetic evaluation in 60 mm Petri dishes (both TPP, Switzerland)) and left to settle for 24h. Cells were pre-treated for 24h with two different concentration of each HDI: SAHA (S1 – 1 µM, S2 – 2.5 µM), TSA (T1 – 250 nM, T2 – 500 nM) (both Sigma-Aldrich, USA), VPA (V1 – 0.5 mM, V2 – 1 mM) and NaPB (N1 – 0.5 mM, N2 – 1 mM) (both Santa Cruz, USA), and for 16h with hypericin (HY – 75 nM, AppliChem GmbH, Germany) prior to HY-PDT. An irradiation device consisting of a set of 11 white L18W/ 30 lamps (Osram, Germany) with maximum emission range 530 – 620 nm (fluence rate 3.15 mW.cm⁻²) was used to activate hypericin, with a total dose of 3.15 J.cm². Results were analysed 24h and 48h after HY-PDT.

Metabolic activity of cells was evaluated using the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma–Aldrich,USA) assay as described previously [5].

Changes in absolute numbers of cells within individual groups were evaluated by counting with Coulter Counter (Model ZF, Coulter Electronics Ltd, UK). Total cell number was expressed as the percentage of the untreated control.

Changes in mitochondrial membrane potential (MMP) were analysed with the FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, USA) using TMRE (tetramethylrhodamine

ethyl ester perchlorate, Molecular Probes, Inc., USA) as described previously [5].

Viability and metabolic activity of cells was analysed with the FACSCalibur flow cytometer using double staining with FDA (fluorescein diacetate) final concentration 10 nM, and PI (propidium iodide) final concentration 1 mg.ml⁻¹, (both Sigma-Aldrich, USA).

Statistical analysis; results were calculated and presented as mean ± standard deviation (SD) of at least three independent experiments. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's post-test at a 95 % confidence level (P < 0.05).

Results and discussion

Based on extensive screening by MTT assay (data not shown), one hypericin (75 nM) and two concentrations for each HDI (see Material and methods) were chosen for further experiments. Analysis of total cells number demonstrated that pretreatment of cells with all HDIs alone (except for VPA 0,5 mM at 24h) and HY-PDT reduced total cell number significantly. A more pronounced drop in this parameter was observed when combined treatment of HDIs with HY-PDT was applied (Tab. 1).

The impact of HDIs and of HY-PDT was further characterized using flow cytometry. Lower concentrations of TSA significantly decreased MMP in comparison to other HDIs (Fig. 1). Pretreatment with higher concentrations of SAHA and TSA made cells more vulnerable to damage resulting from HY-PDT and this led to intensive and considerable dissipation of the MMP. A similar pattern of the effect on MMP between the two groups of HDIs used was also observed.

Tab. 1 Changes in total cell number. Results are presented as mean ± SD of at least three independent experiments. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's post-test. Groups treated with HY-PDT and HDIs alone were compared with the control group (* indicates P < 0.05). Experimental groups with combined treatment were compared with the control group (* indicates P < 0.05) and with groups treated with both agents alone (□ indicates P < 0.05, respectively for HDIs alone and ○ indicates P < 0.05, respectively for HY-PDT alone)

%	Control	SAHA 1 μM	TSA 250 nM	VPA 0.5 mM	NaPB 0.5 mM	SAHA 2.5 μM	TSA 500 nM	VPA 1 mM	NaPB 1 mM
24h	100 ± 3.44	74.81 ± 5.97 *	59.15 ± 6.82 *	81.71 ± 8.4	75.36 ± 12.94 *	49.75 ± 9.53 *	55.96 ± 3.07 *	56.85 ± 16.41 *	71.78 ± 10.06 *
48h	100 ± 1.04	77.39 ± 7.06 *	49.95 ± 14.27 *	74.07 ± 9.17 *	70.96 ± 8.66 *	31.52 ± 2.72 *	32.08 ± 2.52 *	51.3 ± 3.06 *	48.59 ± 5.84 *
HYP	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24h	74.61 ± 6.38 *	60 ± 7.56 *	52.22 ± 5.37 *○	73.9 ± 10.57 *	67.7 ± 4.1 *	46.96 ± 7.12 *○	45.45 ± 7.72 *○	53.02 ± 12.08 *○	59.35 ± 8.49 *
48h	57.97 ± 10.52 *	46.67 ± 5.57 *□	35.9 ± 7.2 *○	50.26 ± 9.61 *□	42.44 ± 4.56 *□○	35.54 ± 2.92 *○	29.76 ± 2.34 *○	40.04 ± 1.83 *○	37.34 ± 5.29 *○

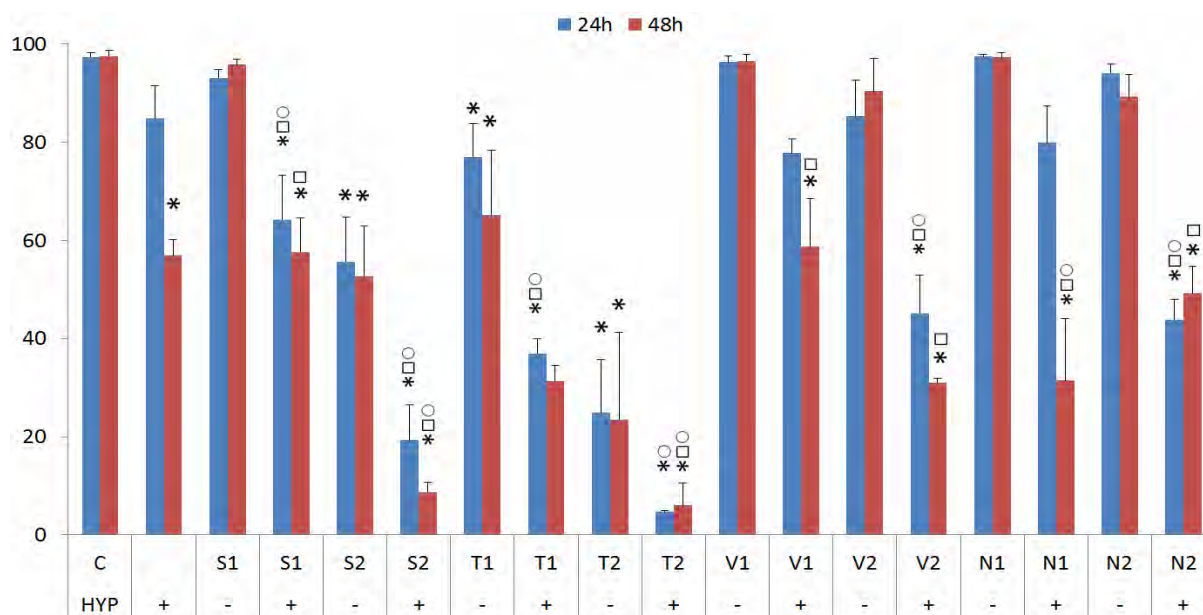


Fig. 1 Effect of HDIs alone and in combination with HY-PDT on cell mitochondrial membrane potential. C – control, SAHA (S1 – 1 μ M, S2 – 2.5 μ M), TSA (T1 – 250 nM, T2 – 500 nM), VPA (V1 – 0.5 mM, V2 – 1 mM) and NaPB (N1 – 0.5 mM, N2 – 1 mM). Results are presented as mean \pm SD of at least three independent experiments. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's post-test. Groups treated with HY-PDT and HDIs alone were compared with the control group (* indicates $P < 0.05$). Experimental groups with combined treatment were compared with the control group (* indicates $P < 0.05$) and with groups treated with both agents alone (\square indicates $P < 0.05$, respectively for HDIs alone and \circ indicates $P < 0.05$, respectively for HY-PDT alone)

Subsequently, we analysed the effect of HDIs, HY-PDT and their combination on the viability/metabolic activity of cancer cells. Similarly to the MMP, we observed a higher potential of the hydroxamic acid derivates (SAHA, TSA) to sensitize cancer cells to the effect of HY-PDT. We detected a significantly higher number of dead cells in combined treatment than when drugs were applied alone at both time intervals (data are presented only for the 48h time interval - Fig. 2).

Histone deacetylase inhibitors play an important role in inducing growth arrest, differentiation, and/or apoptosis in cancer cells. The preferential toxicity of HDIs in transformed cells and their ability to synergistically enhance the anticancer activity of many chemotherapeutic agents has made HDIs an interesting target of science research [6]. There is no publication reporting the effect of the combination of HDIs with HY-PDT up to date, so we can only discuss our results, due to the close nature of both therapies, with radiation therapy. It has been shown that TSA and VPA can be powerful radiosensitizers in cells of different histological origin [7, 8]. This can be explained by the modulation of DNA damage signalling and repair [9] and/or by the production of ROS, which has been seen also to be increased by SAHA [10]. This is in correlation with the knowledge that HDIs induce cell

death via the mitochondrial pathway [11]. Although it is known that the action of PDT and/or HY-PDT is not targeted on genomic DNA and the HY itself is not genotoxic, we presume that the potentiation effect of HDIs on HY-PDT is mediated by changes in chromatin structure and expression of proteins involved in programmed cell death regulation. Our results support these results and add a new promising approach to enhance the effect of HY-PDT.



Fig. 2 Effect of HDIs alone and in combination with HY-PDT on the viability/metabolic activity of cells at 48h. C – control, SAHA (S1 – 1 μ M, S2 – 2.5 μ M), TSA (T1 – 250 nM, T2 – 500 nM), VPA (V1 – 0.5 mM, V2 – 1 mM) and NaPB (N1 – 0.5 mM, N2 – 1 mM). Results are presented as mean \pm SD of at least three independent experiments. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's post-test.

Groups treated with HY-PDT and HDIs alone were compared with the control group (* indicates $P < 0.05$). Experimental groups with combined treatment were compared with the control group (* indicates $P < 0.05$) and with groups treated with both agents alone (\square indicates $P < 0.05$, respectively for HDIs alone and \circ indicates $P < 0.05$, respectively for HY-PDT alone)

Conclusion

In this study, we examined the effect of histone deacetylase inhibitors (HDIs) alone and their combination with hypericin-mediated photodynamic therapy in a colon adenocarcinoma cell line *in vitro*. We observe that HDIs are able to modulate and enhance the cytotoxic effects of hypericin-mediated photodynamic therapy. However, the details of molecular mechanisms mediating photodynamic-sensitization by HDI are at present, not elucidated.

Acknowledgements

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under contract APVV- 0040-10 and the NEXO I and II (Network of Excellence in Oncology) under contract No. ITMS 26220120024 and ITMS 26220120039.

References

- [1] Williams P. J., Nishu K., Rahman M. (2011) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1240 p.18
- [2] De Ruijter A. J. M., van Gennip A. H. Caron H. N., et al. (2003) *Biochem.J.* 370(Pt 3), p.737
- [3] Glaser K. B. (2007), *Biochem. Pharmacol.* 74(5), p.659
- [4] Dougherty T. J., Gomer C. J., Henderson B. W., et al. (1998). *J Natl Cancer Inst.* 90(12), p.889
- [5] Kovač J., Mikeš J., Jendželovsky R., et. al. (2010). *Photochem Photobiol.* 86(1), p.200
- [6] Carew J. S., Giles F. J., Nawrocki S. T. (2008) *Cancer Letters* 269(1), p.7
- [7] Yu J., Mi J., Wang Y. (2012) *Eur J Gynaecol Oncol.* 33(3), p.285
- [8] Karagiannis T. C., El-Osta A. (2006) *Epigenetics* 1(3), p.121
- [9] Groselj B., Sharma N. L., Hamdy F. C. (2013) *Br J Cancer.* 108(4), p.748
- [10] Ruefli A. A., Ausserlechner M. J., Bernhard D. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA.* 98(19), p.10833
- [11] Rosato R. R., Almenara J. A., Dai Y. (2003) *Mol Cancer Ther.* 2(12), p.1273

Porovnanie hypofrakcionačných ožarovacích protokolov používaných v liečbe karcinómu prostaty pomocou externej rádioterapie

Barbora Petrušková^{1,2}, Pavol Matula², Ján Končík², Martin Jasenčák²

¹ Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Ústav fyzikálnych vied, Katedra jadrovej a subjadrovej fyziky, Jesenná 5, 040 01 Košice, Slovenská republika, barbora.petruskova@student.upjs.sk

² Východoslovenský onkologický ústav, a.s., Rastislavova 43, 040 01 Košice, Slovenská republika

Abstrakt

The main aim of this study is to compare two hypofractionated protocols used in the radiotherapy of prostate cancer in terms of late complications in normal tissue. 50 patients in first protocol were irradiated with the dose of 52,8 Gy in 16 fractions. 52 patients included in the second protocol were irradiated with the dose of 62 Gy in 20 fractions. Protocols were compared through dose-volume histograms (DVH) of rectum and bladder and radiobiological calculations with the use of Lyman-Kutcher-Burman model for Normal Tissue Complication Probability (NTCP). Results of NTCP were compared with real incidence of late toxicity for normal tissue.

DVH of rectum and bladder for patients from second protocol have a better behavior than DVHs for patients from first protocol. NTCPs for first protocol are $(12,5 \pm 3,3)\%$ and $(1,6 \pm 1,3)\%$ for rectum and bladder, respectively. NTCPs for second protocol are $(6,8 \pm 3,0)\%$ and $(0,53 \pm 0,9)\%$ for rectum and bladder, respectively. From comparison of results of radiobiological calculations and real incidence had arisen a need of refinement of parameters of LKB model.

Kľúčové slová: rádioterapia; kritické orgány; DVH; rádiobiologické modely

Úvod a formulácia cieľa

Jedným z najčastejšie sa vyskytujúcich nádorových ochorení je karcinóm prostaty, ktorý je na treťom mieste, čo sa týka incidencie nádorových ochorení u mužskej populácie a zároveň aj úmrtnosti [1]. Liečba karcinómu prostaty závisí na štádiu, v akom sa nachádza. Jednou z liečebných modalít je externá rádioterapia, teda liečba ionizujúcim žiarením pochádzajúceho z externého zdroja žiarenia.

Cieľom rádioterapie je pomocou ionizujúceho žiarenia ožiarit nádorové tkanivo, pri čo najmenšom poškodení normálneho tkaniva, ktoré sa nachádza v jeho tesnej blízkosti. Komplikácie, ktoré sa môžu objaviť pri poškodení normálneho tkaniva môžeme rozdeliť na skoré, ktoré sa objavujú počas ožarovania a počas nasledujúcich 6 týždňov a neskoré, ktoré sa môžu objaviť až po niekoľkých mesiacoch. Neskoré rektálne komplikácie sú jedným z najvážnejších negatívnych dôsledkov rádioterapie karcinómu prostaty a môžu mať výrazný vplyv na kvalitu života pacienta. Je preto potrebné vedieť odhadnúť, aká je pravdepodobnosť výskytu komplikácií pre každého pacienta už pri plánovaní rádioterapie. Odpoveď normálnych tkanív na konkrétne ožarovacie schémy umožňujú popísať rádiobiologické modely NTCP (pravdepodobnosť vzniku komplikácií na normálnych tkanivách), a to

v závislosti na biologicky efektívnej dávke (BED) a veľkosti ožiareného objemu normálneho tkaniva. Objem ožiareného tkaniva je popísaný pomocou Dávkovo-Objemového Histogramu (DVH), ktorý je jedným z výsledkov individuálneho plánovania rádioterapie pre každého pacienta.

Cieľom našej práce bolo porovnať dva ožarovacie protokoly, ktoré sa používajú na ožarovanie prostaty, a to vo Východoslovenskom Onkologickom Ústave v Košiciach (VOÚ) a v Inštitúte Regina Elena v Ríme. Porovnávanie bolo robené prostredníctvom dávkovo-objemovej štatistiky, kde bolo tiež sledované, či DVH konečníka a močového mechúra spĺňajú limity stanovené výskumnou skupinou Quantec [2], a radiobiologického modelovania.

Materiál a metódy

V práci boli analyzované DVH konečníka a močového mechúra 50 pacientov s karcinómom prostaty liečených vo VOÚ v období od mája do novembra 2011 a 52 pacientov liečených v Inštitúte Regina Elena v Ríme. Všetci 50 pacienti z VOÚ absolvovali externú rádioterapiu, pričom celková dávka 52,8 Gy bola rozdelená do 16 frakcií (3,3 Gy na frakciu). Pacienti boli ožarovaní 5 krát do týždňa. Celková dávka na prostatu pri konverzii do BED resp. normalizovanej celkovej dávky (NTD), ktorá vyjadruje dávku aplikovanú v dennej frakcionácii s veľkosťou 2 Gy na frakciu, odpovedá $BED = 170$ Gy, resp. $NTD = 66,53$ Gy (pre $\alpha/\beta = 1,5$ Gy). 52 pacientov liečených v Ríme bolo ožiarených dávkou 62 Gy v 20 frakciách (3,1 Gy na frakciu) 4 krát do týždňa. Odpovedajúca hodnota $BED = 190$ Gy, $NTD = 75,64$ Gy.

Rímski pacienti boli ožarovaní 6 poľami pod uhlami 45° , 90° , 135° , 225° , 270° , 315° . Rádioterapia pre každého košického pacienta bola plánovaná v plánovacom systéme Oncentra Master Plan, pričom pacienti boli ožarení 5 poľami pod uhlami 270° , 330° , 30° , 90° a 180° (s malými odchýlkami prihliadajúcimi na individuálnu vnútornú štruktúru pacientov). Pre každého pacienta bol v plánovacom systéme vytvorený DVH všetkých orgánov, ktoré boli pred plánovaním zakreslené lekárom v plánovacom systéme.

Analýza DVH bola zameraná na močový mechúr a konečník, ktoré sú kritickými orgánmi pri ožarovaní karcinómu prostaty. Hodnoty objemu močového mechúra a konečníka boli interpolované pre vopred stanovené hodnoty dávky, aby bolo možné porovnať DVH jednotlivých pacientov. Následne boli vyrátané priemerné, maximálne a minimálne DVH močového mechúra a konečníka pre košických pacientov, ako aj pre pacientov z Ríma.

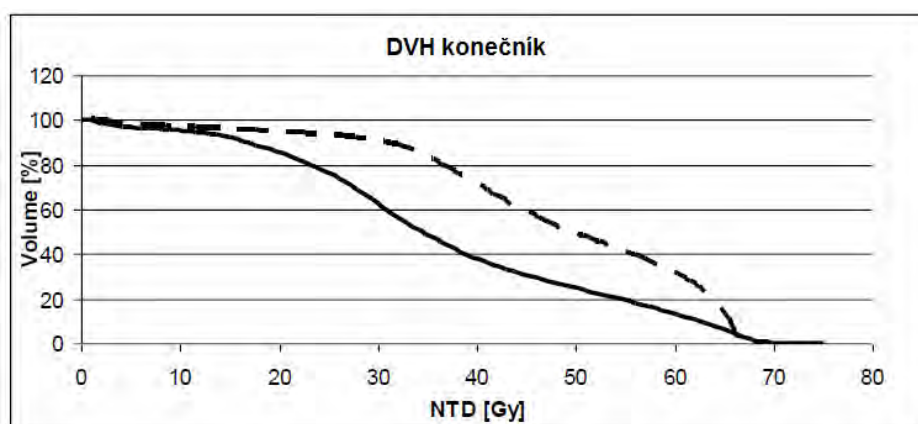
Jedným zo zámerov analýzy bolo posúdenie, či DVH konečníka a močového mechúra

spĺňajú limity stanovené výskumnou skupinou Quantec [2]. Keďže limity stanové v práci [2] boli odvodené z konvenčnej frakcionácie, pri ktorej sa ožaruje dávkou 2 Gy na frakciu, sú použiteľné len pre konvenčné režimy ožarovania. Preto bolo potrebné urobiť prepočet fyzikálnej dávky doručenej hypofrakčionálnym režimom na NTD a dosadením NTD za dávku upraviť jednotlivé DVH. Na takto upravené DVH už môžu byť aplikované limity vychádzajúce z práce [2].

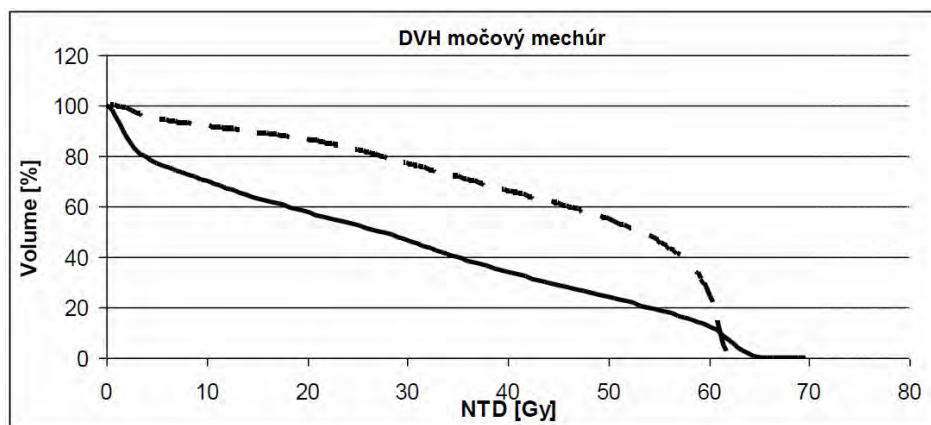
Biologickú účinnosť oboch ožarovacích protokolov sme porovnávali jednak pomocou BED na konečník a tiež prostredníctvom rádiobiologického modelovania. Pre pacientov z oboch inštitúcií boli v programe BioGray pomocou rádiobiologického modelu Lyman-Kutcher-Burman vypočítané hodnoty NTCP pre konečník a močový mechúr. Hodnoty parametrov LKB modelu pre konečník, ktoré boli použité v našej analýze sú: $n=0,09$; $m=0,13$, $TD_{50}=76,8$ Gy, $\alpha/\beta = 3$ Gy, pre močový mechúr: $n = 0,13$; $m = 0,11$; $TD_{50} = 80$ Gy, $\alpha/\beta= 6$ Gy.

Výsledky a diskusia

Prostredníctvom analýzy DVH sme zistili, že limity pre močový mechúr sformulované v práci [2] spĺňajú všetci pacienti, ktorí absolvovali liečbu vo VOÚ v Košiciach, ako aj v Inštitúte Regina Elena v Ríme. Limity pre konečník sú splnené všetkými pacientmi liečenými na rádioterapeutickom pracovisku v Ríme, u pacientov liečených vo VOÚ tieto limity spĺňajú priemerný DVH a všetky DVH s nižším priebehom ako je priemerný. Avšak DVH s hodnotami objemu konečníka vyššími ako je priemer tieto limity nespĺňajú. Na Obr.1, resp. Obr.2 je porovnanie priemerných DVH konečníka, resp. močového mechúra pacientov liečených vo VOÚ a Inštitúte v Ríme.



Obr. 1 Priemerné DVH konečníka pacientov liečených vo VOÚ (čiarkovaná čiara) a pacientov liečených v Inštitúte v Ríme (plná čiara)



Obr. 2 Priemerné DVH močového mechúra pacientov liečených vo VOÚ (čiarkovaná čiara) a pacientov liečených v Inštitúte v Ríme (plná čiara)

Z výsledkov dávkovo-objemovej štatistiky vidíme, že DVH pacientov s karcinómom prostaty liečených na rádioterapeutickom pracovisku v Ríme majú lepší priebeh ako majú pacienti liečení vo VOÚ v Košiciach. Lepší priebeh DVH pacientov z Ríma je spôsobený jednak väčším počtom ožarovacích polí (6 polí proti 5 poliam používaným v Košiciach), ako aj odlišnou technikou kontúrovania (vo VOÚ boli konečník a mechúr zakreslené celé, na rozdiel od Ríma, kde bola zakresľovaná iba stena konečníka a stena mechúra). Zároveň je vo VOÚ pri plánovaní rádioterapie pre karcinóm prostaty kladený veľký dôraz na čo najhomogénnejšie obsadenie cieľovej oblasti plnou dávkou, čo však vedie k zvýšeniu priebehov DVH kritických orgánov.

BED na konečník sú pre jednotlivé ožarovacie protokoly nasledovné: pre ožarovací protokol používaný vo VOÚ je to 110,88 Gy, pre protokol používaný na pracovisku v Ríme je to 126,06 Gy. Ožarovací protokol používaný v Ríme má teda vyššiu biologickú účinnosť na konečník než protokol používaný na rádioterapeutickom pracovisku v Ríme. Je však potrebné zdôrazniť, že vo veličine BED nie je zahrnutý objem ožiareného tkaniva. Ten je zahrnutý až v rádiobiologických modeloch NTCP. Výsledky rádiobiologického modelovania s použitím LKB modelu sú zhrnuté v Tab.1.

Tab. 1 Priemerné hodnoty NTCP konečníka a močového mechúra vypočítané LKB modelom so štandardnými odchýlkami

	VOÚ	Inštitút Regina Elena v Ríme
NTCP(konečník)	(12,5±3,3)%	(6,8±3,0)%
NTCP(mechúr)	(1,6±1,3)%	(0,53±0,9)%

Z výsledkov rádiobiologického modelovania vidíme, že priemerné pravdepodobnosti vzniku komplikácií na močovom mechúre sú veľmi nízke pre oba ožarovacie protokoly. Priemerná hodnota NTCP pre konečník je vyššia pre ožarovací protokol používaný vo VOÚ než pre protokol používaný na pracovisku v Ríme. Reálna incidencia neskorých rektálnych komplikácií pacientov VOÚ zatiaľ nie je k dispozícii, keďže do analýzy boli zahrnutí pacienti liečení v období od mája do novembra 2011. Z doterajších klinických skúseností s týmto ožarovacím protokolom však môžeme povedať, že reálna incidencia neskorých rektálnych komplikácií, resp. neskorých komplikácií na močovom mechúre sa pohybuje okolo 10%, resp. okolo 6%. Reálna incidencia neskorých rektálnych komplikácií, resp. neskorých komplikácií na močovom mechúre pre pacientov z Ríma je podľa [3] a [4] 17%, resp. 16%. Do prác [3] a [4] boli zahrnutí aj pacienti, ktorých sme analyzovali v našej práci, pričom celkový počet pacientov analyzovaných v prácach [3] a [4] bol 168. Na základe porovnania predikovaných a reálnych incidencií neskorých komplikácií môžeme povedať, že je nutné spresnenie parametrov LKB modelu, čo je cieľom našej ďalšej práce.

Záver

V práci boli porovnávané dva hypofrakcionačné ožarovacie protokoly používané pri ožarovaní karcinómu prostaty. Z výsledkov porovnávania môžeme povedať, že ožarovací protokol používaný na rádioterapeutickom pracovisku v Ríme je aj z hľadiska dávkovo-objemovej štatistiky, aj z hľadiska rádiobiologického modelovania pre pacientov výhodnejší. Avšak reálna incidencia neskorých rektálnych komplikácií je nižšia pre ožarovací protokol používaný vo VOÚ. Z porovnania výsledkov rádiobiologického modelovania a reálnej incidencie neskorých komplikácií na kritických orgánoch tak vidíme potrebu spresnenia parametrov LKB modelu, čo je cieľom našej ďalšej práce.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Safarei Diba, Ch.-Pleško, I.-Hlava, P. (2010) Incidencia zhubných nádorov v Slovenskej republike 2006. NCZI, Bratislava, s.40
- [2] Marks, L. et al. (2010) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 76(3), p. 10
- [3] Arcangeli, G. et al. (2011) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 79(4), p. 1013
- [4] Arcangeli, G. et al. (2010) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 78(1), p. 11

Detekcia glukán-špecifických a G9-BSA špecifických protilátok u imunizovaných Balb/c myší

Ružena Pilišiová¹, Ema Paulovičová¹, Dmitry V. Yashunsky², Alexander A. Karelin²,
Yury E. Tsvetkov², Nikolay E. Nifantiev²

¹*Slovenská akadémia vied, Chemický ústav, Centrum Excelentnosti Glycomed, Dúbravská
cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovensko; chemrupi@savba.sk*

²*Ruská akadémia vied, N. D. Zelinského inštitút organickej chémie, Leninskij prospekt 47,
11 9991 Moskva, Rusko*

Abstrakt

The yeast cell wall is flexible complex 3D structure consisting of an elastic network of polysaccharides (80- 90%, glucans, mannans and chitin), proteins, lipids and inorganic phosphate. The most represented polysaccharides are β - D- glucans, which are considered as immunostimulatory and as supportive immunomodulation during bacterial, fungal and protozoal infection. The level of the glucan- specific and G9-BSA conjugate specific antibodies was detected by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Candidiasis are serious problem and the research is focused on design of effective therapeutic formula. Synthetically prepared oligosaccharides mimicking cell –wall antigenic moieties are of great interest.

KLúčové slová: *Candida albicans*; prírodné β -D- glukány; ELISA

Úvod a formulácia cieľa

Bunková stena kvasiniek je flexibilná 3D sieť, ktorá reaguje na podnety z vnútorného ako aj vonkajšieho prostredia. K hlavným štruktúrnym komponentom patria polysacharidy (80 - 90%, hlavne β -D- glukány a manány a minimálne množstvo chitínu), proteíny, lipidy a anorganický fosfát [1]. Vo všeobecnosti by sa dalo povedať, že 65- 90% polysacharidov tvoria v bunkovej stene β -1,3 glukány, β -1,6-glukány, zmiešané β -1,3- a β -1,6 glukány [2, 3, 4].

Pri prepnutí kvasinkových buniek *C. albicans* na hýfy dochádza k prestavbe ich bunkovej steny: v kvasinkovej bunkovej stene je dominantná β -glukánová vrstva, kým v hýfovej manoproteínová vrstva [5]. β - D–glukány sú považované za stimulatory bunkovej imunitnej odpovede, naviazaním na svoj špecifický receptor (Dectin-1, CR3 a i.) aktivujú antigén prezentujúce bunky [6]. Potenciálne protektívne vlastnosti glukánov boli zistené už v 60-tych rokoch minulého storočia [7] a ich výskum naďalej pokračuje. Imunoterapia β -glukánmi znásobuje terapeutický účinok anti-tumorovej liečby pri niektorých druhoch rakoviny [8]. Ich imunostimulačné vlastnosti sa využívajú v rámci doplnkovej liečby pri bakteriálnych, kvasinkových a protozoálnych infekciách a to je dôvod, prečo sú

polysacharidy bunkovej steny kvasiniek využívané aj pri navrhovaní polysacharidových konjugátov [9, 10, 11].

Diagnostika kandidóz pozostáva aj zo sérologických testov, ktoré sú založené na princípe kvantifikácie anti- kandidových protilátok (stanovujú sa špecifické protilátky triedy IgA, IgG a IgM voči manánovým antigénom a β -1,3-D glukánovým sekvenciám bunkovej steny *C. albicans*) technikou sendvičovej ELISA metódy, kde prítomnosť imunokomplexu sa detekuje farebnou zmenou meraním absorbancie príslušnej vlnovej dĺžky [12].

Cieľom práce bolo stanoviť hladiny glukán-špecifických , G9-(lin)-BSA a G9-(vet)-BSA protilátok. Zistiť kinetiku, efektívnosť a potenciálny ochranný účinok vakcinácie s vybraným glukánovým konjugátom.

Materiál a metódy

Izolácia prírodného glukánu: prírodný rozpustný β -D-glukán bol extrahovaný zo zmesnej kultúry *C. albicans* CCY 29-3-32 (serotyp A) a izolovaný podľa postupu Šandula et al. [13].

Synteticky pripravený nonaglukozid- BSA konjugát (G9): (β -Glc-1-3)₉-(CH₂)₃NH-SPACER-BSA, kde glukooligomérna časť konjugátu G9 predstavuje časť z natívnej molekuly β -D-glukánu *C. albicans*, ktorá je naviazaná na proteínový nosič BSA (bovinný sérový albumín). Syntéza bola uskutočnená podľa postupu Yashunsky et al. [14].

Imunizácia laboratórnych zvierat: laboratórne Balb/c myši (samičky, 6-8 týždňové) boli imunizované testovaným konjugátom (nonaglukozid -BSA konjugát: 9 glukózových jednotiek naviazaných na proteínový nosič BSA (hovädzí sérový albumín), dávka 28,455 μ g konjugátu/100 μ l/myš). Imunizačné dávky a následné odbery (1.-2. dávky boli podávané subkutánne (s.c), 3.dávka aj intraperitoneálne (i.p), dávky boli podávané v trojtýždňových intervaloch. Krv z orbitálneho plexu bola odobratá do skúmaviek Multivette 600 (Sarstedt, Nemecko) a sérum bolo separované pri 3000 ot/min pri 4⁰C. Experimentálna infekcia *C. albicans* CCY 29-3-32 (Zbierka kvasiniek, Chemický ústav, SAV) bola prevedená aplikáciou (7,8 x 10⁷ bb/ml) do chvostovej vény 6 týždňov od 3.podania.

Detekcia anti-glukánových protilátok: prírodný glukán (5mg/ml) v karbonát-bikarbonátovom väzobnom pufri (pH 9,6) bol naviazaný (100 μ l/jamku) na 96 jamkovú mikrotitračnú platničku Immulon 4HBX (Dynex, USA) cez noc pri 4⁰C. Eliminácia nešpecifických interakcií bola zamedzená pridaním Milk Diluent (riedený v destilovanej vode v pomere 1:19, Milk Diluent, KPL, USA). Pre-imúnne séra, séra po 1.-3.podaní a post-

imúnne séra (100 μ l/jamku, riedené 1:100 v Milk Diluent) boli pridané ku antigénu a kultivované (2hod.) pri izbovej teplote. Imunokomplexy boli následne vizualizované pridaním sekundárnych kozích anti-myších IgG, IgA a IgM protilátok konjugovaných s alkalickou fosfatázou (Bethyl Laboratories, Inc., USA) a príslušného fosfátového substrátu (BluePhos® Phosphatase KPL Inc., USA). Špecifické farebné zmeny boli charakterizované na základe merania absorpcie pri vlnovej dĺžke 630 nm (MRX II, Dynex USA).

Detekcia anti- G9-BSA protilátok: na detekciu antigén špecifických protilátok bol použitý biotín- streptavidínový systém. Biotinylované G9- (lineárny)-BSA konjugát a G9- (vetvený) BSA konjugát, každý v karbonát-bikarbonátovom väzobnom pufri (pH 9.6) v koncentrácii 10 ng/jamku bol naviazaný (100 μ l/jamku) na 96 jamkovú mikrotitračnú platničku s prednaviazaným streptavidínom (Biomat SNC, Italy) cez noc pri 4°C. Ďalší postup stanovovania protilátok bol rovnaký ako bol opísaný v časti: „Detekcia anti-glukánových protilátok“.

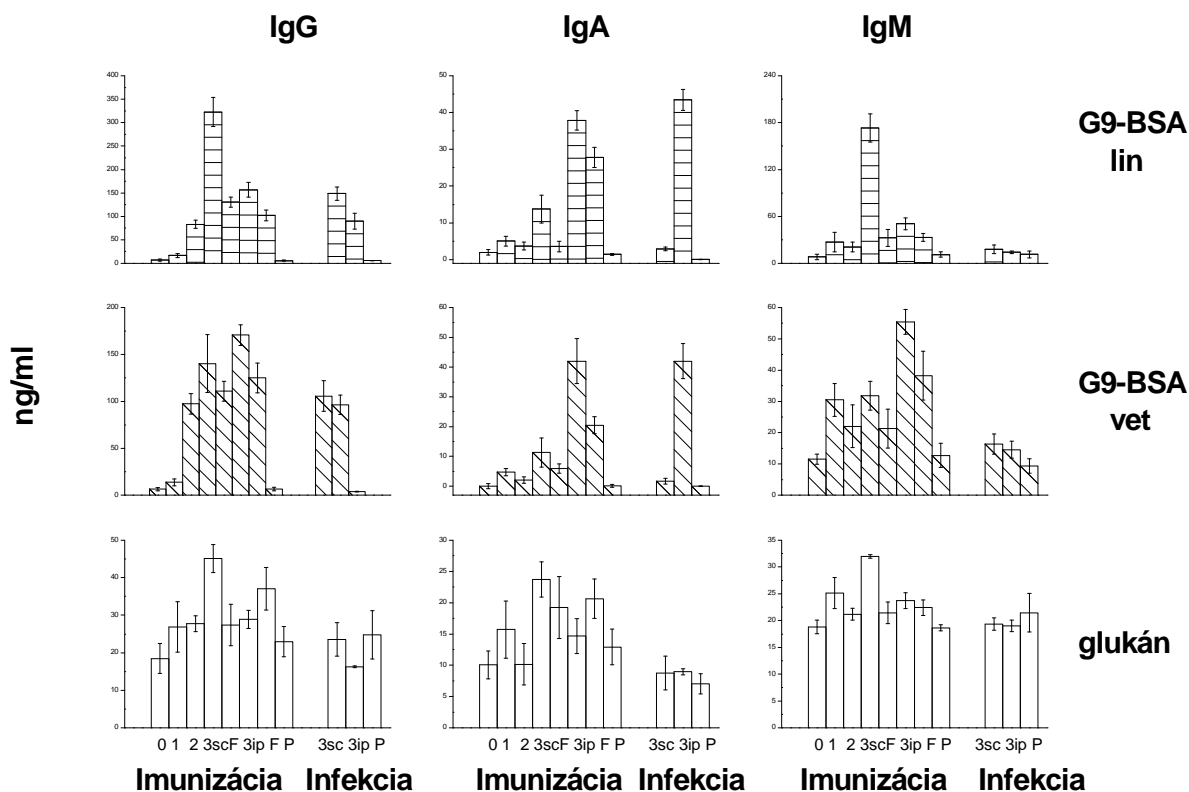
Výsledky a diskusia

Kinetika vo všetkých skupinách (Obr. 1) má v triedach IgG skôr rastúcu tendenciu voči pre-imúnnemu séru, ktoré slúži ako negatívna kontrola. V IgA a IgM bol pozorovaný pokles vo všetkých skupinách po 2.podaní.

Vyššie hodnoty G9-BSA špecifických protilátok ako anti- β -D-glukánových protilátok, sú charakteristické pre špecifické rozpoznanie epitopov v homológnom oligosacharide, kým prírodný glukán predstavuje komplexnú molekulu s možným maskovaním epitopov prítomných v syntetickej formule.

Vo všeobecnosti boli výraznejšie percentuálne nárasty protilátok po jednotlivých podaniach voči pre-imúnnemu séru v prípade anti-G9-(lin)-BSA protilátok v triede IgG (Tab. 1), pričom najvýraznejší nárast až 4439 % bol po 3. sc podaní, naopak najnižší 133% bol po 1.podaní.

Hladiny protilátok po vyvolaní experimentálnej infekcie 6 týždňov po 3.podaní vykazovali takmer vo všetkých skupinách klesajúci charakter (Tab. 2). Nárast bol pozorovaný len v triede IgA v skupine anti-G9-(lin)-BSA protilátok a to imunizovaných intraperitoneálne (14,646 % nárast oproti hladine po 3. ip podaní) a v skupine anti-G9-(vet)-BSA protilátok po intraperitoneálnom podaní 3.dávky bol zistený nárast 0,0244 % nárast oproti hladine po 3. ip podaní).



Obr. 1 Stanovenie protilátkovej odpovede počas imunizácie G9-BSA konjugátom voči vybraným antigénom (**G9-BSA lin**- G9-(líneárny)-BSA konjugát, **G9-BSA vet**- G9-(vetvený)-BSA konjugát, **glukán**- prírodný glukán CCY 29-3-32, O-pre-imúnne, 1- 1.podanie, 2- 2.podanie, 3- 3.podanie, F- 6 týždňov po 3.podaní, sc- subkutánne podanie, ip- intraperitoneálne podanie, P-placebo, fyziologický roztok).

Tab. 1 Percentuálne a násobné porovnania nárastu hladín G9-(lin)-BSA protilátok voči pre-imúnnemu séru po jednotlivých podaniach testovacou formulou G9-BSA konjugátom v IgG, IgA a IgM triedach. (1,2,3- podania testovacej látky, sc-subkutánne podanie, ip-intraperitoneálne podanie, sc, p-i.- 6týždňov po 3.sc dávke, ip, p-i.- 6týždňov po 3.sc dávke)

G9-(lin)-BSA	IgG		IgA		IgM	
	% rozdiel	imunizácia/ pre- imúnne	% rozdiel	imunizácia/ pre- imúnne	% rozdiel	imunizácia/ pre- imúnne
1	133 %	2,334934	62 %	2,598035	70 %	3,3618577
2	1070 %	11,701334	47 %	1,895244	61 %	2,5588199
3sc	4439 %	45,392317	86 %	7,066857	95 %	21,335573
3ip	2108 %	22,077916	95 %	19,460395	84 %	6,2381954
sc, p-i.	1736 %	18,362346	45 %	1,8335097	75 %	4,005363
ip, p-i.	1335 %	14,349885	93 %	14,275038	75 %	4,0704828

Tab. 2 Percentuálne a pomerné porovnania hladín protilátok po 3 dávke v porovnaní s hladinami po infekcii v jednotlivých IgG, IgA a IgM triedach.

(3- 3. podanie testovacej látky, sc-subkutánne podanie, ip-intraperitoneálne podanie, G9-(lin)-BSA- lineárna štruktúra G9-BSA konjugátu, G9-(vet)-BSA- vetvená štruktúra G9-BSA konjugátu)

IgG		IgA		IgM		
glukán	% rozdiel	infekcia/ 3.podanie	% rozdiel	infekcia/ 3.podanie	% rozdiel	infekcia/ 3.podanie
3 sc	-47,77 %	0,5223	-63,13 %	0,3695	-39,53 %	0,6047
3 ip	-43,69 %	0,5631	-38,7 %	0,6126	-19,92 %	0,8008
G9-(lin)- BSA						
3 sc	-53,95 %	0,46	-78,84%	0,2123	-89,7 %	0,1030
3 ip	-42,65 %	0,5735	14,68 %	1,1468	-71,85 %	0,2816
G9-(vet)- BSA						
3 sc	-24,63 %	0,7537	-85,3%	0,147	-48,66 %	0,5135
3 ip	-43,62 %	0,5638	0,024 %	1,0003	-73,73 %	0,2626

Záver

Experiment bol zameraný na detekciu hladín glukán- špecifických a G9-(lin)-BSA a G9-(vet)-BSA špecifických protilátok u Balb/c myši, ktoré boli imunizované G9-BSA konjugátom. Hlavným cieľom bolo zistiť, či dôjde k imunitnej odpovedi hostiteľa na testovaciu látku a keď áno, o aký typ odpovede pôjde. Zistili sme polyklonálnu stimuláciu protilátok s dôrazom na IgG a IgM izotypy. Ochranný účinok konjugátu sa potvrdil aj priamym blokovaním inokula *C. albicans* CCY 29-3-32.

Pod'akovanie

Táto publikácia mohla vzniknúť vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre Glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja, ďalej vďaka podpore Centra excelentnosti – Glycomed a Agentúry pre vedu a výskum (VEGA 2/0040/10).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Zinser E., Daum G. (1995) Yeast. 11, p. 493
- [2] Bernard D., Latgé J.P. (2001) Med. Mycol. Suppl. 139, p. 9
- [3] Klis F. M., Sosinska G. J., de Groot P. W. J., et al. (2009) Yeast Res. 9, p. 1013
- [4] Grün C. H., Hochstenbach F., Humbel B. M., et al. (2005) Glycobiology. 15, p. 245
- [5] Goodridge H. S, Wolf A. J., Underhill D. (2009) Immunol. rev. 230, p. 38
- [6] Schepetkin I. A., Quinn M. T. (2006) Int. Immunopharmacol. 6, p. 317

- [7] Bacon J. S., Farmer V. C. (1968) *Biochem. J.* 110, p. 34P
- [8] Hong F., Yan J., Baran J. T., et al. (2004) *J. Immunol.* 174, p. 797
- [9] Bromuro C., Romano M., Chiani P., et al. (2010) *Vaccine.* 28, p. 2615
- [10] Edwards J. E. (2012) *J. Med. Microbiol.* 61, p. 895
- [11] Despras G., Robert R., Sendid B., et al. (2012) *Bioorg. Med. Chem.* 20, p. 1817
- [12] Fontana C., Gaziano R., Favaro M., et al. (2012) *Open Microbiol. J.* 6, p. 70
- [13] Šandula J., Kogan G., et al. (1999) *Carbohydr. Polym.* 38, p. 247
- [14] Yashunsky D. V., Tsvetkov Y. E.; Nifantiev N. E. (2011) Russian patent pending (application 2011129357/10(043367))

Sledované hematologické parametre v procese starnutia u koní plemena Nonius

Terézia Pošiváková¹, Janka Poráčová², Katarína Kontárová³, Ladislav Pleva⁴

¹Prešovská Univerzita v Prešove, Fakulta Humanitných a Prírodných vied, Ulica 17
Novembra 1, 081 16, Prešov, Slovenská Republika tereziap@centrum.sk

²Prešovská Univerzita v Prešove, Fakulta Humanitných a Prírodných vied, Ulica 17
Novembra 1, 081 16, Prešov, Slovenská Republika

³RVPS, Hodská 353/19, 924 25 Galanta, Slovenská Republika

⁴Súkromný veterinárny lekár, 925 02 Dolné Saliby 728, Slovenská Republika

Abstrakt

For each horse the aging process is different and individual affair. Some horse already start to age around 15. year of age, while the other is in 25. year still in good condition. Longevity of the horse is given partially by genetics. Aging is inevitable, universal phenomenon, to which all living organisms are liable to. It is natural, physiological action, although it raises many serious physiological and pathological changes. So that's why it's good to know some of the characters of aging. The aim of our work was to investigate haematological parameters of the horse breed Nonius during aging. The experimental study included a total of 26 horses (4 stallions and 22 mares) from 2 years to 20 years age. The haematological profile was low correlation ($-0.3 < r < 0$ or $0 < r < 0.3$) observed in the number of basophils ($r = 0.110$), eosinophils ($r = -0.040$), monocytes ($r = -0.005$) and hematocrit ($r = 0.249$). Middle correlation ($-0.5 < r < -0.3$ or $0.3 < r < 0.5$) was observed in erythrocytes ($r = -0.310$), leukocytes ($r = -0.360$), neutrophils ($r = 0.486$) and lymphocytes ($r = -0.482$).

KLúčové slová: kôň; krv; hematokrit; starnutie; Nonius.

Úvod a formulácia cieľa

Starnutie je nevyhnutnou súčasťou vývinu každého organizmu. Ide o nevyhnutný biologický proces ovplyvňovaný predovšetkým vnútornými vplyvmi.[1]. Napriek zvyšujúcemu sa počtu starnúcich koní, je málo poznatkov v oblasti geriatrickej medicíny u koní.[2]. Sledovanie hematologických parametrov sa používa u koní ako pomôcka v klinickej diagnostike. Využívajú sa pri hodnotení metabolického stavu zvierat'a.[3]. Plemeno nonius bolo vyšľachtené v maďarskom žrebčine Mezöhegyesz v roku 1784. Cieľom bolo vyšľachtiť mohutnejšieho, ťažšieho koňa. V súčasnosti sa na Slovensku nachádza osem plemenných žrebčov a dvadsaťšesť kobýl zapísaných v plemennej knihe plemena nónius,[4]. Naším cieľom bolo sledovať vplyv veku na vybrané hematologické parametre u koní plemena nonius. Porovnanie hematologických parametrov v krvi experimentálnej skupiny koní bolo vykonávané v závislosti od veku koní.

Materiál a metódy

Do experimentu bolo zaradených 26 koní plemena nónius v rámci celého Slovenska. V skupine boli kone vo veku od 2 roku až po 20 rokov 4 žrebce a 22 kobýl na základe záznamov poskytnutých chovateľmi na farmách. Kone boli na pastvinách celoročne, v zimnom období boli ustajnené, podľa potreby dokrmované senom a jadrovým krmivom. Príjem vody bol neobmedzený. Všetky kone boli príslušným obvodným veterinárnym lekárom podrobené celkovému klinickému vyšetreniu pred odberom krvných vzoriek a vo všetkých prípadoch neboli pozorované a zaznamenané chorobné klinické príznaky.

Odbery krvi boli vykonávané obvodným veterinárnym lekárom podľa štandardných veterinárskych postupov. Krv bola odoberaná z hrdelnice - *vena jugularis* použitím vákuových skúmaviek. Všetky vzorky boli získané v ranných hodinách od 8,00-10,00 hodine (pred kŕmením). Odber krvi bol vykonaný v prirodzených podmienkach. Na odber vzoriek boli použité ihly (BD Vacutainer ® Precision Glide™, BD Diagnostics, USA) a sérové (Sérum-SST™ II Advance, BD Diagnostics, USA) a heparínové skúmavky (Heparín a PST™ II + gél, BD Diagnostics, USA). Počas odberu krvi ako aj počas transportu boli vzorky uchovávané pri teplote 8 – 10°C a čo najskôr stanovené.[5]. Z hematologických parametrov sa stanovovali erytrocyty (Ery) a na vyhodnotenie diferenciálneho leukogramu bolo použité farbenie Hemacolorom (Merck, Darmstadt, SRN) a náter bol diferencovaný v mikroskope (mikroskop Nikon SE, Japonsko). Hematokrit bol detegovaný z heparinizovanej krvi centrifugáciou v hematokritových kapilárach a odčítaním percentuálneho podielu korpuskulárnych, predovšetkým erytrocytárnych zložiek krvi. Referenčné hodnoty ukazovateľov hemogramu a leukogramu u koní plemena nónius boli získané z ukazovateľov hodnôt hemogramu a leukogramu podľa Kuševa.[6] získané vzorky boli vyšetrené laboratóriom Centra excelentnosti ekológie živočíchov a človeka na Prešovskej univerzite v Prešove. Výsledky boli štatisticky spracované pomocou štatistickej metódy Studentovo t-rozdelenie. Intenzita korelácie (štatistická významnosť) bola stanovená nasledovne: nízka ak $-0,3 < r < 0$ alebo $0 < r < 0,3$; stredná ak $-0,5 < r < -0,3$ alebo $0,3 < r < 0,5$; vysoká ak $-1,0 < r < -0,5$ alebo $0,5 < r < 1,0$.

Výsledky a diskusia

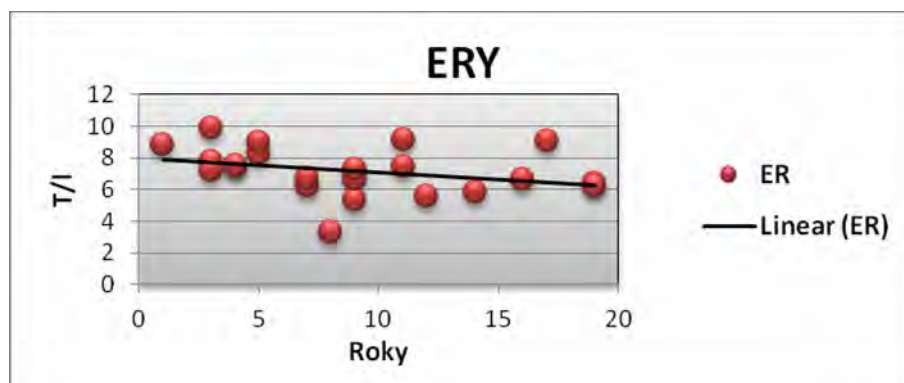
Jednotlivé hematologické parametre sa stanovili u plemena nónius na základe veku (Tab č.1). Z hematologického profilu bola nízka korelácia ($-0,3 < r < 0$ alebo $0 < r < 0,3$) zaznamenaná v počte bazofilov ($r=0,110$); eozinofilov ($r=-0,040$); monocytov ($r=-0,005$) a hematokritu ($r=0,249$). Stredná korelácia ($-0,5 < r < -0,3$ alebo $0,3 < r < 0,5$) bola

zaznamenaná v počte erytrocytov ($r=-0,310$); leukocytov ($r=-0,360$); neutrofilov ($r=0,486$) a lymfocytov ($r=-0,482$).

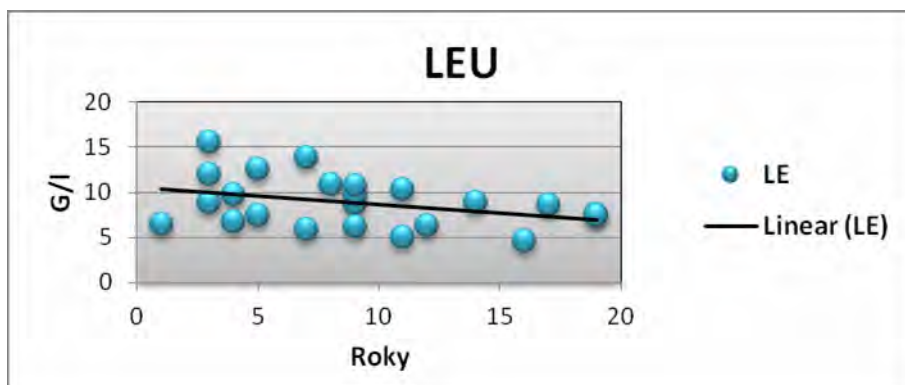
Tab. 1 Sledované hematologické parametre a ich korelácie, priemer (\bar{x}) \pm štandardná odchýlka (\pm StDev) a referenčné hodnoty

Parameter	Korelácia	$\bar{x} \pm \text{StDev}$	Referenčné hodnoty
Erytrocyty $\times 10^{12}/l$	-0,310	7,171 \pm 1,492	8-12
Leukocyty $\times 10^9/l$	-0,360	8,837 \pm 2,831	5-10
Neutrofilý %	0,486	43,483 \pm 15,771	40-78
Eozinofily %	-0,040	4,082 \pm 3,551	0-4
Bazofily %	0,110	1 \pm 1,312	0-1
Lymfocyty %	-0,482	48,695 \pm 15,928	16-50
Monocyty %	-0,005	1,479 \pm 1,729	0-10
Hematokryt %	0,249	37,650 \pm 4,445	32-53

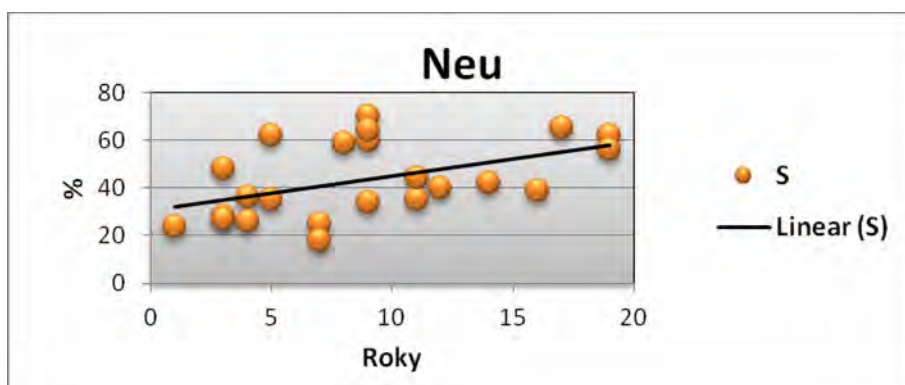
Legenda: priemer (\bar{x}), štandardná odchýlka (\pm StDev), liter (l), % - percentuálne vyjadrenie



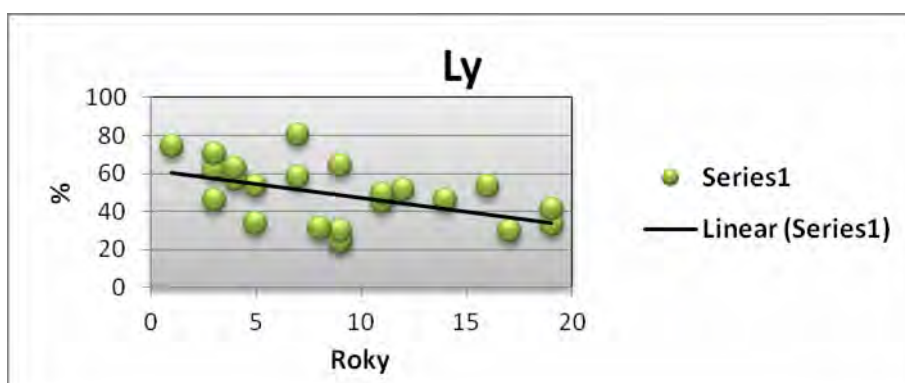
Obr. 1 Erytrocyty – Nonius (počet jedincov – 20) negatívna korelácia - signifikantná
T/l – počet erytrocytov na liter krvi – ($\times 10^{12}/l$), ERY – erytrocyty. ER - erytrocyty



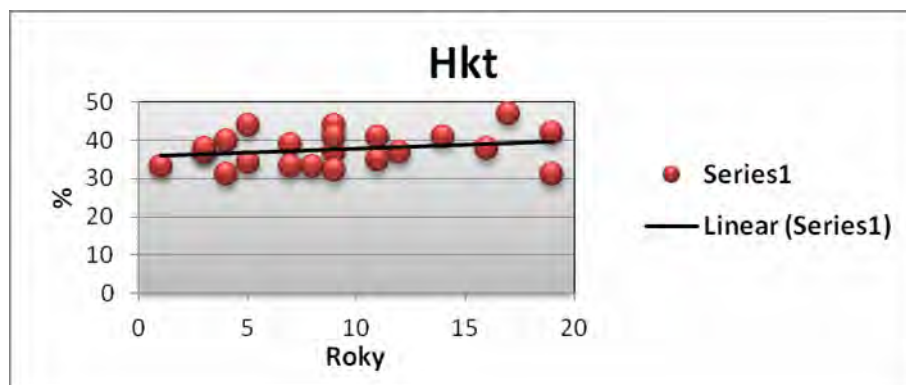
Obr. 2 Leukocyty – Nonius (počet jedincov – 22) negatívna korelácia - signifikantná
G/l – počet leucocytov vyjadrený na liter krvi - ($\times 10^9/l$), LEU – leukocyty, LE – leukocyty



Obr. 3 Neutrofilý – Nonius (počet jedincov – 22) pozitívna korelácia - signifikantná
Neu – neutrofilý, S – segmenty, % - percentuálne vyjadrenie počtu neutrofilov



Obr. 6 Lymfocyty – Nonius (počet jedincov – 22) negatívna korelácia - signifikantná
Ly – lymfocyty, % - percentuálne vyjadrenie počtu lymfocytov



Obr. 8 Hematokryt (Hkt) – Nonius (počet jedincov – 22) pozitívna korelácia- signifikantná
Hkt – hematokryt, % - percentuálne vyjadrenie počtu hematokrytu

Referenčné hodnoty hematologických parametrov pre jednotlivé kone sú pomerne úzke, ale normálne hodnoty pre plemená padajú do širokej škály.[7]. Množstvo faktorov môže ovplyvniť hematologické parametre u koní, zahŕňajúc plemeno, vek a zaobchádzanie s koňmi počas odberu krvi. V našej experimentálnej štúdií bolo pozorované stredné poklesnutie erytrocytov s pribúdajúcim vekom. Pokles erytrocytov so starnutím bol popísaný aj u Lipicanských koní.[8] a Andalúzskych koní.[9]. Počet leukocytov u noniusa stredne klesal s narastajúcim vekom koní. Podobné pozorovania sa zaznamenali aj u Lipicanských koní.[8], Andalúzskych koní.[9] a u poníkov.[10]. Počet neutrofilov stúpala čo je v súlade aj u pozorovaní u Andalúzskych koní.[9], pričom u poníkov počet neutrofilov klesal.[10]. Napríklad u Lipicanských koní zostal tento počet takmer nezmenený u všetkých vekových kategórií.[8]. V počte bazofilov sa nenašiel u noniusa významný rozdiel v závislosti od veku, podobne to bolo aj u Andalúzskych koní.[9]. Stredne významný pokles v počte lymfocytov bol zaznamenaný v našej štúdií čo je v zhode so štúdiami u poníkov.[10], u lipicanských koní.[8] a u Andalúzskych koní .[9]. Žiadny rozdiel nebol zaznamenaný v počte monocytov u noniusa. Podobné pozorovania boli získané aj u Andalúzskych koní.[9]. U poníkov .[10] a Lipicanských koní.[8] klesal počet monocytov s vekom koňa. V našej štúdií sme zaznamenali stúpajúci hematokrit s vekom koní.

Záver

Priebeh starnutia živých organizmov je charakterizovaný početnými fyziologickými a patologickými zmenami orgánov a tkanív. Rozdielne referenčné hodnoty sú potrebné pre analýzu na základe určitého veku alebo plemena zvierat, ktoré sa menia s vekom zvierat. Údaje získané z tejto štúdií môže posilniť naše pochopenie hematologických parametrov u tohto plemena. Hematologické parametre u plemena koní nonius v tejto práci zachytávajú

niektoré rozdiely v porovnaní s inými plemenami koní. Stanovenie hematologických hodnôt je špecifické pre plemeno koňa nónius, ktorý je výsledkom konkrétneho chovu a selekcie daného plemena.

Pod'akovanie

Táto štúdia bola podporená grantom ITMS 26220120041.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Chaloupka, V., Elbl, L. (2003) Zátěžové metody v kardiologii. Grada Publishing, Brno, p. 293
- [2] McFarlane D., Sellon D. C. (1998) American Journal of Veterinary Research, p. 59
- [3] Lassen, E. D. - Swardson, C. J. (1995) Vet. Clin. North Am. Equine. Pract., p. 11
- [4] Nonius [Citované: 6. marec 2013] <<http://www.clubhorse.weblahko.sk/Nonius.html>>
- [5] Doubek, J., a Bouda, J. (2003) Veterinární hematologie, Noviko a.s., Brno, p. 53
- [6] Kušev, J. (2006) Vnútorné choroby koní, Vienala, Košice, p. 375
- [7] Schalm, O. W. (1975) N. C. Veterinary Hematology. Lea & Febiger, Philadelphia, USA, p. 12
- [8] Čebulj-Kadunc, N., Kosec (2003) J. Vet. Med., p. 50
- [9] Satue, K., Blanco, O. (2009) Veterinarni Medicina., p . 54
- [10] Horohov D., Kydd J. (2002) Developmental and Comparative Immunology, p. 26

Niektoré zaujímavé terestrické riasy zátoky Petuniabukta na Svalbarde, Arktída

Lenka Raabová, Ľubomír Kováčik

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra botaniky, Révová 39, SK-811 02 Bratislava, Slovenská republika; lenka.raabova@gmail.com

Abstrakt

This study is a partial part of wider phycological research of cyanobacteria and algae in Svalbard (Arctic) which was done during the summer season 2011. Introduce the four interesting taxa *Tetracystis pulchra*, *Pseudodictyochloris multinucleata* (supergroup Archeplastida) and *Xanthonema debile*, *Heterococcus papillosus* (supergroup SAR) which were observed in this polar region the first time.

Kľúčové slová: polárna fykoflóra; Svalbard; Arktída.

Úvod a formulácia cieľa

Súostrovie Svalbard (74° - 81° s.š, 10° - 35° v.d) tvorí skupina ostrovov v Severnom ľadovom oceáne nachádzajúcich sa za polárnym kruhom. Najväčší ostrov Špicbergy (39 000 km²) zaberá takmer polovicu celkovej rozlohy súostrovia. Vďaka Golfskému prúdu sú klimatické podmienky na Svalbarde relatívne priaznivé, aj keď je jeho povrch takmer z 60% zaľadnený. Priemerné ročné teploty sa pohybujú v od -30 °C v zime až do + 10 °C v lete. Priaznivá klíma napomáha k hojnému výskytu rias v tejto oblasti, kde zastávajú dôležitú úlohu v prirodzenom kolobehu látok a energie v severopolárnom ekosystéme. Patria medzi prvých kolonizátorov novoodľadnených území. Druhovú diverzitu rias je tu pomerne vysoká, a doposiaľ je zo Svalbardu opísaných viac ako 250 druhov rias, ktoré osídľujú rozličné biotopy polárnej krajiny [1,2,3,4,5,6,7,8].

Cieľom tejto práce je predstaviť štyroch zástupcov terestrickej mikroskopickéj fykoflóry, ktoré sú nové pre toto územie.

Materiál a metódy

Zber materiálu sa uskutočnil v lete roku 2011 v rámci terénnych cvičení Kurzu polárnej ekológie organizovaným Prírodovedeckou fakultou JU v Českých Budějoviciach v zátoky Petuniabukta na ostrove Špicbergy. Išlo o lokalitu Brucebien, ktorá sa nachádza v blízkosti morského pobrežia a je pomerne často navštevovaná turistami. Vlastný zber vzoriek sa týkal časti veľrybej čeluste, z ktorej sme vykonali zoškrab ohňom vysterilizovanou čepeľou skalpelu z viditeľného zeleného nárastu do sterilnej vzorkovnice. Vzorky boli

v suchom stave privezené na Slovensko. V Laboratóriu experimentálnej fykológie na Katedre botaniky PRIFUK v Bratislave pomocou tradičných mikrobiologických postupov boli vyizolované kmeňové kultúry, ktoré rástli v sklenených skúmavkách na 2% agarom spevnenom výživnom médiu Z podľa Zehndera. [9] uzavreté vatovou zátkou v žiarivkami osvetlenom klimatizovanom kultivačnom boxe. Rôzne starý nárast jednotlivých kmeňov sme podrobne študovali v optickom mikroskope Leica CME a zhotovili líniové kresby pre názornú dokumentáciu cytomorfológie a fenotypových znakov, ktoré sú dôležité pre druhovú determináciu. Paralelne s tým v optickom mikroskope Leica DM 2500 s Nomarským kontrastom a kamerou Leica DFC 290 HD pomocou softvéru LAS 3.5.0 - Build: 710 sme vyhotovili aj mikrofotografie. Na druhovú determináciu bol hlavne použitý Sylabus [10].

Výsledky a diskusia

Z celkového počtu vyše 50 vyizolovaných unialgálnych riasových kmeňov, nasledovné štyri druhy neboli doposiaľ opísané pre územie Svalbardu. Ide o tieto taxóny:

Tetracystis pulchra Brown et Bold

Obr. 1. a, b, 2. a

Kolónie vyrastené na agare tvoria kompaktné tmavozelené kopčeky. Samotné bunky sú guľovité až nepravidelne oválne a majú okolo seba viditeľný sliz. Bunky sú zriedkavo jednotlivé, častejšie sú v balíkovitých kolóniach. V bunke sa nachádza jeden nástenný chloroplast s veľkým výrazným pyrenoidom. Bunková stena je tenká a u starších buniek hrubne. Rozmnožovanie prebieha tvorbou aplanospór, ktoré sa uvoľňujú prasknutím steny sporangia alebo rozpadom kolónie buniek. Vegetatívne bunky (9) 10 – 12 (15) μm a balíčky (15) 16 – 18(20) μm v priemere. Staršie bunky sú tehlovočervené.

Pseudodictyochloris multinucleata (Broady) Ettl et Gärtner

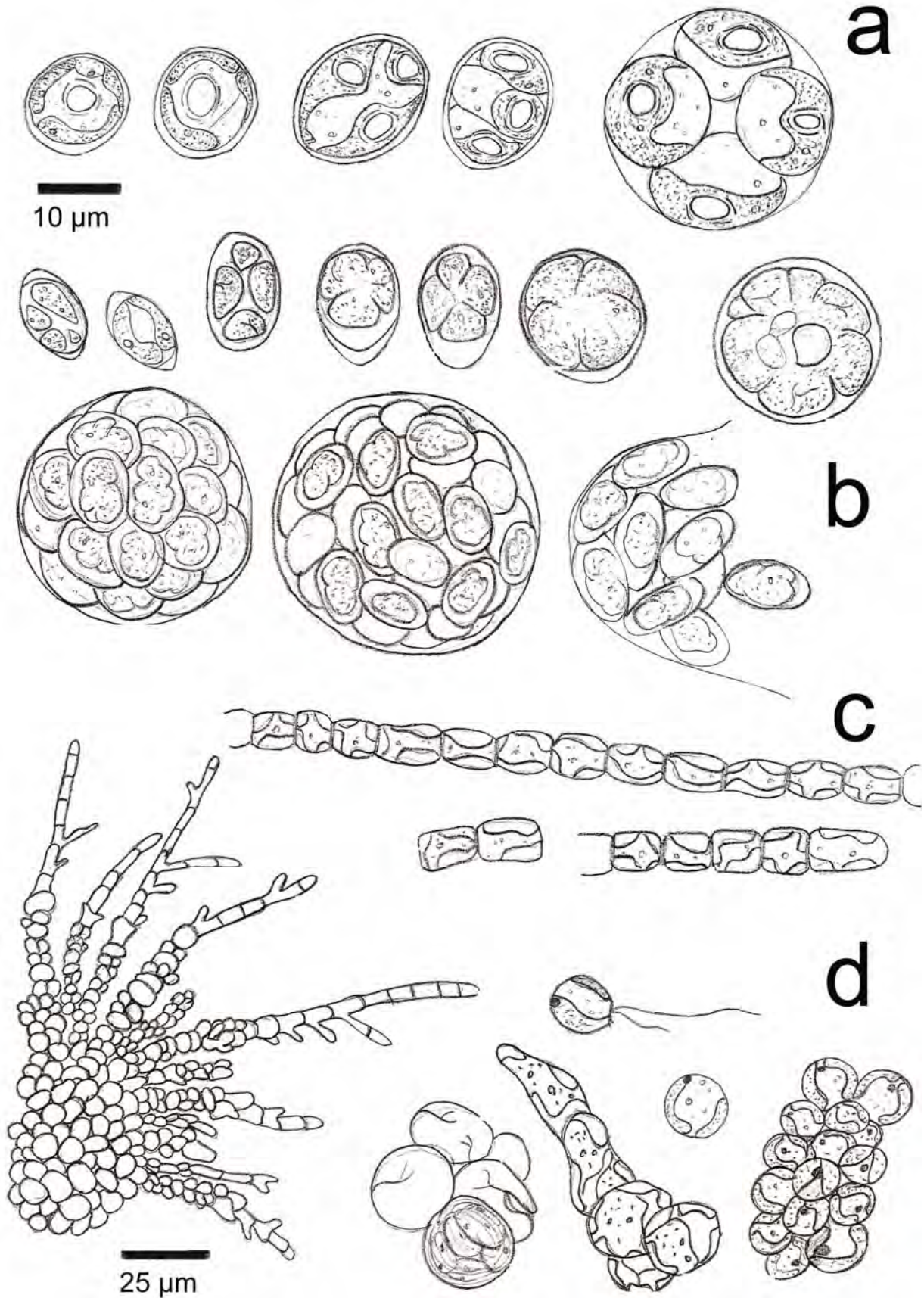
Obr. 1. c, d, 2. b

Kolónie vyrastené na agare jasnozelené až tmavozelenej farby. Tvoria výrazné kopčeky s drobnými bradavičkami. Bunky sú jednotlivé. Majú hrubú bunkovú stenu, guľovitý alebo citrónikovitý tvar. Chloroplast vyplňa väčšinu bunky a je bez pyrenoidu. V bunke sa nachádza viacero jadier. Bunky sú trávovozelenej farby. Rozmnožovanie prebieha tvorbou aplanospór alebo zoospór. Uvoľňovanie prebieha prasknutím bunkovej steny. Aplanospór je vysoký a párny počet. Vegetatívne bunky (9) 11 – 14 (15) μm v priemere. Sporangia (18) 28 – 60 (64) μm v priemere. Zoospóry sú podlhovasté s dvomi rovnakodlhými bičikmi a výraznou stigmou.

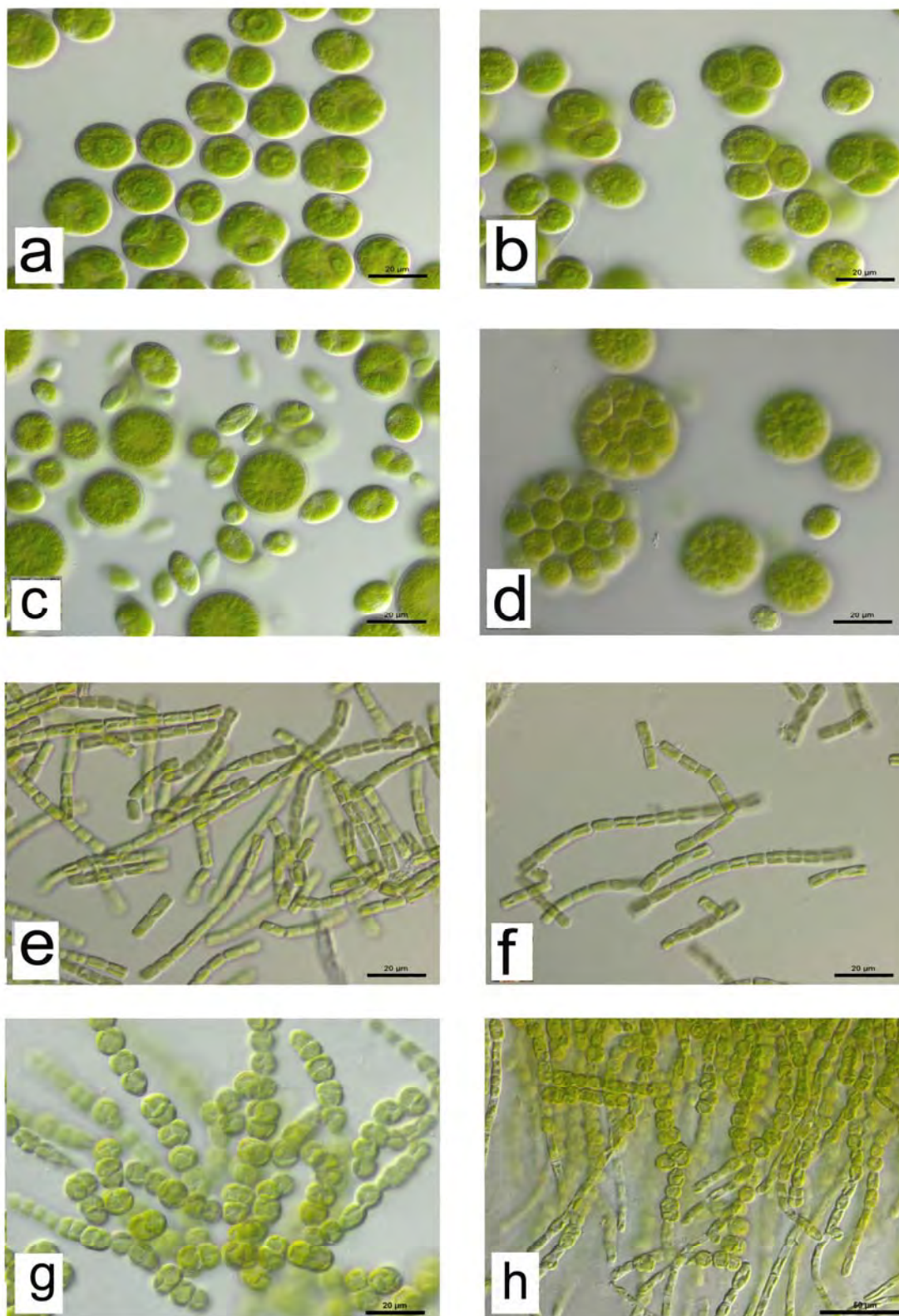
Xanthonema debile (Vischer) Silva

Obr.1. e, f, 2. c

Nárast na agare tvorí rozliezavé kolónie tmavozelenej farby, ktoré budia dojem vlákien.



Obr. 1 a – *Tetracystis pulchra*, b – *Pseudodictyochloris multinucleata*, c – *Xanthonema debile*, d – *Heterococcus papillosus*. Úsečka 10 µm patrí ku všetkým obrázkom, okrem ľavého dolného, kde to je 25 µm



Obr. 2 a, b – *Tetracystis pulchra*, c, d – *Pseudodyctiochloris multinucleata*, e, f – *Xanthonema debile*, g, h – *Heterococcus papillosus*. Úsečky a – g reprezentujú 20 µm, pri h je to 50 µm

Vlákná sú ľahko rozpadajúce, nerozkonárené a s konstrikciami. Bunky sú podlhovasté až súdočkovité, nachádza sa v nich viacero chloroplastov (>2). Chloroplasty sú bez pyrenoidu. Farba vlákien je jasnozelená. Šírka buniek je 4 - 5 μm a dĺžka je (5) 6 - 10 (11) μm . Rozmnožovanie prebieha pomocou zoospór s dvomi rovnocennými bičíkmi a výraznou stigmou.

Heterococcus papillosus Pitschmann

Obr. 1 g, h, 2d

Nárast na agare tvorí kopčekovité kolónie, ktoré majú na okraji jemné vlákna pripomínajúce „korieňky“. Mladé kolónie sú jasnozelenej farby, v starej kultúre tvorí tmavozelené balíčky, niekedy so stromovitými útvarmi s výbežkami v tvare prstov. Jednotlivé bunky majú viacero nástenných chloroplastov bez pyrenoidu. Kolónie buniek sa delia v 3 rovinách, pričom rast kolónie závisí od priestoru a podmienok. Rozmnožovanie prebieha pomocou pohyblivých zoospór a sú uložené v sporangiách po 2, 4, 8 etc. Uvoľňujú sa v tme. Majú širokú tvarovú variabilitu, pred odhodením bičika prevažne guľovitý tvar, dva nerovnaké bičíky a 1-2 nástenné chloroplasty bez pyrenoidu, v bunke sa nachádza stigma. Po uvoľnení prisadnú, odhodí bičik a začnú sa v troch rovinách deliť a tvoriť kolónie v tvare balíkov. Za dobrých podmienok a dostatku živín tvoria mohutné kolónie s prstovitými výbežkami. Vegetatívne bunky 12 - 15 μm , zoospóry 5 - 6 μm v priemere.

Záver

Uvedené štyri taxóny prináležia k dvom odlišným riasovým skupinám: *Tetracystis pulchra* a *Pseudodyctiochloris multinucleata* sú z oddelenia Chlorophyta, vývojovej vetvy Chlorophytae, superskupina Archeplastida a *Xanthonema debile* a *Heterococcus papillosus* sú z triedy Tribophyceae, superskupina SAR.

Pod'akovanie

Práca vznikla na základe finančnej podpory z projektov UK/181/2013 a VEGA 1/0868/11. Autori ďakujú spoluúčastníkom Kurzu polárnej ekológie organizovaným Prírodovedeckou fakultou JU v Českých Budějoviciach na Svalbarde v júli 2011 za pomoc pri terénnom výskume.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Matula J.(1982) Acta Univ. Wratislav. 525, p. 173
- [2] Skulberg O.M (1996) Terrestrial and limnic algae and cyanobacteria. In: Elvebakk A.,

- Prestrud P. (eds.) A catalogue of Svalbard plants, fungus, algae and cyanobacteria.
Norsk Polarinstitutt, Oslo, p. 2
- [3] Elster J., Stibal M., Kaštovská K. (2003) *Živa* 2003/6, p. 262
- [4] Kaštovská K., Elster J., Stibal M., et al. (2005) *Microb. Ecol.* 50, p. 396
- [5] Matula J., Pietryka M., Richter D., et al. (2007) *Polish Polar Res.* 28, p.283
- [6] Richter D., Matula J., Pietryka M. (2009) *Int. J. Ocenogr. Hydrobiol.* 38, p. 65
- [7] Kim G.H., Klochkova T.A, Han J.W., et al. (2011), *Arctic* 64, p. 25
- [8] Ronning O. (1996) *Flora of Svalbard: English Edition Series.* Norsk Polarinstitutt, Oslo, p. 2
- [9] Staub R. (1961) *Schweiz. Z. Hydrol.* 23, p.82
- [10] Ettl H., Gärtner G. (1995) *Sylabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, p. 1

Izolácia bakteriálneho spoločenstva z pôdy znečistenej ťažkými kovmi pomocou difúznej komory

Matej Remenár, Edita Karellová, Jana Harichová, Peter Ferianc, Marcel Zámocký
*Slovenská akadémia vied, Ústav molekulárnej biológie. Oddelenie ekológie mikroorganizmov,
 Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovenská republika, matej.remenar@savba.sk*

Abstrakt

To determine the structure of bacteria growing on Petri dishes after passaging through the diffusion chamber was performed by phylogenetic analysis using partial sequences of the 16S rRNA (16S rDNA) genes. The bacteria were isolated from the soil contaminated by high concentrations of nickel (2109 mg / kg), cobalt (355 mg / kg) and zinc (177 mg / kg), lower concentrations of iron (35.75 mg / kg) and copper (32.2 mg / kg) and also a trace amount of cadmium (<0.25 mg / kg). A total of 128 isolates represented 65 species belonged to 5 major taxonomic groups, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Alpha-*, *Beta-* and *Gamma-Proteobacteria*. Furthermore, 34% of the isolates were uncultured and 45% of isolated bacteria were considered to belong to new species or genera.

KLúčové slová: Difúzna komora; kultivovateľné baktérie; fylogenetická analýza; ťažké kovy.

Úvod a formulácia cieľa

Analýza vzoriek z rôznych prostredí ukázala, že len 0,01 – 1% z pôdných bakteriálnych buniek viditeľných pod mikroskopom sú schopné tvoriť kolónie na Petriho miskách, z čoho vyplýva, že väčšina buniek zostáva „nekultivovateľných“. Tento paradox, známy tiež ako „najväčšia anomália počtu kultivovateľných buniek“, je najväčším nevyriešeným problémom v mikrobiológii. Pôdne bakteriálne spoločenstvo sa skladá z rôznych taxónov, medzi ktoré patria aeróbne baktérie, druhy tvoriace spóry a z gram-pozitívnych baktérií hlavne zástupcov rodov *Bacillus* a *Actinobacteria* [1].

Doterajšie štúdie ukázali, že toxické kovy dlhodobo zotrávajú v prostredí a sú schopné meniť diverzitu pôdných ekosystémov, ich štruktúru a funkciu. Z prostredia znečisteného rôznymi toxickými kovmi bolo zatiaľ izolovaných len niekoľko baktérií, u ktorých boli detailne študované metabolické dráhy pre detoxikáciu polutantov. Najbežnejšie sa v kontaminovaných lokalitách vyskytujú olovo (Pb), chróm (Cr), arzén (As), zinok (Zn), kadmium (Cd), meď (Cu), ortuť (Hg), a nikel (Ni). Pôdy s vysokým obsahom ťažkých kovov predstavujú prírodné prostredie pre spoločenstvá s vysokou úrovňou tolerancie voči prevládajúcim kovom [2, 3].

Vzhľadom na skutočnosť, že väčšina žijúcich baktérií nie je doteraz preskúmaná, cieľom práce bolo izolovať a identifikovať ťažko kultivovateľné a doteraz nekultivovateľné bakteriálne izoláty z pôdy kontaminovanej ťažkými kovmi použitím difúznej komory.

Materiál a metódy

Odberové miesto

Vzorka pôdy bola odobraná 10 cm od povrchu do sterilných sáčkov z poľa asi 1 m od skládky odpadu ťažkých kovov neďaleko Sereď (48°16'59"S, 17°43'35"V). Vzorky pôdy boli skladované v chladničke pri 4 °C a spracované do 24 hod. Vzorka pôdy obsahovala vysoké koncentrácie niklu (2109 mg/kg), kobaltu (355 mg/kg) a zinku (177 mg/kg), nižšie koncentrácie železa (35,75 mg/kg) a medi (32,2 mg/kg) a stopové množstvo kadmia (~0,25 mg/kg). Obsah ťažkých kovov v pôdnej vzorke bol meraný atómovou absorpčnou spektrometriou (Perkin-Elmer, USA).

Príprava difúznej komory

Difúzna komora bola zložená z oceleového kruhu a semipermeabilných membrán o veľkosti pórov 0,03 μm a 0,2 μm. Agarové médium s pôdnym extraktom inokulované bakteriálnou suspenziou bolo pridané do oceleového kruhu a z obidvoch strán bolo prikryté membránami zabráňujúcimi kontaminácii média. Živiny sa dostávali do média z prostredia cez spodnú membránu, ktorá oddeľovala médium od substrátu. Takto pripravená komora bola umiestnená do akvária, kde prebiehala kultivácia bakteriálnych izolátov počas jedného mesiaca pri laboratórnych podmienkach [4]. Vyrastené kolónie boli z povrchu zotreté, homogenizované vo fyziologickom roztoku, nariadené na 10⁻⁴ a alikvotná časť bola inokulovaná na povrch 0,1 % (v/v) LB v agarovom médiu s pôdnym extraktom.

Agarové médium s pôdnym extraktom obsahovalo 500 ml/l pôdneho extraktu a 15 g/l agaru. pH media bolo upravené na 7,2 [5]. Pôdny extrakt bol pripravený zmiešaním 500 g pôdy a 1 l 50 mM NaOH. Zmes bola inkubovaná 24 hod pri 30 °C za trepania. Následne bola zmes prefiltrovaná cez filtračný papier a 3x po sebe sterilizovaná v pare.

Bakteriálna suspenzia, ktorá bola pripravená zmiešaním 10 g pôdy so 100 ml fyziologického roztoku a inkubovaná trepaním 2 hod pri 30 °C a následne nariadená (10⁻⁴) bola inokulovaná na povrch agarového média s pôdnym extraktom.

Izolácia DNA, amplifikácia 16S r RNA (16S rDNA) z bakteriálnych izolátov a ARDRA

DNA z bakteriálnych izolátov vyrastených v difúznej komore bola extrahovaná vo forme lyzátov slúžiacich ako templát pre polymerázovú reťazovú reakciu (PCR). PCR bola prevedená s použitím univerzálnych eubakteriálnych primerov, 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') a 685R (5'-TCT ACG CAT TTC ACC GCT AC-3'). Táto sada primerov je špecifická pre gén 16S rRNA (16S rDNA) s amplifikovaným fragmentom o dĺžke 696 pb. Každá PCR obsahovala 2,5 U Tag polymerázy, 1x roztok PCR, 10 pmol z každého primeru,

1,5 mM MgCl₂, 400 nM z každého nukleotidu (dNTPs) a 10 ng templátovej DNA. Objem každej PCR bol doplnený sterilnou deionizovanou vodou do 50 µl. Reakcia prebiehala v termocykléry (LabCyclerm Goettinge, Germany) za použitia programu: denaturácia 5 min pri 95 °C, 40 cyklov – 1 min pri 53,5 °C, 1,5 min pri 72 °C, 1 min pri 94 °C a posledný cyklus dosyntetizovania nekompletných PCR produktov 5 min pri 72 °C. PCR produkt bol analyzovaný pomocou elektroforézy v 1% (w/v) agarózovom gély. Prečistené amplikóny boli nakoniec štiepené dvomi restiktázami, *AluI* a *BstII* a následne analyzované elektroforézou na 1% (w/v) agarózovom gély.

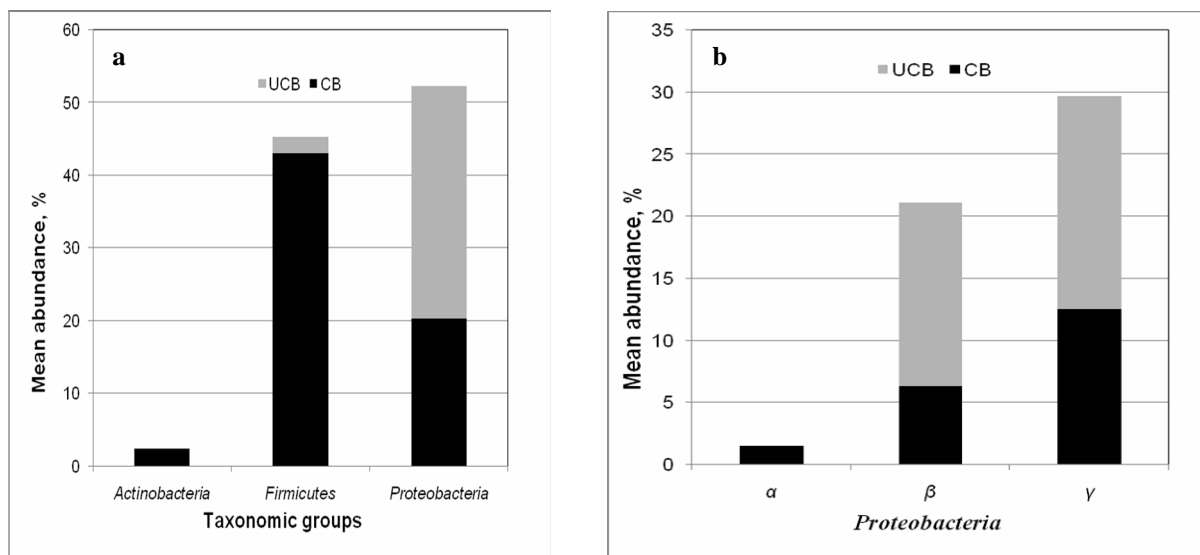
Identifikácia bakteriálnych izolátov

Špecifické sekvencie 16S rRNA (16S rDNA) izolátov boli analyzované pomocou programu Chromas Lite (verzia 2.01). Pomocou programu BLAST (a Basic Local Alignment Search Tool) boli sekvencie izolátov priradené k ich najbližším príbuzným na základe prehľadávania genómovej databázy NCBI (National Center for Biotechnology Information) [6].

Výsledky a diskusia

V tejto práci sme sa zamerali na kultiváciu baktérií z poľnohospodárskej pôdy kontaminovanej ťažkými kovmi pomocou difúznej komory. Kontaminovaná pôda ťažkými kovmi bola použitá na inokuláciu difúznej komory a baktérie vyrastené v difúznej komore boli použité na inokuláciu Petriho misiek s cieľom izolovať baktérie. Následne sme uskutočnili fylogenetickú analýzu čiastočných sekvencií génov 16S rRNA (16 S rDNA) cieľom určiť štruktúru bakteriálneho spoločenstva získaného z difúznej komory. Okrem toho sme porovnávali druhové zastúpenie izolátov rastúcich na Petriho miskách po ich predchádzajúcom pasážovaní prostredníctvom difúznej komory s izolátmi rastúcimi na bohatom médiu (Živný agar 2) [8] bez predchádzajúcej inkubácie v difúznej komore. Toto porovnanie nám umožnilo vyhodnotiť vhodnosť použitia difúznej komory na kultiváciu doteraz nekultivovateľných a ťažko kultivovateľných baktérií.

Z difúznej komory bolo celkovo získaných 128 izolátov baktérií reprezentujúcich 65 druhov patriacich do 5 hlavných fylogenetických skupín (**Obr. 1a, Obr. 1b**). Väčšina baktérií bola klasifikovaná ako *Proteobacteria* alebo *Firmicutes*; z celkového počtu 65 identifikovaných



Obr. 1a, b Rozdelenie priemernej relatívnej abundancie hlavných taxonomických skupín (a) a *Proteobacteria* (b) v rámci izolátov ($n = 128$) získaných z pôdy znečistenej ťažkými kovmi prostredníctvom difúznej komory. CB indikuje kultivovateľné baktérie, UCB indikuje doteraz nekultivovateľné baktérie.

bakteriálnych druhov, taxonomická skupina *Proteobacteria* zahŕňala 41 druhov a 61 izolátov a taxonomická skupina *Firmicutes* zahŕňala 23 druhov a 58 izolátov. Zvyšný 1 druh bol zatriedený do taxonomickej skupiny *Actinobacteria* zastúpenej 3 izolátmi. Zástupcovia taxonomickej skupiny *Proteobacteria* boli zatriedení do troch podskupín, α -, β - and γ -*Proteobacteria*, ktoré boli zastúpené 2, 27 a 38 izolátmi patriacimi k 2, 16 a 23 bakteriálnym druhom. Najpočetnejšou podskupinou bola γ -*Proteobacteria* nasledovaná podskupinou β -*Proteobacteria* a α -*Proteobacteria* (Obr. 1b).

Z celkového počtu izolovaných baktérií bolo 34 % izolátov nájdených ako doteraz nekultivovateľné baktérie. Väčšina nových bakteriálnych izolátov (50%) patrila do podskupiny γ -*Proteobacteria*, nasledovaná podskupinou β -*Proteobacteria* (43 %) a *Firmicutes* (7 %). Na druhej strane, ani jeden z identifikovaných zástupcov *Actinobacteria* a α -*Proteobacteria* nebol zatriedený k doteraz nekultivovateľným baktériám.

Podobné výsledky uvádzajú po mesačnej kultivácii v difúznej komore aj Bollmann a kol. (2007) [9]. Títo autori tiež zistili, že s narastajúcim počtom pasážovaní dochádza k nárastu diverzity v porovnaní so štandardnými kultivačnými metódami.

Zaujímavý obraz prinieslo porovnanie rôznych kultivačných prístupov z rovnakej vzorky pôdy. Zatiaľ čo 69 % izolátov bolo získaných exkluzívne prostredníctvom difúznej komory, tak 30 % izolátov bolo získaných po kultivácii na bohatom médiu (Živný agar 2) [8] bez predchádzajúcej inkubácie v difúznej komore a len 1 % izolátov bolo získaných prostredníctvom obidvoch prístupov. Tieto výsledky naznačili, že väčšina izolovaných

baktérií bola jedinečná pre jednotlivé prístupy a že inkubácia *in situ* spôsobila nárast celkových počtov izolovaných baktérií. Rovnako distribúcia abundancie izolátov sa líšila medzi týmito dvomi kultivačnými technikami. Zatiaľ čo β -*Proteobacteria* sa vyskytovali vo vyšších počtoch v difúznej komore, tak α -*Proteobacteria* po kultivácii na bohatom médiu [8]. Toto zistenie nie je prekvapivé vzhľadom na skutočnosť, že β -*Proteobacteria* patria k pomalšie rastúcim druhom schopným žiť v prostredí chudobnom na živiny [10].

Orem toho, pomerne vysoký počet izolovaných baktérií v difúznej komore (45 %) bolo zatriedených k novým druhom alebo rodom (jednak s nízkou podobnosťou k ich najpríbuznejším druhom (menej ako 97 %) a jednak so sekvenčnou podobnosťou vyššou alebo rovnajúcou sa 97 %, ale zatriedených k neznámym kultivovateľným baktériám alebo klonom). Väčšina (59 %) z týchto „nových“ druhov alebo rodov bola nájdená ako doteraz nekultivovateľné baktérie. Za nové druhy alebo rody boli považované všetky tri doteraz nekultivovateľné izoláty zatriedené k *Firmicutes*, 18 z 19 doteraz nekultivovateľných zástupcov β -*Proteobacteria* a 13 z 22 doteraz nekultivovateľných zástupcov γ -*Proteobacteria*. Všetky tieto „nové“ druhy boli jedinečné pre kultivačný prístup s použitím difúznej komory. Ani jeden „nový“ druh nebol zistený po kultivácii na bohatom médiu (Živný agar 2) [8].

Záver

Použitá kultivačná stratégia ponúka nový prístup pre získanie väčšieho počtu údajov o diverzite environmentálnych organizmov. Kultivácia environmentálnych baktérií v podmienkach *in situ* prostredníctvom difúznej komory buď umožňuje rast väčšiemu počtu druhov, ktoré je možné následne izolovať na Petriho miskách alebo im umožňuje adaptovať sa na rast pre nich v nepriaznivých podmienkach *in vitro*. Kultiváciou *in situ* prostredníctvom difúznej komory je možné eventuálne izolovať kultiváciou *in vitro* ťažko kultivovateľné a doteraz nekultivovateľné bakteriálne druhy, ktoré nie sú schopné rásť na bežných kultivačných médiách. Získané výsledky poskytujú nové informácie o doteraz nekultivovateľnej zložke bakteriálneho spoločenstva v pôde znečistenej niklom, kobaltom, zinkom, železom, meďou a kadmium, čo predstavuje základ pre štúdium, pochopenie a v konečnom dôsledku aj využitie ich nových vlastností.

Pod'akovanie

Článok vznikol realizáciou projektu ITMS 26240220010 „Nové mikrobiálne izoláty obsahujúce gény katabolických a detoxikačných dráh a ich využitie v biotechnológii“, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] He Z., Piceno Y., Xu M., et al. (2012) ISME J. 6(2), p. 259
- [2] Adriano D. C. (2001) Trace elements in terrestrial environments; Biochemistry, bioavailability and risks of metals. Springer-Verlag, SRN, p. 867
- [3] Alloway, B. J. (1995) Soil processes and the behaviour of heavy metals. In: Alloway, B. (eds.) Heavy metals in soils. Chapman & Hall, New York, USA, p. 11
- [4] Lewis K., Espstein S., D'onofrio A., et al. (2010) J. Antibiotics 63, p. 468
- [5] Hamaki T., Suzuki M., Fudou R., et al. (2005). J. Biosci. Bioeng. 99, p. 485
- [6] Basic Local Alignment Search Tool [Citované: 11. február 2013]
<<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>
- [7] Databáza EMBL Európskeho Bioinformačného Inštitútu (EBI) [Citované: 11. február 2013] <<http://www.ebi.ac.uk>>
- [8] Karelová E., Harichová J., Stojnev T., et al. (2011) Biologia (Bratislava) 66(1), p. 18
- [9] Bollmann A., Lewis K., Epstein S. S. (2007) Environ. Microbiol. 73, p. 6386
- [10] Ferrari B. C., Binnerup S. J., Gillings M. (2005) Appl. Environ. Microbiol. 71, p. 8714

Nepôvodné druhy v synantropnej vegetácii Bratislavy

Alena Rendeková

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra botaniky,
Révová 39, 811 02 Bratislava 1, Slovenská republika; alenarendekova@gmail.com*

Abstrakt

This work brings results of the survey on synantrophic vegetation in the region of Bratislava. Its main purpose is to find out whether the representation of non-native taxa in vegetation of Bratislava has been changed in comparison with the period from before 30 years ago. The assessment of phytosociological material from 2011 – 2012 and phytosociological data from 1980 – 1982 demonstrated that many plant communities created by neophytic invasive plants for example *Aster novi-belgii* agg., *Echinocystis lobata*, *Fallopia japonica* agg., *Ambrosia artemisiifolia*, *Stenactis annua*, *Conyza canadensis* have emerged. By study species composition of vegetation of model association *Sambucetum ebuli* Felföldy 1942 (class *Galio-Urticetea* Passarge ex Kopecký 1969) it has been discovered that compared to the past, the representation of non-native species – neophytes has increased. Representation of archaeophytes of vegetation of *Sambucetum ebuli* has declined.

Kľúčové slová: *Synantropná vegetácia; nepôvodný druh; archeofyt; neofyt; invázny druh.*

Úvod a formulácia cieľa

Činnosť človeka je jedným z významných faktorov, ktorý v súčasnosti vplýva na ekosystémy, ako aj na jednotlivé spoločenstvá organizmov. Človek pretvára prirodzené prostredie a vytvára v ňom podmienky, v ktorých sa uplatňujú rastlinné spoločenstvá označované ako synantropné [1]. Predkladaná práca sa snaží prispieť k poznatkom o tomto type vegetácie.

Výskum sa realizoval na území mesta Bratislava. Mesto je pre účely štúdia synantropnej vegetácie veľmi vhodné, pretože tu badať zreteľný vplyv človeka. V Bratislave vzrastá počet obyvateľov, prebieha stavebná činnosť a mesto predstavuje významný dopravný uzol.

V synantropných spoločenstvách sa vo veľkej miere uplatňujú nepôvodné druhy. Ide o archeofyty, ktoré sa do druhotného areálu dostali pred koncom stredoveku a neofyty zavlečené na nepôvodné územia v novoveku. Niektoré z nich sa šíria na úkor pôvodných druhov a sú označované ako invázne [2]. Cieľom prezentovanej práce je zaznamenať rastlinné spoločenstvá Bratislavy, stanoviť, v ktorých z nich sú dominantné nepôvodné taxóny a zistiť, či sa spektrum takýchto spoločenstiev zmenilo oproti roku 1982. Zámerom práce je tiež vyhodnotiť, či sa oproti minulosti zmenilo zastúpenie nepôvodných taxónov v rámci druhového zloženia porastov na príklade asociácie *Sambucetum ebuli* Felföldy 1942 (trieda *Galio-Urticetea* Passarge ex Kopecký 1969).

Materiál a metódy

Materiál pre vyhodnotenia bol zbieraný formou fytoocenologických zápisov. Recentný fytoocenologický výskum bol realizovaný počas vegetačných sezón v rokoch 2011 a 2012. Pri zaznamenávaní fytoocenologických zápisov boli používané metódy zürišsko-montPELLIERSKEJ školy [3]. Zozbierané fytoocenologické zápisy boli uložené v programe TURBOWIN [4] a upravené v programe JUICE [5].

Zozbieraných 104 vlastných fytoocenologických zápisov patrilo k 17 rastlinným spoločenstvám. Po zhodnotení pôvodnosti taxónov v týchto zápisoch podľa Medveckej et al. [6] bolo 68 z nich priradených k 8 takým spoločenstvám, v ktorých bol dominantný nepôvodný taxón. Toto aktuálne zistené spektrum spoločenstiev bolo porovnané so zoznamom spoločenstiev, ktoré z územia Bratislavy uvádza Jarolímek [7].

Za účelom vyhodnotenia zmien zastúpenia nepôvodných taxónov v druhovom zložení bola vybraná modelová asociácia *Sambucetum ebuli* (trieda *Galio-Urticetea*), pretože pri tejto asociácii bol k dispozícii porovnateľný počet fytoocenologických zápisov. Použilo sa 6 vlastných fytoocenologických zápisov z tejto asociácie zozbieraných v rokoch 2011 – 2012 a 14 zápisov z tej istej asociácie z rokov 1980 – 1982, ktoré boli poskytnuté RNDr. Ivanom Jarolímkom, CSc. [7]. Pri určení pôvodnosti taxónov sa aj v tomto prípade vychádzalo zo zoznamu nepôvodných druhov Slovenska publikovaného v práci Medvecká et al. [6]. Pomocou programu JUICE bol vypočítaný počet, percentuálny podiel a pokryvnostný podiel nepôvodných druhov – archeofytov a neofytov v každom zápise. Pokryvnostný podiel nepôvodných druhov sa počítal metódou, ktorú opisuje Chytrý [8]. Následne boli vypočítané priemerné hodnoty pre celý súbor zápisov v programe Microsoft Excel 2010, v ktorom boli vytvorené aj výsledné grafy.

Výsledky a diskusia

Počas aktuálneho výskumu som v Bratislave zaznamenala 17 rastlinných spoločenstiev. V ôsmich z nich sú dominantnými taxóny na území Slovenska nepôvodné, konkrétne invázne neofyty. Sú to spoločenstvo so *Solidago gigantea* [*Galio-Urticetea*], spoločenstvo s *Impatiens glandulifera* [*Senecionion fluviatilis*], spoločenstvo s *Aster novi-belgii* agg. [*Senecionion fluviatilis*], spoločenstvo s *Echinocystis lobata* [*Senecionion fluviatilis*], spoločenstvo s *Fallopia japonica* agg. [*Senecionion fluviatilis*], spoločenstvo s *Ambrosia artemisiifolia* [*Artemisietea vulgaris*], spoločenstvo so *Stenactis annua* [*Artemisietea vulgaris*] a spoločenstvo s *Conyza canadensis* [*Stellarietea mediae*].

Počas rokov 1980 – 1982 boli v synantropnej vegetácii študovaného územia podchytené len dve spoločenstvá s inváznymi neofytmi: spoločenstvo so *Solidago gigantea* [*Galio-Urticetea*] a spoločenstvo s *Impatiens glandulifera* [*Senecionion fluviatilis*]. Výskyt týchto dvoch spoločenstiev v Bratislave bol potvrdený aj aktuálnym výskumom. Ostatných 6 z aktuálne zistených spoločenstiev, v ktorých majú prevahu nepôvodné druhy, z obdobia pred tridsiatimi rokmi z územia Bratislavy nie je doložených.

Spomedzi spoločenstiev tvorených inváznymi rastlinami, ktoré som v Bratislave zaznamenala, majú najväčšie zastúpenie spoločenstvo so *Solidago gigantea* [*Galio-Urticetea*] a spoločenstvo s *Aster novi-belgii* agg. [*Senecionion fluviatilis*].

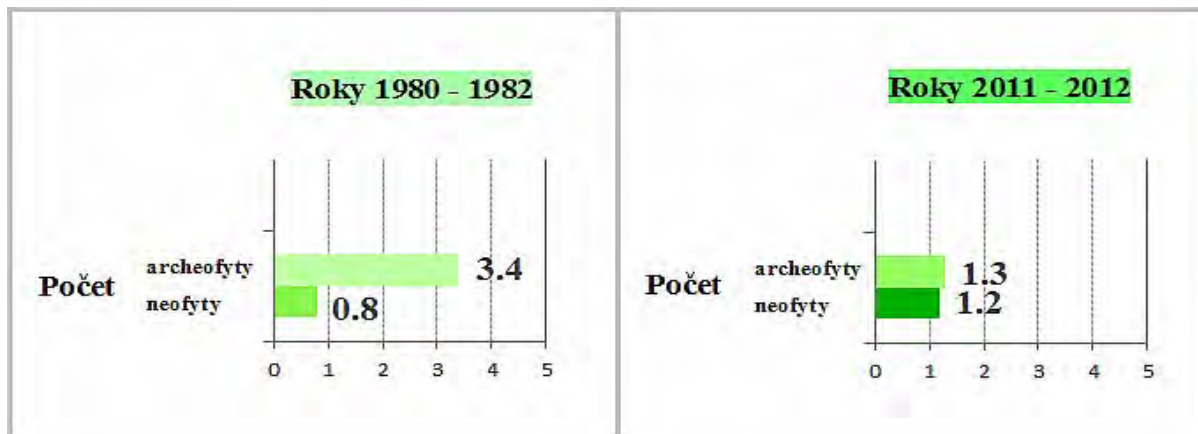
Mnohé z týchto invázných druhov rastlín ako napr. *Solidago gigantea*, *Impatiens glandulifera*, *Aster novi-belgii* agg., *Fallopia japonica* agg. boli do nepôvodných areálov privezené ako okrasné rastliny. Postupne sa z parkov a záhrad kde boli pestované, dostali aj do voľnej prírody [2].

Väčšina invázných rastlín sa vyznačuje značným vegetatívnym rastom [2]. Napr. jedince *Fallopia japonica* agg., ktoré som v Bratislave zaznamenala, dosahujú v porastoch jednak veľmi vysoké hodnoty pokryvnosti a navyše dorastajú niekedy do výšky aj vyše 2 metrov. Takto na plochách, kde sa vyskytujú invázne taxóny, vzniká zatienenie a tým podmienky nevhodné pre rast ostatných druhov. Tieto druhy preto obyčajne vytvárajú spoločenstvá, ktoré sú tvorené hlavne jedincami samotného invázneho taxónu a na ostatné druhy sú veľmi chudobné [2]. Tieto skutočnosti sa potvrdili aj počas môjho výskumu v Bratislave.

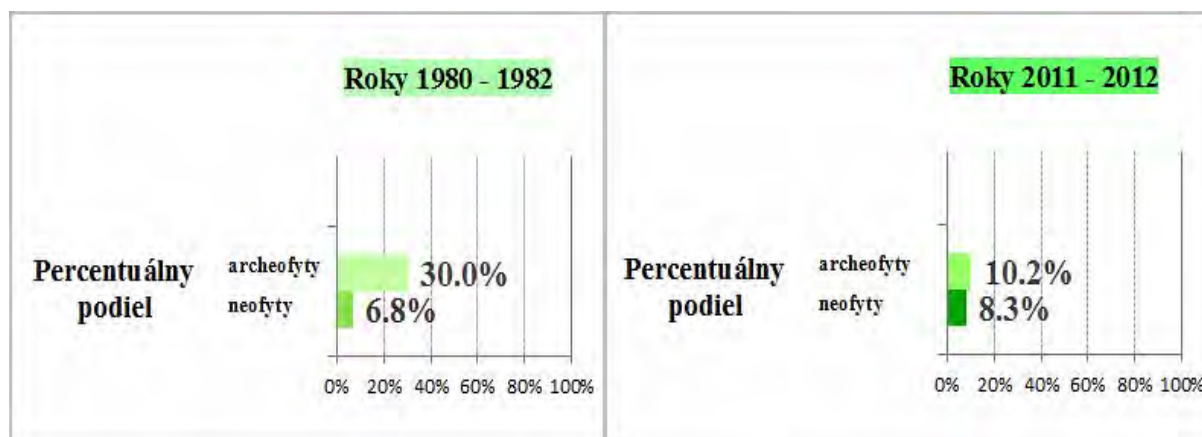
Okrem toho invázne rastliny väčšinou majú veľkú schopnosť vegetatívneho rozmnožovania a niektoré vytvárajú veľké množstvo plodov a semien. V prípade *Solidago gigantea* je to napr. až 50 000 semien na m². Toto inváznym druhom umožňuje rýchlo obsadiť veľké plochy [2]. V súčasnosti som v Bratislave zistila veľa plošne rozsiahlych spoločenstiev, tvorených inváznymi taxónmi. Napr. pri rieke Morave v oblasti Devínskej Novej Vsi spoločenstvo s inváznym taxónom *Aster novi-belgii* agg. zaberá miestami plochy veľké aj 300 m².

Invázne druhy sa vďaka spomínaným vlastnostiam dokážu aj rýchlo šíriť na veľké vzdialenosti. K šíreniu týchto druhov môžu pomôcť aj štruktúry, ktoré v krajine vytvára človek, napr. dopravné komunikácie. Rastlinné spoločenstvá invázných druhov často vytláčajú prirodzenú vegetáciu a následne aj na ňu viazané spoločenstvá živočíchov, najmä spoločenstvá hmyzu a vtáctva [2]. Niektoré z invázných rastlín sú alergény. Aj na študovanom území som podchytila viaceré typy vegetácie s výrazným zastúpením alergénov, napr. spoločenstvo s *Ambrosia artemisiifolia* a spoločenstvo so *Solidago gigantea*.

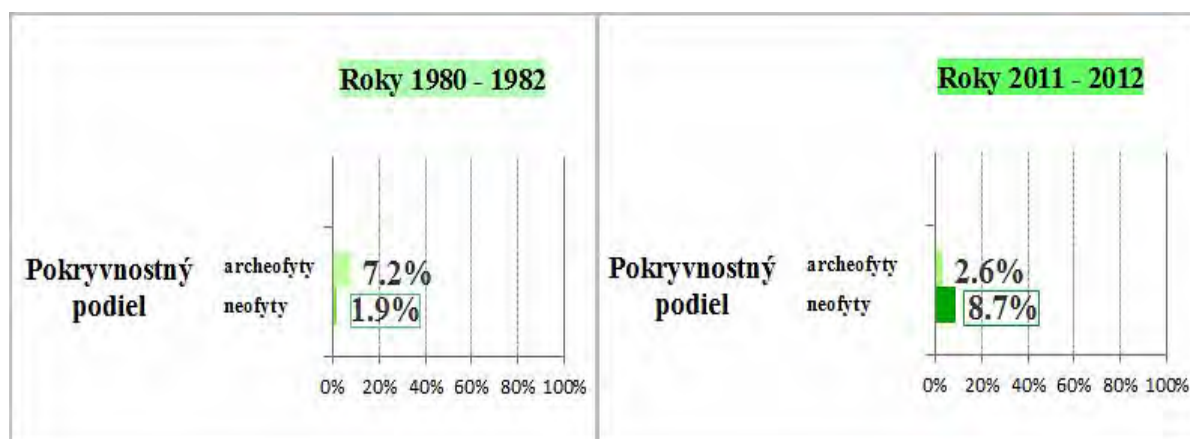
Ďalším výsledkom predkladanej práce je vyhodnotenie zastúpenia nepôvodných taxónov – archeofytov a neofytov v druhovom zložení asociácie *Sambucetum ebuli* z rokov 1980 – 1982 a rokov 2011 – 2012, ktoré znázorňujú grafy na Obr. 1, Obr. 2 a Obr. 3.



Obr. 1 Porovnanie priemerného počtu archeofytov a neofytov vo fytoecnologických zázpisoch asociácie *Sambucetum ebuli* z rokov 1980 – 1982 a rokov 2011 – 2012



Obr. 2 Porovnanie priemerného percentuálneho podielu archeofytov a neofytov vo fytoecnologických zázpisoch asociácie *Sambucetum ebuli* z rokov 1980 – 1982 a rokov 2011 – 2012



Obr. 3 Porovnanie priemerného pokryvnostného podielu archeofytov a neofytov vo fytoecnologických zázpisoch asociácie *Sambucetum ebuli* z rokov 1980 – 1982 a rokov 2011 – 2012

Ako vidieť na grafoch, priemerný počet, percentuálny podiel ako aj pokryvnostný podiel archeofytov v asociácií oproti minulosti klesol. Jarolímek [7] v spoločenstvách asociácie *Sambucetum ebuli* v Bratislave pred tridsiatimi rokmi zaznamenal archeofyty ako napr. *Leonurus cardiaca*, *Vitis vinifera*, ktoré sa podľa výsledkov môjho výskumu v týchto spoločenstvách recentne nevyskytujú. Možnou príčinou poklesu archeofytov je ubúdanie niektorých pre tieto druhy vhodných biotopov. Porasty asociácie *Sambucetum ebuli* v Bratislave pomerne často rastú popri záhradách, takže do porastov môžu druhy zo záhrad prenikať. V meste zaniklo veľa menších záhradiek, na ktorých sa archeofytom darilo. Mnohé z týchto záhrad sa prestali obhospodarovať alebo sa zastavali. Zastavali sa aj pomerne rozsiahle plochy vinohradov. Viaceré druhy archeofytov sú v súčasnosti na ústupe a radia sa medzi ohrozené a vzácne [1]. Skutočnosť, že archeofyty sú oproti minulosti vo vegetácií menej zastúpené, potvrdzujú aj výsledky môjho výskumu.

Oproti tomu z vyhodnotenia vyplýva, že zastúpenie neofytných druhov rastlín v porastoch asociácie *Sambucetum ebuli* z Bratislavy v porovnaní s minulosťou stúplo. Stúpol ich počet, percentuálny podiel a najmä pokryvnostný podiel. V spoločenstvách *Sambucetum ebuli* z rokov 2011 – 2012 dosahuje vysoké hodnoty pokryvnosti napr. invázny neofyt *Aster novi-belgii* agg., ktorý sa v týchto porastoch pred tridsiatimi rokmi vôbec nevyskytoval.

Keďže prírodné pomery mesta sa od obdobia spred tridsiatich rokov výrazne nezmenili, najpravdepodobnejšou príčinou zistených zmien vo vegetácií je pôsobenie človeka na podmienky v meste a tým aj na rastlinné spoločenstvá.

Záver

Porovnanie vlastného recentného fytoecologického materiálu s údajmi z rokov 1980 – 1982 ukazuje, že v synantropnej vegetácií Bratislavy sa pred tridsiatimi rokmi nevyskytovalo viacero v súčasnosti zaznamenaných spoločenstiev, v ktorých dominujú invázne neofyty. Zmeny nastali aj v druhovom zložení modelovej asociácie *Sambucetum ebuli*, kde sa taktiež zvýšilo zastúpenie neofytov. Uplatnenie archeofytov v porastoch *Sambucetum ebuli* je menšie ako v minulosti.

Výskum synantropnej vegetácie, ako aj štúdium vplyvu nepôvodných rastlín na pôvodnú vegetáciu, spôsobov adaptácií týchto druhov na nové podmienky, zmien, ktoré môžu spôsobovať a mechanizmov ich šírenia môže poskytnúť odpovede na mnohé ekologické otázky a pomôcť pri riešení problematiky šírenia invázných a alergénnych taxónov.

Pod'akovanie

Moja vďaka patrí Mgr. Jane Podroužkovej Medveckej, PhD. a RNDr. Ivanovi Jarolímkovi, CSc., za ich odborné vedenie, ako aj všetkým ostatným pracovníkom Botanického ústavu SAV a Katedry botaniky Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského za ich pomoc a za všetko čo som sa vďaka nim mohla naučiť.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Jarolímek I., Zaliberová M., Mucina L. (1997) Rastlinné spoločenstvá Slovenska 2. Synantropná vegetácia. Veda, Bratislava, p. 97
- [2] Pyšek P., Tichý L. (2001) Rostlinné invaze. Rezekvítek, Brno, p. 2
- [3] Braun-Blanquet J. (1964) Pflanzensoziologie 3. Auflage. Springer-Verlag, Wien, p. 39
- [4] Hennekens S. M., Schaminée J. H. J. (2001) J. Veg. Sci. 12, p. 589
- [5] Tichý L. (2002) J. Veg. Sci. 13, p. 451
- [6] Medvecká J., Kliment J., Májeková J. (2012) Preslia 84, p. 257
- [7] Jarolímek I. (1983) Ruderálne spoločenstvá Bratislavy. (Kandidátska dizertačná práca) Botanický ústav SAV, Bratislava, p. 28
- [8] Chytrý M., Pyšek P., Tichý L. (2005) Preslia 77, p. 339

Molekulárna charakterizácia meticilín rezistentných *Staphylococcus epidermidis* izolovaných z bryndze

Peter Rózsa, Romana Chovanová, Mária Mikulášová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, petko.rozsa@gmail.com

Abstrakt

Staphylococcal chromosomal cassette SCCmec is a gene cassette present in methicillin-resistant staphylococci, consisting of mec, ccr complexes and three junkyard regions. To this date several types of SCCmec cassettes were described. Their typization is epidemiologically and evolutionary important. In this study, we isolated 28 isolates of *S.epidermidis* from bryndza cheese, and we detected the presence of SCCmec types II, III, IVc, IVb and V, or combination of two cassettes in these isolates.

Kľúčové slová: *Staphylococcus epidermidis*; SCCmec; meticilínová rezistencia

Úvod a formulácia cieľa

Rezistencia voči meticilínu a ďalším β -laktámovým antibiotikám u stafylokokov je kódovaná génom *mecA*, ktorý kóduje alternatívny penicilín viažuci proteín PBP2a s nízkou afinitou pre väčšinu β -laktámových antibiotik. Produkcia PBP2a robí baktérie odolné voči takmer všetkým β -laktámovým antibiotikám v klinickom použití, s výnimkou najnovších antibiotík piatej generácie - cefalosporínov, ceftobiprolov a ceftarolinov [1]. Gén *mecA* sa nachádza na veľkom mobilnom elemente - stafylokokovej chromozomálnej kazete SCCmec [2]. Táto kazeta je integrovaná do chromozómu na mieste zvanom attBscv v orfX čo je otvorený čítací rámec s neznámou funkciou nachádzajúci sa v blízkosti počiatku replikácie.

SCCmec obsahuje dve esenciálne zložky a to mec komplex a ccr komplex [3]. Hlavné časti mec komplexu su inzerčné sekvencie IS431, a gén *mecA* so svojimi regulačnými génmi, *mecI* a *mecR1*, ktoré môžu byť neporušené, alebo skrátené. Ccr proteíny patria medzi invertázy alebo rezolvázy [3,4,5,6] a nesú charakteristické katalytické motívy na N-terminálnej časti, tieto gény sú zodpovedné za mobilitu SCCmec elementu a jeho chromozomálnu integráciu a excíziu. Okrem ccr a mec génových komplexov, ktoré sú nevyhnutné pre biologické funkcie SCCmec, kazeta obsahuje tiež tri spájacie oblasti (J1-J3), predtým nazývané "junkyard oblasti". SCCmec v týchto oblastiach nesie tiež rôzne transpozóny a integrované kópie plazmidov, ktoré ovplyvňujú rezistenciu voči iným ako β -laktámovým antibiotikám a vysvetľujú rozdiely vo veľkostiach typov SCCmec [7].

U *S. aureus* bolo popísaných osem typov SCCmec, ktoré boli očíslované podľa poradia ich popisu pomocou rímskych číslíc, SCCmec typu I-VIII. [3,4,8,9,10] Nomenklatúra

bola spresnená pridaním ďalších informácií, konkrétne s arabskými číslami pre typ ccr komplexu (1, 2, 3,...) a veľkými písmenami pre typ mec triedy (A, B,...) [11,12].

Doteraz bolo publikovaných len málo typizačných štúdií pre SCCmec u potravinových izolátov koaguláza negatívnych stafylokokov [1], pretože hlavná pozornosť sa sústreďuje na nemocničné (HA-MRSA) a komunitné (CA-MRSA) kmene meticilín rezistentných *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus epidermidis* je pritom považovaný za zásobáreň génov kódujúcich meticilínovú rezistenciu, ktorá horizontálnym transferom SCCmec kazety môže byť prenášaná na patogénne kmene *S.aureus* [1].

Táto práca sa zameriava na typizáciu a porovnanie stafylokokových chromozomálnych kaziet (SCCmec) u potravinových a klinických izolátov stafylokokov. Cieľom práce bolo izolovať a identifikovať *Staphylococcus epidermidis* z bryndze, stanoviť typ SCCmec kazety u meticilín rezistentných izolátov a porovnať ho s typom kaziet u klinických kmeňov *S.epidermidis*.

Materiál a metódy

Zo štyroch vzoriek bryndze zakúpených v komerčnej sieti sme izolovali stafylokoky postupom podľa Valariková [13]. Rodovú príslušnosť izolátov sme potvrdili PCR s rodovo špecifickými primermi Tstag422 a Tstag765 a druhovo špecifickými primermi Se705-1 a Se705-2 (*S.epidermidis*) postupom podľa Morot-Bizot a kol. 2004 [14]. Klinické izoláty sme obdržali z Mikrobiologického ústavu LFUK.

Citlivosť izolátov na antibiotiká sme stanovili diskovým difúznym testom. Použili sme disky s oxacilínom (1 µg) (Himedia,India) a Mueller-Hinton agar (Himedia, India).

Prítomnosť génu *mecA* sme potvrdili jednoduchou PCR používajúc primery a postup podľa Zhang a kol. 2005 [15].

Na typizáciu SCCmec sme použili modifikovanú multiplex PCR podľa Zhang a kol. 2005 [15] s ôsmimi párami primerov určených na identifikáciu typov SCCmec I, II, III, IVa, IVb, IVc, IVd, V a dvoma párami primerov na určenie triedy mec komplexu a ccr komplexu.

Výsledky a diskusia

Zo vzoriek bryndze sme izolovali 33 kmeňov *S.epidermidis*. U 29 z nich sme diskovou difúznou metódou potvrdili rezistenciu voči oxacilínu a PCR reakciou sme stanovili determinant tejto rezistencie - gén *mecA*, kódujúci alternatívny penicilín viažúci proteín PBP2a (Obr. 1).



Obr. 1 Detekcia génu *mecA*. Dráhy 1 – marker, 2 až 11 – potravinové izoláty, 12 – negatívna kontrola.

Modifikovanú multiplex PCR podľa Zhang [15] sme použili na typizáciu meticilínovej chromozómovej kazety SCCmec u izolovaných potravinových izolátov a porovnanie s výskytom SCC mec u klinických izolátov. Výsledky typizácie klinických a potravinových izolátov sú v tab. 1.

Tab. 1 Počet potravinových a klinických kmeňov s daným typom kazety SCCmec

Typ kazety	Počet potravinových kmeňov	Počet klinických kmeňov
I	1	1
II	8	4
III	12	2
IVa	0	4
IVb	1	0
IVc	3	0
IVd	0	0
V	1	0
III+IVc	1	0
IVc+IVd	1	0
nezaradené	1	0

Najčastejšie vyskytujúca sa kazeta bola u potravinových izolátov kazeta typu III, nasledovaná kazetou II (Obr. 2) a v menšom počte sme detegovali kazety IVc, IVb a V. V niekoľkých prípadoch sme detegovali prítomnosť dvoch kaziet u jedného kmeňa, konkrétne

išlo o kazety III a IVc u jedného izolátu a IVc a IVd tiež u jedného izolátu. Jeden izolát sa nám použitými metódami nepodarilo zaradiť, u *S.epidermidis* však je známe, že obsahujú viac typov kaziet, než *S.aureus* a mnohé z nich sú zatiaľ netyfovateľné [16].



Obr. 2 SCCmec typu II. Dráhy 1 – marker, 2 – Negatívna kontrola, 3 až 12 – potravinové izoláty *Staphylococcus epidermidis*

U klinických izolátov sme v najvyššom počte stanovili kazety II a IVa. Prítomnosť práve kaziet typu II a IV spolu s kazetou typu III u klinických izolátov potvrdzujú aj ďalšie štúdie [15,17,18,].

Rozdiely v prítomnosti SCCmec medzi potravinovými a klinickými izolátmi sú teda pomerne výrazné aj keď u oboch skupín prevládajú hlavne kazety typov II, III a IV.

Záver

Podarilo sa nám typizovať celkovo 28 izolátov *Staphylococcus epidermidis* a potvrdili sme rozdiely vo výskyte rôznych typov kaziet u potravinových a klinických izolátov.

PodĎakovanie

Tento príspevok je výsledkom realizácie projektu (ITMS 26240120027) podporeného OPVaV financovaného EFRR a bol podporený projektom VEGA 1/0892/11.

Zoznam použitej literatúry

[1] Bengt Hellmark (2011) Örebro Studies in Medicine, 53, p. 117

- [2] Garza-Gonzalez E., Morfin-Otero R., Llaca-Diaz J.M., et al. (2010) *Epidemiol. Infect.* 138(5), p. 645
- [3] Ito T., Katayama Y., Asada K., et al. (2001) *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(5), p. 1323
- [4] Ito T., Ma X.X., Takeuchi F., et al. (2004) *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(7), p. 2637
- [5] Katayama Y., Ito T., Hiramatsu K. (2000) *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(6), p. 1549
- [6] Ito T., Katayama Y., Hiramatsu K. (1999) *Antimicrob. Agents Chemother.* 43(6), p. 1449
- [7] Haran K.M. (2011) Isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. University of Minnesota, USA p. 9
- [8] Ma X.X., Ito T., Tiensasitorn C., et al. (2002) *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(4), p. 1147
- [9] Oliveira D.C., Milheirico C., de Lencastre H. (2006) *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(10), p. 3457
- [10] Zhang K., McClure J.A., Elsayed S., et al. (2009) *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(2), p. 531
- [11] Chongtrakool P., Ito T., Ma X.X., et al. (2006) *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(3), p. 1001
- [12] Ibrahim S. (2010) Methicillin Resistance in Staphylococci: Horizontal Transfer of Mobile Genetic Element (SCCmec) between Staphylococcal Species. Helsinki University Print, Helsinki, Finland p. 42
- [13] Valáriková J. (2012) Diplomová práca, Katedra mikrobiológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, SR
- [14] Morot-Bizot S.C., Talon R., Leroy S. (2004) *J. Appl. Microbiol.* 97, p. 1087
- [15] Zhang K., McClure J.A., Elsayed S., et al. (2005) *J. Clin. Microbiol.* 43(10), p. 5026
- [16] Zong Z., Peng C., Lü X. (2011) *PLoS One.* 6(5), p. 20191
- [17] Wisplinghoff H., Rosato A.E., Enright M.C., Noto M., Craig W., Archer G.L. (2003) *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(11), p. 3574
- [18] Machado A.B.M.P., Reiter K.C., Paiva R.M., et al. (2007) *J. Med. Microbiol.* 56(10), p. 1328

Biologické a ekologické vlastnosti spoločenstva podeniiek a pošvatiek ako indikátor využitia riečnej krajiny

Andrea Rúfusová

Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra ekológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; andrea.rufusova@gmail.com

Abstrakt

The impact of land use on aquatic insects assemblages (Ephemeroptera, Plecoptera) was investigated in carpathian rivers Ľubochnianka and Revúca using functional assessment based on “species traits”. Studied river catchments varied in degree of degradation. The negative effects of land use (mainly deforestation) were demonstrated by “species traits” analysis and by changes in structural assemblages of functional groups. We observed increase in abundance of eurytopic species (β group) and decrease in abundance of stenotopic species (α group) at antropogenic disturbed sites. Functional structure changes could sensitively indicate human impacts in the catchment.

Kľúčové slová: *land use; deforestation, biological/ecological trait; functional groups.*

Úvod a formulácia cieľa

Antropické činnosti narúšajú prirodzené procesy v krajine a v tokoch vyvolávajú celý rad hydrologických a fyzikálno-chemických zmien. Najčastejším prípadom negatívneho vplyvu na vodné organizmy je premena „prirodzenej“ krajiny na urbánnu alebo poľnohospodársku. Odstránenie príbrežnej vegetácie spôsobuje nadmerný prísun sedimentov a živín (dusík, fosfor, uhlík) do toku [1, 2]. Sedimenty často prinášajú do toku organické (hnoj, siláž), či toxické látky (pesticídy), ktoré môžu následne vyvolať zmeny od eutrofizácie až po úhyn organizmov [3]. Už malý nárast organického znečistenia môže viesť k výrazným zmenám v profile biologických vlastností spoločenstva [4].

Rôzne životné stratégie organizmov pre rôzne úrovne disturbancií indikujú rôznu intenzitu [5] a typy vplyvov ľudskej činnosti [6, 7] Na základe zmien v štruktúre biologických a ekologických vlastností spoločenstva podeniiek a pošvatiek chcem v tejto práci indikovať vplyv využitia krajiny, predovšetkým odlesnenia na dve podhorské rieky v povodí Váhu - Ľubochnianky a Revúcej. Na každej rieke boli vybrané dva profily (L1, L2, R1, R2). Rieky majú podobný gradient prostredia (geológia, geomorfológia, hydromorfológia), ale odlišný stupeň využitia krajiny. Zatiaľ čo povodie Ľubochnianky je zalesnené (87-90% povodia) a minimálne narušené (žiadne aglomerácie), povodie Revúcej je vystavené pomerne silnej antropickej záťaži (aglomerácie do 3%, poľnohospodárstvo 30%, odlesnenie 30%).

Materiál a metódy

V práci boli použité taxonomické dáta, ktoré boli získané zberom a následnou determináciou na riekach Ľubochnianka a Revúca v rokoch 2007-2008. Boli spracované na základe databázy [8] obsahujúcej zaradenie druhov/rodov/čeladi do jednotlivých funkčných skupín a podľa databázy biologických a ekologických vlastností vodných bezstavovcov [9], ktoré odrážajú: 1) životné stratégie organizmov 2) rezistenčný a rezilienčný potenciál 3) všeobecné biologické a fyziologické črty. Použitý bol ADE-4 softvér [10] pre všetky multimetrické analýzy a Statistica, Version 4.1 softvér [11] pre neparametrické testy.

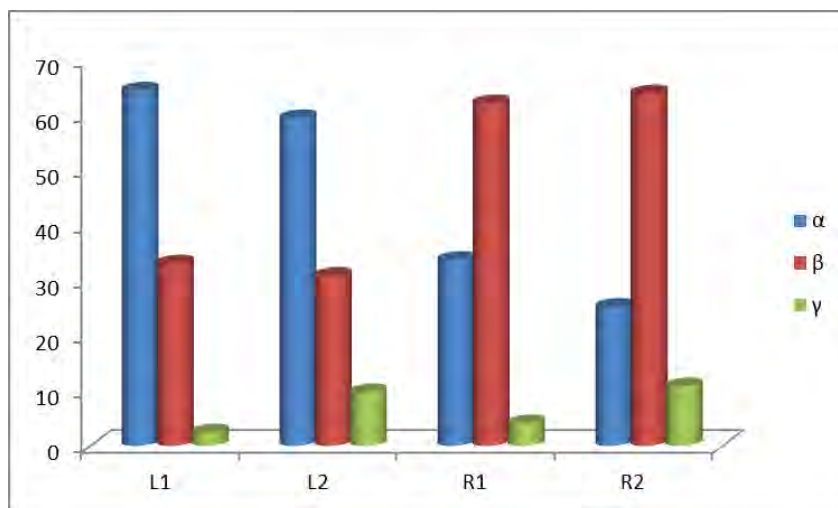
Výsledky a diskusia

Na základe druhových vlastností (obr. 2) a zastúpenia funkčných skupín (obr. 1) spoločenstiev podeniak a pošvatiek na riekach Ľubochnianka a Revúca sme zachytili výrazný trend zmien medzi nenarušenými a narušenými lokalitami.

Nenarušené lokality (L1, L2) sú charakteristické vysokým podielom α -skupiny (stredne veľké, mono- až semivoltínne plazivé formy, reofilné s akvatickým dýchaním, majú slabšie vyvinuté tracheálne žiabre, žijú v horských bystrinách a horných tokoch riek na skalnatom podklade, v oligotrofných vodách, sú oligostenotermné, zoškrabávače, drviče a predátori, napr. zástupcovia rodov *Isoperla sp.*, *Amphinemura sp.*, *Leuctra sp.*, *Epeorus sp.*, *Rhitrogena sp.*, *Dinocras sp.*).

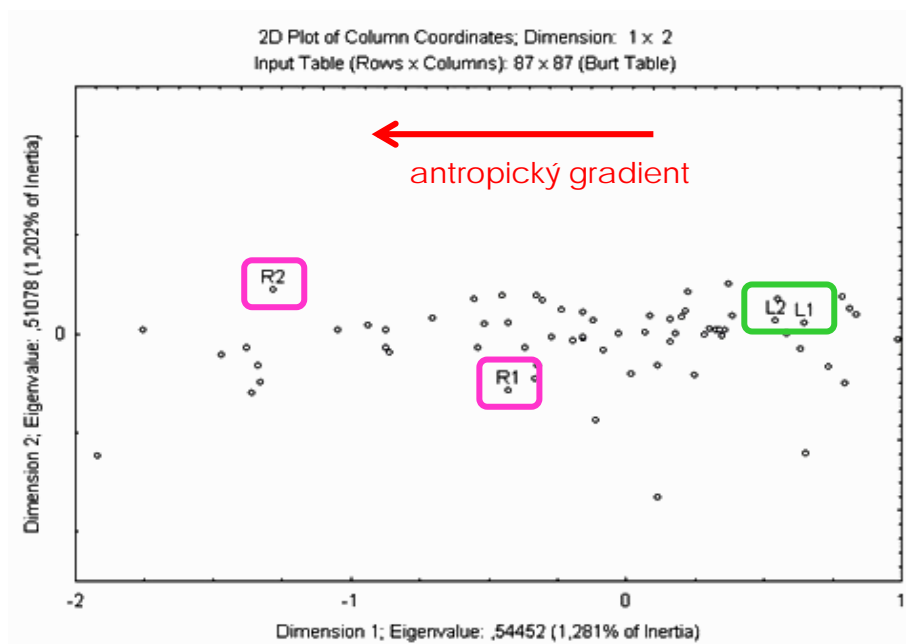
Naopak antropickou činnosťou (predovšetkým odlesnením) zasiahnuté lokality R1 a R2 sa vyznačujú nárastom podielu skupiny β (stredne veľké až drobné formy, s aquatickým dýchaním s lepšie vyvinutými tracheálnymi žiabrami, prevažne eurytermné, ritrofilné organizmy podhorských oligo- až mezosaprobnych vôd, napr. zástupcovia rodov *Baetis sp.*, *Ecdyonurus sp.*).

Keďže sa jedná o toky s takmer rovnakým gradientom prostredia, zachytený trend nesúvisí s prirodzenými zmenami v rámci riečneho kontinua, ale indikuje antropický vplyv. Skupina γ zahrňuje stredne veľké, eurytermné, beta-mezosaprobne organizmy lenitických aj lotických úsekov riek. Žijú v beta-mezotrofných vodách na pevnom minerálnom substráte alebo makrovegetácii. Tieto organizmy sa živia zoškrabovaním nárastov, ohryzovaním hrubého rastlinného detritu alebo makrovegetácie. Mnohé biologické vlastnosti sú podobné so skupinou β . Sleduje mierny nárast podielu tejto skupiny v smere riečneho kontinua.



Obr. 1 Zastúpenie funkčných skupín spoločenstiev podeniek a pošvatiek na riekach Ľubochnianka a Revúca.

Rovnaký gradient antropického znečistenia sme zaznamenali aj analýzou samotných „species traits“ spoločenstva podeniek a pošvatiek (Obr.2) – lokality R1 a R2 sa výrazne líšia od lokalít L1 a L2. Pričom lokalita R2 sa javí ako najviac degradovaná.



Obr. 2 Rozdelenie lokalít na základe podobnosti druhových vlastností spoločenstiev podeniek a pošvatiek mnohorozmernou analýzou.

Výsledky som porovnávala s viacerými prácami, keďže skúmané povodie patrí medzi dlhodobu sledované lokality. Sú to predovšetkým práce, ktoré vplyv antropickej činnosti na rieke Revúca sledujú na základe zmien v taxonomickej štruktúre jednotlivých spoločenstiev makrozoobentosu [12, 13, 14].

Záver

Zloženie biologických a ekologických vlastností spoločenstva podeniak a pošvatiek na nami sledovaných lokalitách citlivo reaguje na zmeny súvisiace s využitím krajiny. Zatiaľ čo na nenarušených lokalitách dominujú zástupcovia α skupiny charakteristickej pre prirodzené podmienky, na degradovaných lokalitách sme zaznamenali nahrádzanie stenoékných druhov euryéknymi (skupina β). Použitá metóda hodnotenia vhodne rozlíšila prirodzené a antropické vplyvy pôsobiace v skúmanom povodí.

Pod'akovanie

Chcela by som poďakovať prof. RNDr. Il'jovi Krnovi, DrSc. a Mgr. Lucii Krištofovičovej za poskytnutie údajov, materiálu a pomoc. Zároveň ďakujem i celému kolektívu, ktorý sa podieľal na práci v teréne. Príspevok vznikol vďaka podpore grantu VEGA č. 1/0705/11.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Peterjohn W. T., Correll D. L. (1984) *Ecology* 65,p. 1466
- [2] Gergel S. E., Turner M. G., Kratz T. K. (1999) *Ecological applications* 9(4), p. 1377
- [3] Friberg N., Skriver J., Larsen S .E, et al. (2010) *Freshwater Biology* 55, p. 1405
- [4] Feio M. J., Dolédec S. (2012) *Ecological Indicators* 15, p. 236
- [5] Townsend C. R., Hildrew A. G. (1994) *Freshwater Biology* 31, p. 265
- [6] Dolédec S., Statzner B., Bournaud M. (1999) *Freshwater Biology* 42, p. 737
- [7] Jungwirth M., Muhar S., Schmutz S. (eds) (2000) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- [8] Usseglio-Polatera P., Richoux P., Bournaud M., et al. (2001) *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 139(1), p. 53
- [9] Tachet H., Richoux P., Bournaud M., et al. (2000) *Freshwater Biology* 31, p. 265
- [10] Thioulouse J., Chessel D., Dolédec S., et al. (1997) *Statistics and Computin*, p.75
- [11] StatSoft Inc. (1997). *STATISTICA for Macintosh [Computer Program Manual]*. StatSoft, Inc., Tulsa, OK.

- [12] Illéšová D., Beracko P., Krno I., Halgoš J. (2010) *Biologia* 65(5):892-898
- [13] Krno I., Valachová S. (1999) *Ekológia* 18: 310-324
- [14] Krno I., Žiak M. (2012) *Aquatic Insects* 34: 65-84

The evaluation of morphological variability of selected members of Geoglossaceae (Ascomycota)

Nikola Rybáriková

Institute of Botany, Slovak Academy of Sciences, Department of non-vascular plants, Dúbravská cesta 9, 845 23 Bratislava 4, Slovakia; nikola.rybarikova@savba.sk

Abstract

To clarify the changeability of inner structures in the process of development, we studied 16 taxa of Geoglossaceae in 3 different phases of ontogenetic development (young, mature and old phase). We have focused our research to the variability of the structures, especially paraphyses. The most noticeable changes we consider paraphyses contraction (*Geoglossum glabrum*), browning and fragmentation of apical part of paraphyses (*Trichoglossum walteri*) as well as increasing number of septa in the spores (*Geoglossum umbratile*).

Key words: *Microglossum; Thuemenidium; Trichoglossum; Geoglossum; Slovakia.*

Introduction

In the Checklist of non-vascular and vascular plants of Slovakia [1], only two members of Geoglossaceae family are introduced. More extensive fieldwork research has shown that this group of fungi has got significantly greater representation [2, 3, 4]. Most of these fungi can not be distinguished without microscopic analysis. The morphology of internal structures is markedly changed in the process of development. This fact complicates the process of determination. To clarify this changeability, we observed 16 species of Geoglossaceae in 3 different phases of ontogenetic development: young, mature and old fruitbody in each species.

Material and methods

We defined and examined 3 phases of ontogenetic development in the frame of every taxon. The „young fruitbody“ define the smallest fruit-bodies compared to other fruitbodies at the same collection. The „mature fruitbody“ define the largest fruitbodies compared to other fruitbodies at the same collection. The „old fruitbody“ define squid fruitbodies loss of strength and elasticity regardless of the size. The micromorphological characters were observed in dried material using microscope Zeiss AxioScope. The material was examined in distilled water. During the development of the spores, asci, paraphyses and setae, every notable change were observed and analysed. Each value of internal structures (in every phase of

ontogenetic development) was estimated as average of 30 measurements. Collections and the materials used for research are deposited in the herbarium of the Institute of Botany, Slovak Academy of Sciences in Bratislava.

Results and discussion

In the genus *Microglossum* we examined morphological variability of 4 taxons: *M. viride*, *M. nudipes*, *M. olivaceum* and *M. rufescens*. The most significant change is enlarging the apical part of paraphyses in *Microglossum viride* (Fig. 1.) and *M. rufescens* (Fig. 4.). In *M. nudipes* we observed widening of paraphyses (Fig. 2.). *Microglossum olivaceum* has the secondary branches of paraphyses in young fruitbodies shorter than in mature and old fruitbodies (Fig. 3.).

We examined 4 members of the genus *Trichoglossum* (*T. hirsutum*, *T. octopartitum*, *T. variabile*, *T. walteri*). There are few changes, what we observed in all members during maturing, for example fragmentation of apical part of paraphyses, or darkening of setae. We also noted increasing number of septa in the spores (*T. hirsutum*, *T. variabile*, *T. walteri*). In *T. walteri* the apical part of paraphyses in old stage becomes brown (Fig. 8.).

In *Thuemenidium atropurpureum* we considered the apical part of paraphyses in old stage becomes gently narrow (Fig. 9.).

From the genus *Geoglossum* we examined 7 members (*Geoglossum glutinosum*, *G. glabrum*, *G. cookeanum*, *G. fallax*, *G. umbratile*, *G. uliginosum*, *G. simile*). The paraphyses in old stage become creased (*G. glutinosum*, *G. umbratile*) (Fig. 10, 14) and brown (*G. glutinosum*, *G. simile*) (Fig. 10, 16). We also observed the narrowing (*G. glabrum*, *G. cookeanum*) (Fig. 11, 12) and enlarging (*G. fallax*) of apical part of paraphyses (Fig. 13). As the most changeable taxon we denoted *G. glabrum*. The apical part of paraphyses in young stage is markedly enlarged (almost globose) compared to paraphyses in mature and old fruitbodies. The number of paraphyses cells decrease also (Fig. 11.).

The topic of different shape of structures each phase of ontogenesis came to the attention even before this study. Accidental microscopic of *G. glabrum* in various age showed markedly different shapes of paraphyses. Deckerová [5] was the first who draw attention to this issue. In her view, the morphological variability of some members of *Geoglossaceae* may complicate the process of determining. Based on the results of our study we can approve that the shape of some structures in

selected members during development actually change. As the most important we consider the changes of shape of each structures (especially paraphyses), which can be misleading in the determination. According to Benkert [6] the shape and size of apical part of paraphyses are the most important distinguishing characters in Geoglossaceae. As the most changeable taxon we evaluated *G. glabrum*. The paraphyses of this taxon can change so markedly that it may appear to be 2 or 3 different taxons [7].

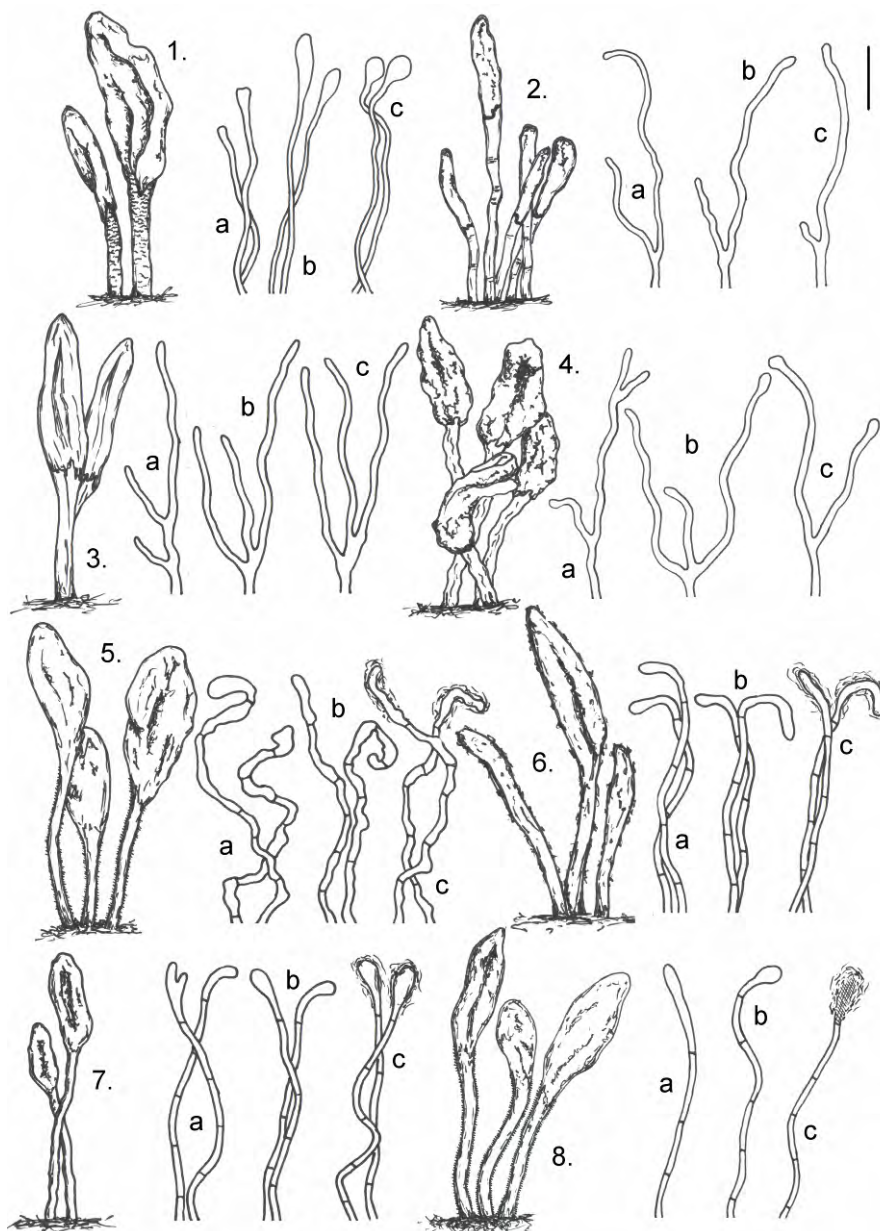


Fig. 1- 8 Fruitbodies and paraphyses (a - young fruitbodies, b - mature fruitbodies, c - old fruitbodies). 1. *Microglossum viride*, 2. *M. nudipes*, 3. *M. olivaceum*, 4. *M. rufescens*, 5. *Trichoglossum hirsutum*, 6. *T. octopartitum*, 7. *T. variabile*, 8. *T. walteri*, (bar for paraphyses: 10 μ m)

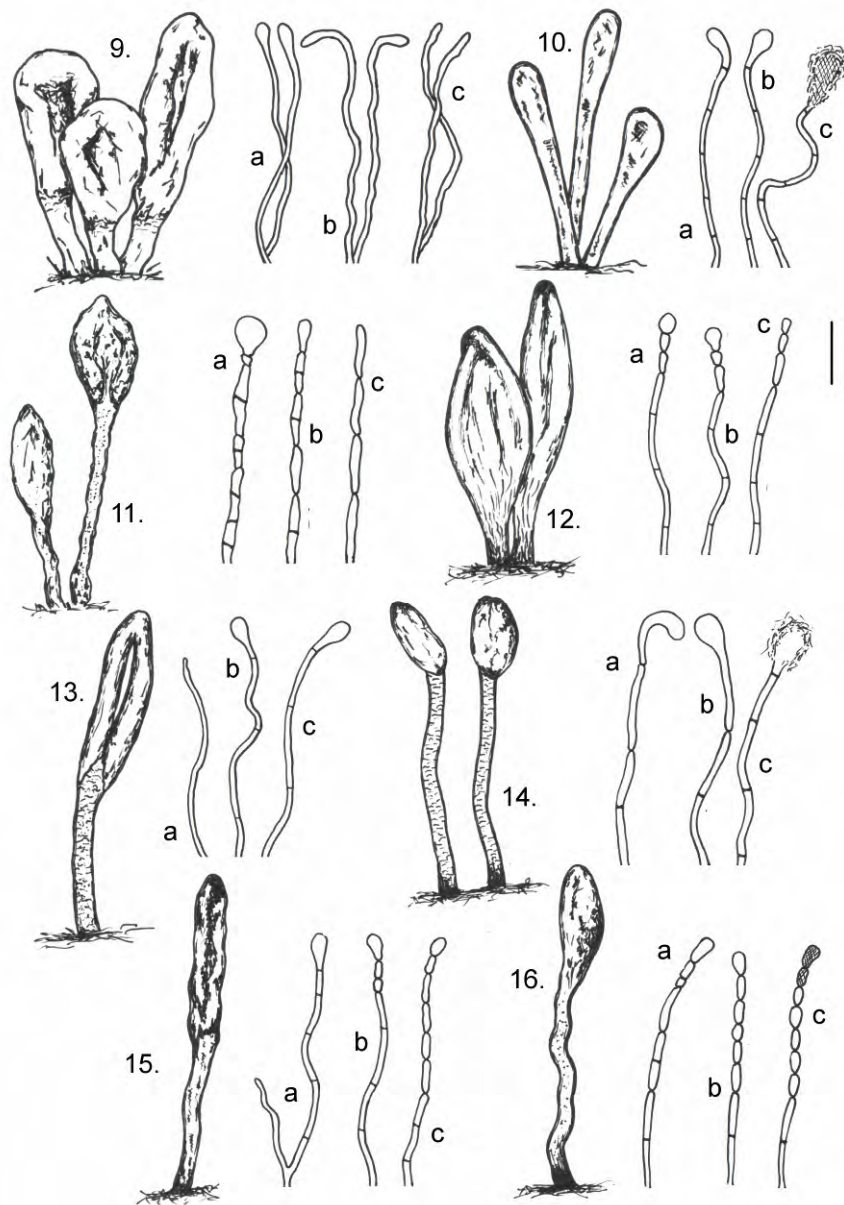


Fig. 9-15 Fruitbodies and paraphyses (a - young fruitbodies, b - mature fruitbodies, c - old fruitbodies) 9. *Thuemenidium atropurpureum*, Fig. 10. *Geoglossum glutinum*, Fig. 11. *G. glabrum*, Fig. 12. *G. cookeanum*, Fig. 13. *G. fallax*, Fig. 14. *G. umbratile*, Fig. 15. *G. uliginosum*, Fig. 16. *G. simile*, (bar for paraphyses 10 μ m)

Conclusions

According to the results the morphology of some members of Geoglossaceae actually changes. The measure and concept of changeability are very specific for each taxon. As the most variable we consider the members of *Geoglossum* and *Trichoglossum*. Generally, we consider as the most significant the mature fruitbodies.

This phase of development includes all typical and important characters for each taxon. Even if there is a lack of fruitbodies, there is possibility to reliably determine it.

Acknowledgements

I would like to express my thanks to Viktor Kučera and Pavel Lizoň for directing my work and Milan Zajac for advice me with graphic edits of designs. The study was supported by Grant No. VEGA 02/0088/13.

References

- [1] Lizoň P., Bacigálová K. (1998) Huby. Veda, Bratislava, p. 101
- [2] Kučera, V., Lizoň P., Kautmanová I. (2008) *Biologia* 63, p. 482
- [3] Kučera, V., Lizoň P., Kautmanová I. (2010) *Czech Mycol.* 62, p. 13
- [4] Kučera V., Lizoň P. (2012) *Biologia* 67, p. 654.
- [5] Deckerová, H. (2006) *Mykol. Listy* 98, p.8
- [6] Benkert, D. (1996) *Fed. Repert.* 107, p. 269
- [7] Dennis, R.W.G. (1978) *Vaduz*, 585

Zmeny ruderalnej vegetácie po 50 rokoch v Doline Siedmich prameňov

Zita Rydzyková

*Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra botaniky, Révová 39, 811 02
Bratislava 1, Slovensko; zitka.rydzykova@gmail.com*

Abstrakt

Valley of Seven springs (Belianske Tatry Mts.) is one of the richest floristic localities in Slovakia. In this area was kept cattle and sheep for many years there. After TANAP was established, pasturage was forbidden. In that time, vegetation in Sheep and Avalanche glen sociologically consisted of *Geranio sylvatici-Alchemilleto crinitae*, *Carduetum personatae* and *Geranio phaei-Urticetum dioicae*. Phytosociological research in 2011 – 2012 identified new association *Rubetum idaei* and extension of *Geranio phaei-Urticetum dioicae*. Reasons and future trends are discussed below.

KLúčové slová: *Synantropné spoločenstvá; sukcesia; zákaz pastvy; Belianske Tatry.*

Úvod a formulácia cieľa

Dolina Siedmich prameňov (ďalej DSP) je navýchodnejšou dolinou Belianskych Tatier, ktorej dominuje ich posledný najvyšší vrchol Bujačí 1947 m n. m. Pestrá, prevažne karbonátová geologická stavba podmienila vznik bohatej flóry, ktorá kvôli kvalitnej pastve oddávna lákala v prvom rade pastierov. Hoci v žľaboch samotnej doliny nie sú pastviská známe, v jej dolnej časti (Ovčí a Lavínový žľab, ďalej OŽ a LŽ, v blízkosti chaty Plesnivec, vo výške 1290 m n.m.) boli stáda košarované a odtiaľ zrejme ďalej vyhánané žľabom na hrebeň [1, 2]. Uzákonneenie Tatranského národného parku v roku 1949 znamenalo aj postupný zákaz pasenia, ako vykorisťujúcej činnosti ničiacej prírodu Tatier [2, 3]. Dolinu zákaz zasiahol v roku 1952, kedy sa tu do tohto obdobia páslo ešte 600 – 1300 oviec [1, 4]. Stav vegetácie z tohto obdobia je zdokumentovaný fytoecologickými zápismi [1, 2, 5], čo nám dnes umožňuje pozorovať a porovnať prípadné sukcesné zmeny. [1]

Cieľom tejto práce je na základe súčasných a starších dát zistiť a porovnať zmeny rastlinných spoločenstiev uvedenej lokality OŽ a spodnej časti LŽ ako aj ďalšie sukcesné smerovanie.

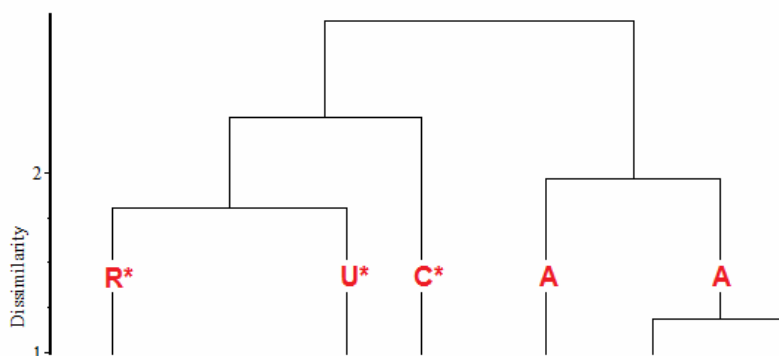
Materiál a metódy

Fytocenologické zápisy boli získané metódami züriško-montpellierskej školy [6] v mesiacoch júl/august v rokoch 1954 – 1958 a 2011 – 2012. Kvôli nejednotnosti používaných stupníc pokryvností sme ich vyjadrili v percentách. Následne sme v programe JUICE [7] zjednotili niektoré poddruhy a časťou autorov užšie chápané druhy do najbližších vyšších a širšie chápaných taxónov (*Achillea millefolium* ssp. *sudetica*, *Alchemilla crinita*, *A. micans*, *A. mollifolia*, *A. monticola*, *A. straminea*, *A. vulgaris*, *A. xanthochlora*, *Taraxacum* sect. *ruderalia*, *T. sect. alpina*, *T. spp.*) a taktiež vylúčili nedostatočne určené taxóny (*Viola* spp., *Myosotis* spp.) a machorasty. Z balíka programov SYN-TAX [8] sme pri numerickej klasifikácii použili program HierClus, pričom bola použitá β -flexibilná metóda ($\beta = -0.25$) a koeficient podobnosti (similarity ratio).

Syntaxóny s citáciami autorov uvádzame len pokiaľ sú v texte uvedené po prvý krát, všetky sú podľa posledných syntaxonomických revízií [9, 10]. Taxóny sú uvedené podľa Zoznamu vyšších a nižších rastlín Slovenska [11].

Výsledky a diskusia

V rokoch 1954 – 1958 boli na uvedenej lokalite zaznamenané spoločenstvá *Geranio sylvatici-Alchemilietum crinitae* Hadač et al. [1] prevažne v OŽ a *Carduetum personatae* Hadač et. al. [1] a *Geranio phaei-Urticetum dioicae* Hadač et al. [1] v LŽ. V rokoch 2011 – 2012 sme približne na tých istých miestach zaznamenali spoločenstvá *Rubetum idaei* Hadač et. al. [1] (v OŽ), *Carduetum personatae* a *Geranio phaei-Urticetum dioicae* sa prakticky nezmenilo.



Obr. 1 Dendrogram nepodobnosti spoločenstiev, R – *Rubetum idaei*, U – *Geranio phaei-Urticetum dioicae*, C – *Carduetum personatae*, A – *Geranio sylvatici-Alchemilietum crinitae*, * skupina obsahuje zápisy z rokov 2011/12

Najvýraznejšie zmeny nastali v lúčnom spoločenstve *Geranio sylvatici-Alchemilletum crinitae*, ktoré dnes už v doline nenájdeme (obr. 1). Väčšinou bolo nahradené spoločenstvom *Rubetum idaei*.

Rubetum idaei bolo pred vyše 50 rokmi charakteristickým porastom niekdajšieho rúbaniska, ktoré bolo neskôr umelo zalesnené. Spoločenstvá, ktoré sme v OŽ zaznamenali dnes, sa oproti pôvodne diagnostikovanej asociácii líšia predovšetkým menším počtom druhov (oproti pôvodným priemerným 44 iba 11 druhov, nevyskytujú sa v nich napr. lesné druhy ako *Dryopteris filix-mas*, *Athyrium filix-femina*, *Sorbus aucuparia*) a mierne kyslejšou pôdou (priemerné pH je 5,6 oproti 6,1). Spoločenstvo s *Rubus idaeus* nastúpilo už pred vyše 30 rokmi [12], hoci pôvodne sa podobný vývoj vôbec nepredpokladal [2].

Nitrofilné spoločenstvo *Geranio phaei-Urticetum dioicae* bolo v spodnej časti lavínového žľabu prítomné už v roku 1926 [13], pričom jeho pôvod sa dával do súvislosti s košiarom na tomto mieste [1, 2, 5, 13]. Každoročné lavíny v týchto miestach hromadia veľké množstvo zvetralín, organických zvyškov a snehu, ktoré sa tu pravdepodobne kumulovali od poslednej glaciálnej doby [5, 14]. Nánosy spôsobujú prirodzene vysoký depozit dusíka, čoho dôkazom sú druhy ako *Urtica dioica*, *Epilobium angustifolium* (nitrofilné druhy) alebo *Geranium sylvaticum*, *Chaerophyllum hirsutum* (tieňomilné druhy) [15, 16], a vody [17]. Antropogénny pôvod *Geranio phaei-Urticetum dioicae* je tu preto otázny, na rozdiel od porastov v bezprostrednej blízkosti horskej chaty (*Carduetum personatae*), kde je menej skeletnatá, hlbšia pôda a snehová pokrývka je trvá kratšie.

Pri pôvodnej predikcii vývoja vegetácie OŽ a LŽ sa predpokladal ústup porastov so žihľavou a rozšírenie alchemilkových lúk s prevahou *Deschampsia caespitosa* [2]. *Urticetum dioicae* je oproti *Rubetum idaei* nitrofilnejšie a hygrofilnejšie, pričom často ho nachádzame na zatienených plochách. Jeho hlavným limitačným faktorom je však obsah dusíka [18], kyslosť pôdy však zrejme tiež hrá svoju rolu (pôvodné pH alchemilkových lúk bolo 5,5 až 6,6, na rozdiel od porastov so žihľavou, kde pH stabilne dosahuje 6,6).

Pre porozumenie pozorovanej sukcesie je dôležité uviesť si vzájomné ekologické interakcie rastlín, populácií a spoločenstiev vzhľadom na najmenšie ekologické niky, ekosystém a jeho mozaikovitosť, od prvých sukcesných štádií až po potenciálnu vegetáciu danej lokality.

Ako je možné, že ukončenie pastvy tak rapídne zmenilo druhové zloženie? Niektoré vysoké byliny dokážu v krátkom časovom období deponovať veľké množstvo živín do svojej biomasy, čím sú rastliny v podraze ukrátené o množstvo svetla [19]. Za takéto byliny možno

považovať taxóny *Urtica dioica* alebo *Epilobium angustifolium* vytvárajúce spoločenstvá s jednou až pár dominantami (S – alebo C – stratégie), ktoré bránia uchyteniu ďalších druhov, často svetlomilným nízkym S – stratégom [20, 21].

Naopak, pasenie druhovú diverzitu v závislosti od intenzity výrazne zvyšuje [22, 23, 24, 25]. Spášaná vegetácia má tendenciu alokovať väčšie množstvo biomasy do rozmnožovacích orgánov (pasenie podporuje pohlavné rozmnožovanie a genetickú variabilitu), rozrušovaním vegetačného krytu rastie jeho heterogenita, a tak sa zjednodušujú podmienky pre kolonizáciu ďalšími druhmi [22, 23]. Kosenie taktiež podporuje druhovú diverzitu, ako dôsledok prístupu svetla do nižších vrstiev porastu [22], a znižuje množstvo dusíka v pôde [26].

Otázka kam smerujú druhotné spoločenstvá vyskytujúce sa v výške 1200 m n. m. v DSP má zdanlivo jednoduchú odpoveď. Potenciálnym klimaxom v tejto lokalite je les triedy *Picetea* [27] a nivné spoločenstvá triedy *Mulgedio-Aconitetea*. Či sa v týchto miestach prirodzená vegetácia rozvinie, je otázkou viacerých variabilných (sklon svahu, hĺbka pôdy, blízkosť prirodzeného vegetačného typu, čas, ako dlho lokalita leží úhorom, ľudské zásahy, snehové zosuvy, prípadne lavíny [28]). Dusík v pôde ako aj hrubá vrstva opadanky bránia uchyteniu sa propagúl pôvodných komunit alebo potenciálnej vegetácie. Je to jeden z najzávažnejších mechanizmov, ktoré bránia obnoveniu pôvodnej rastlinnej vegetácie – obmedzenie semien ujať sa a rásť. Vzhľadom na stabilitu sukcesných štádií, deponácie živín v opadanke atď., nemožno očakávať, že sekundárna sukcesia bude nevyhnutne viesť k prirodzenému potenciálnemu klimaxu [15].

Záver

Ku pôvodnému klimaxovému stupňu vegetácia v OŽ a LŽ vôbec nemusí dospieť. Keďže s časom hysterézne tendencie porastu stúpajú [29], regenerácia vyžaduje dodatočné opatrenia. Ak je v záujme človeka obnova prirodzeného porastu, bude nevyhnutné navrhnuť vhodný manažment na základe druhového zloženia, ktorý opätovne zmení aj kolobeh živín [22, 26, 30]. Druhou možnosťou a nie horšou, je ponechať sukcesii voľný priebeh a sledovať akým smerom sa bude vyvíjať sama príroda.

PodĎakovanie

Ďakujem Jozefovi Šibíkovi za komentovanie rukopisu, Silvii Bittnerovej za cenné rady s Turbovegom a môjmu manželovi za kontrolu.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Hadač E., Březina P., Ježek V., et al. (1969) Die Phlangengesellschaften des Tale "Dolina Siedmich prameňov" in der Balear Tatra. *Vegetácia ČSSR 2*, Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, Bratislava, p. 191
- [2] Šmarda J. (1963) Druhotné spoločenstvá rastlín v Tatranskom národnom parku. *Knižnica zborníka prác o Tatranskom národnom parku 4*, Šport, Bratislava, p. 127
- [3] Midriak J. (1994) Horná hranica lesa a jej ovplyvnenie človekom. In: Vološčuk I. (eds.) *Tatranský národný park. Biosférická rezervácia*. Gradus, Martin, p. 313
- [4] Zelina V. (1963) *Zborník TANAP 7*, p. 5
- [5] Šmarda J. (1971) K ekológii rastlinných spoločenstev Doliny Sedmi pramenů v Belanských Tatrách. *Práce a štúdie Československej ochrany prírody pri SÚPSOP v Bratislave 4*, *Príroda*, Bratislava, p. 121
- [6] Braun-Blanquet J. (1964) *Phlangezsoziologie: Grundzüge der vegetationskunde*. 3. ed., Springer-Verlag, Wien, p. 20
- [7] Tichý L. (2002) *J. Veg. Sci.* 13, p. 451
- [8] Podani J. (1993) SYN-TAX-pc. Computer programs for multivariate data analysis in ecology and systematics. Ver. 5,0., Scientia publ. , p. 5
- [9] Hegedúšová K., Ružičková H. (2007) *Polygono bistortae-Trisetion flavescens Br.-Bl. et Tüxen ex Marshall 1947*. In: Janišová M. (eds.) *Travninobylinná vegetácia Slovenska – elektronický expertný systém na identifikáciu syntaxónov*. Botanický ústav SAV, Bratislava, p. 118
- [10] Jarolímek I., Zaliberová M., Mucina L., et al. (1997) *Rastlinné spoločenstvá Slovenska. 2. Synantropná vegetácia 2*, Veda, Bratislava, p. 339
- [11] Marhold K., Hindák F., eds. *Zoznam nižších a vyšších rastlín Slovenska*. 1998, Veda, Bratislava, 687
- [12] Hadač E. (1981) Konferencia k 30. výročiu uzákonenia Tatranského národného parku, *Zborník referátov z konferencie k 30. výročiu uzákonenia Tatranského národného parku, Zmeny vegetace v Dolině Siedmich prameňov v Belianskych Tatrách sa minulých 20 let*, Tatranská Lomnica, SR, p. 256
- [13] Domin K. (1926) *Tatranské obrazy*, J. Otto, Praha, p. 105
- [14] Midriak R. (1983) *Morfogenéza povrchu vysokých pohorí*, Bratislava, p. 287
- [15] Höchtl F., Lehtinger S., Konold W. (2005) *Landscape Urban Plan.* 70, p. 85

- [16] Peter M., Edwards P.J., Jeanneret P., Kampmann D., et al. (2008) *Agric. Ecosyst. Environ.* 125(1- 4), p. 204
- [17] Lukniš M. (1973) *Zborník TANAP* 15, p. 89
- [18] Greig-Smith P. (1948) *J. ecol.* 36(2), p. 339
- [19] Hautier Y., Niklaus P.A., Hector A. (2009) *Science* 324(5927), p. 636
- [20] Marini L., Scotton M., Klimek S., et al. (2007) *Agric. Ecosyst. Environ.* 119, p. 281
- [21] Tasser E., Tappeiner U. (2002) *Appl. Veg. Sci.* 5(2), p. 173
- [22] Fischer M., Rudmann-Maurer K., Weyand A., et al. (2008) *Mt. Res. Dev.* 28(2), p. 148
- [23] Wu G.-L., Li W., Li X.-P., et al. (2011) *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 206(3), p. 241
- [24] Komac B., Alados C., Bueno C., et al. (2011) *Plant Ecol.* 212(3), p. 519
- [25] Spiegelberger T., Matthies D., Müller-Schärer H., et al. (2006) *Ecography* 29, p. 541
- [26] Robson T.M., Baptist F., Clément J.-C., et al. (2010) *J. Ecol.* 98(1), p. 62
- [27] Maglocký Š. (2002) *Potenciálna prirodzená vegetácia. Atlas krajiny Slovenskej republiky.* Ministerstvo životného prostredia Bratislava, Agentúra životného prostredia, Banská Bystrica
- [28] Tasser E., Walde J., Tappeiner U., et al. (2007) *Agric. Ecosyst. Environ.* 118, p. 115
- [29] Clark C.M., Tilman D. (2010) *Ecology* 91(12), p. 3620
- [30] Dullinger S., Dirnböck T., Greimler J., et al. (2003) *J. Veg. Sci.* 14(2), p. 243

Změny společenstev fyto bentosu řeky Dřevnice – hodnocení ekologického stavu v prostoru a čase

Magdaléna Šafářová, Bohuslav Uher, Barbora Chattová

Masarykova univerzita, Ústav botaniky a zoologie, Terezy Novákové 62, 621 00, Brno-Řečkovice, Česká republika, 375958@mail.muni.cz

Abstract

The study deals with a biological evaluation of water quality of the Dřevnice River (Eastern Moravia) by a community of cyanobacteria and algae which are tied to the bottom substrate (e.g. mud, sand, stones). Phytobenthos, as this file of benthic autotrophic organisms is called, has a significant position among bioindicators of water quality for the ability to reflect environmental changes in a short time. The work consisted in monitoring changes in diversity of phytobenthos community and measurement of physicochemical parameters within one year. The aim was to find relations between the organisms and parameters and to determinate the current ecological status of the river.

Klíčová slova: *Fytobentos, biomonitring, sinice, řasy, rozsivky, abundance.*

Úvod a formulace cíle

Voda je životodárným bohatstvím pro všechny organismy na naší planetě. Poskytuje přirozené podmínky pro řadu ekosystémů a regulaci klimatu [1]. Přesto, že si vědecká i veřejná společnost stále více uvědomuje potřebu ochrany všech typů vodních habitatů, vliv člověka na jejich degradaci se stále prohlubuje. Největší globální problém spočívá v rychlém a setrávajícím růstu lidské populace a s tím související změny klimatu, rozšiřování měst, vodohospodářské změny v krajině a v neposlední řadě nadměrné využívání vodních zdrojů a zhoršování jejich kvality [2].

Chemické a fyzikální parametry se při monitorování znečištění vod standardně používají již řadu let. Po celé Evropě i mimo ni se postupně rozšířil i biomonitring. Je založen na hodnocení vztahů mezi biologickými funkcemi a celkovým chemickým stavem, reakcí jednotlivých druhů na určité živiny a znečišťující látky apod. [3]. Jedním ze základních biologických společenstev využívaných k posouzení kvality vod v řekách je fyto bentos [4].

Fyto bentos je soubor autotrofních organismů (řas a sinic), vláknitých hub a bakterií, které žijí na dně a jsou nějakým způsobem asociovány s dnovým substrátem [5]. Díky svým nárokům na živiny a bazálnímu postavení v potravní pyramidě a tedy i primární produkci, jsou bentické sinice a řasy schopny poskytovat jedinečné informace o ekologickém stavu prostředí (zejména eutrofizaci) v porovnání s jinými indikátory z řad heterotrofů [6]. Nejvíce jsou z této skupiny využívány jednobuněčné eukaryotické řasy rozsivky (Bacillariophyceae)

jako dominující složka s výbornou schopností indikace acidifikace, organického znečištění, eutrofizace i klimatických změn [7]. Mezi další zástupce společenstva fyto-bentosu patří prokaryotické sinice (Cyanobacteria), zelené řasy (Chlorophyta) a v menší míře ruduchy (Rhodophyta) [8].

Aby bylo možné pečovat o vodní zdroje na národní i mezinárodní úrovni, vstoupila po mnohaletých přípravách v platnost Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/60/EC ustavující rámec pro činnost Společenství v oblasti vodní politiky. Jako objektivní kritérium pro stanovení míry zhoršení kvality vody oproti předpokládanému přirozenému je touto Směrnicí uznáván mimo jiné právě biomonitoring na základě fyto-bentosu [9].

Cílem práce je sledování změn v diverzně bentických sinic a řas na řece Dřevnici v prostoru a čase, zjistit, zda tyto změny souvisí s některými měřenými parametry prostředí a stanovit aktuální ekologický stav toku.

Materiál a metody

Řeka Dřevnice protéká Zlínským krajem, který se nachází ve východní až jihovýchodní části České republiky. Je to levostranný přítok řeky Moravy, pramenící na jihu Hostýnských vrchů. Její délka činí 42,3 km a plocha 434,6 km².

Pro odběr vzorků bylo na řece zvoleno celkem pět odběrových stanovišť – pramen, před první zástavbou (horní tok), v první obci Držková, pod vodní nádrží Slušovice a v centru Zlína. Odběry a měření fyzikálně – chemických parametrů (konduktivita, teplota, salinita) probíhaly pravidelně každý měsíc od listopadu 2011 do října 2012.

Na každé lokalitě byly měřeny a zaznamenány fyzikálně – chemické parametry. Nárosty sinic a řas byly seškrabovány do fotografické misky s říční vodou pomocí skalpelu ze 4-5 větších kamenů. Z misky se přelil homogenizovaný vzorek do dvou uzavíratelných PET vzorkovnic, které byly v chladicí nádobě transportovány a do 48 hodin zpracovány v laboratoři.

Nejprve bylo provedeno základní posouzení o stavu všech organismů v nativních preparátech pod světelným mikroskopem a byla pořízena fotodokumentace pomocí programu NIS-Elements AR 2.30 CZ. Poté byly vzorky konzervovány Lugolovým roztokem. Pro zjišťování abundancí byla použita počítačící komůrka typu Cyrus I., přičemž byly determinovány sinice, zelené řasy a ruduchy na úroveň rodu. Druhy rozsivek byly určovány na základě zhotovených trvalých preparátů.

Všechna data získaná determinací a kvantifikací z nativního, resp. fixovaného materiálu spolu s naměřenými hodnotami parametrů prostředí byla zpracována pomocí programu Canoco for Windows 4.5 a korelací v programu R [10, 11].

Informace o druhovém složení rozsivek a jejich četnostech zjištěných z trvalých preparátů budou vyhodnocena v programu Omnidia. Jedná se o francouzský komerčně dostupný software, vyvinutý speciálně pro počítání 17 rozsivkových indexů [12].

Výsledky a diskuse

První odběrová lokalita - pramen vykazovala téměř nulové zastoupení organismů. Pro tuto skutečnost nebyla zařazena do statistického vyhodnocování. Na druhé lokalitě – horní tok dominovaly z hlediska abundance sinice, hlavně *Phormidium* sp. (Obr. 1a), *Leptolyngbya* cf. *nostocorum* a *Pseudanabaena* sp. Nejvíce jich bylo v lednu a poté v dubnu. Ve většině vzorků byla nalezena také ruducha rodu *Audouinella* (jediný zástupce ruduch ze všech lokalit). Zelené řasy zde nebyly nalezeny vůbec.

Stanoviště Držková bylo početně i druhově nejvíce zastoupeno rozsivkami a to hlavně v měsících srpen – listopad. Jednalo se zejména o *Achnanthydium minutissimum* (64-151 jedinců na 400 valv v preparátu), *Cocconeis pediculus* (45-116 jedinců na 400 valv v preparátu) a *Cocconeis placentula* (17-79 jedinců na 400 valv v preparátu, Obr. 1d). Druhou nejpočetnější skupinou byly zelené řasy, především *Cladophora glomerata* (Obr. 1c), *Oedogonium* sp. nebo *Desmodesmus* sp. Vyskytovaly se hojně po většinu roku s výjimkou března. Největší peak dosahovaly v červnu a červenci. Sinice se objevily ve větší míře v srpnu, nejčastěji *Heteroleibleinia* sp., *Leptolyngbya* sp. a *Leptolyngbya* cf. *nostocorum*.

Slušovice měly značnou převahu rozsivek, například *Amphora pediculus* (23-147 jedinců na 400 valv v preparátu, Obr. 1b), *Cocconeis placentula* (1-138 jedinců na 400 valv v preparátu), *Rhoicosphenia abbreviata* (2-68 jedinců na 400 valv v preparátu), a to zejména na jaře. Od června do září byly hojné i zelené řasy, z nichž opět dominovaly nárosty řasy *Cladophora glomerata*. Sinice byly zastoupeny rody jako *Heteroleibleinia* sp., *Leptolyngbya* sp., *Leptolyngbya* cf. *nostocorum* a *Phormidium* sp. V porovnání se všemi odběrovými místy se zde nečetněji vyskytovala ruducha *Audouinella* sp.

V centru Zlína byla největší diverzita zelených řas ze všech lokalit – např. *Cladophora glomerata*, *Closterium* cf. *litorale*, *Oedogonium* sp., *Cosmarium* sp., *Spirogyra* sp., *Pediastrum* sp. Z hlediska abundancí dominovaly opět rozsivky. Zejména v dubnu a říjnu to byla opět *Amphora pediculus*, dále *Fragilaria construens* nebo *Navicula gregaria*. Sinice se objevily také hlavně v říjnu (např. *Phormidium* sp.).



Obr. 1 Dominantní taxony: a) *Phormidium* sp. (přibližná šířka vlákna 5,2 μm), b) *Amphora pediculus* (11 x 6 μm), c) *Cladophora glomerata* (přibližná šířka vlákna 45 μm), d) *Cocconeis placentula* (20,4 x 15,8 μm)

Pro korelační analýzu byl použit neparametrický Spearmanův korelační koeficient založený na pořadí hodnot sledovaných veličin. Z výsledků vyplývá, že sinice jsou významně ovlivněny konduktivitou a teplotou na lokalitě horní tok. Korelace je zde negativní, tedy čím vyšší konduktivita/teplota, tím nižší abundance. Naopak na lokalitě Držková sinicím prospívá spíše vyšší konduktivita a ve Slušovicích vyšší teplota. U zelených řas byla zjištěna průkazná pozitivní korelace ke konduktivitě na lokalitě Slušovice a k teplotě ve Zlíně. Jejich vztah k teplotě na lokalitě Držková je těsně neprůkazný. Podobně je na tom vztah rozsivek ke konduktivitě. V ostatních případech nemohla být nulová hypotéza zamítnuta, tedy neexistuje žádný signifikantní vztah.

Závěr

Pravidelnými měsíčními odběry vzorků byla získána kvalitní data pro hodnocení diverzity společenstev fytoENTOSU a jejich změn v průběhu celého roku. Zjištěné abundance byly porovnávány s měřenými parametry prostředí za účelem nalezení vzájemných vztahů.

Celkově bylo zaznamenáno 10 rodů sinic, 16 rodů řas, 1 rod ruduch a 67 druhů rozsivek. Závislost výskytu a početnosti jednotlivých skupin na měřených fyzikálně – chemických parametrech se potvrdila jen v několika málo případech.

Poděkování

Chtěla bych poděkovat Mgr. Barboře Chattové za cenné rady a ochotu kdykoli pomoci, Mgr. Rodanu Geriši za vysvětlení práce s programem Omnidia, Mgr. Kateřině Kintrové, Ph.D. za pomoc se statistickým zpracováním dat a v neposlední řadě své rodině a příteli za psychickou podporu a lásku.

Seznam použité literatury

- [1] Říha J. (1989) Voda a společnost. SNTL Nakladatelství technické literatury, Praha, p. 14
- [2] Adámek Z., Helešic J., Maršálek B., et al. (2010) Aplikovaná hydrobiologie. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, p. 21
- [3] Whitton B. A., Rott E., Friedrich G. (1991) Use of Algae for Monitoring Rivers. Universitat Innsbruck, Innsbruck, p. 196
- [4] Chave P. (2001) The EU Water Framework Directive, An Introduction. IWA Publishing, London, p. 14
- [5] Rott E., Pipp E., Pfister P. (2003) *Algol. Stud.* 110, p. 91
- [6] McCormick P. V., Cairns J. Jr. (1994) *J. Appl. Phycol.* 6, p. 509
- [7] Van Dam H., Mertens A., Sinkeldam J. (1994) *Nether. J. Aquat. Ecol.* 28, p. 117
- [8] Poulíčková A., Jurčák J. (2001) Malý obrazový atlas našich sinic a řas. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, p. 13
- [9] Ministerstvo životního prostředí (2004) Implementace Rámcové Rámcové směrnice EU pro vodní politiku v České republice. Ministerstvo životního prostředí odbor ochrany vod, Praha, p. 4.

- [10] Ter Braack C. J. F., Šmilauer P. (2002) CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide. Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Biometris, Wageningen & České Budějovice, p. 55.
- [11] R Development Core Team (2012) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, p. 8
- [12] Lecointe C., Coste M., Prygiel J., et al. (1999) Cryptogam. *Algol.* 20, 132

Testovanie účinku nízko-teplotnej plazmy na DNA v jadrách *Pisum sativum* L. pomocou *Comet assay*

Simona Saksonová¹, Tibor Stolárik², Stanislav Kyzek¹, Eliška Gálová¹, Mária Henselová²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, sim.saksonova@gmail.com

²Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyziológie rastlín, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

Abstrakt

There is an effort to evaluate the effect of low-temperature plasma on seed germination and plant growth in order to applicate it on improvement of these processes and use it as a disinfectant and antimicrobial agent in the last years. Based on the activity of antioxidant enzymes, oxidation effects of low-temperature plasma have been demonstrated on the experiments with a low-temperature treated seeds of *Pisum sativum* L. Oxidative stress can cause damage at the level of biomolecules, including DNA. Specific DNA damage can be determined on the nuclei released from cells by Comet assay method. Comet assay (single-cell gel electrophoresis) is an effective method applied on the detection of the potential genotoxic effects of a wide range of agents, in this case, low temperature plasma.

KLúčové slová: nízko-teplotná plazma; oxidačný stres; *Pisum sativum* L.; DNA; Comet assay

Úvod a formulácia cieľa

Na kvalitu a bezpečnosť potravín je v súčasnosti kladený zvýšený dôraz, hlavne z hľadiska mikrobiálnej kontaminácie. Zaujímavé sú nízko-teplotné inovačné techniky, ktoré minimálne narušujú nutričné vlastnosti potravín [1]. Využitie nízko-teplotnej plazmy (NTP) je dnes známe v biológii aj v biomedicíne [2], pretože jej účinkom dochádza k inaktivácii mikroorganizmov už pri izbovej, alebo mierne zvýšenej teplote a to v krátkych časoch expozície [1].

Plazmu tvorí čiastočne alebo úplne ionizovaný plyn s neutrálnym nábojom a často je opisovaná ako štvrté skupenstvo hmoty. Neutrálny plyn môže byť premenený na plazmu pri použití energie elektrického alebo magnetického poľa, či mikrovlnných frekvencií. Dôsledkom je zvýšenie kinetickej energie elektrónov v atómoch plynu. Následne dochádza ku kaskáde kolízií v plyne, ktorá vedie k tvorbe plazmových produktov v podobe elektrónov, iónov, radikálov a žiarenia rôznych vlnových dĺžok. Ióny voľných radikálov a vysoko reaktívne formy medziproduktov sú hlavné súčasti chemického a fyzikálneho zloženia NTP [1].

Mnohé doterajšie štúdie boli zamerané práve na ošetrovanie semien poľnohospodárskych plodín plazmou [3] [4]. Vychádzali sme z experimentov uverejnených v [5], v ktorých autori overovali účinky NTP na aktivitu antioxidantných enzýmov (SOD, G-POX, KAT) v

klíčencoch hrachu siateho, ako aj vplyv plazmy na úrodu tejto plodiny v poľných podmienkach. Stanovené zmeny v aktivite spomínaných antioxidačných enzýmov potvrdili, že reaktívne prostredie NTP indukuje v rastlinách hrachu oxidačný stres. Negatívny vplyv oxidačného stresu sa však neprejavil na úrode tejto plodiny, naopak NTP v optimálnej aplikačnej dávke pozitívne ovplyvňovala úrodotvorné parametre hrachu siateho [5].

Nie je známych mnoho prác, ktoré by sa venovali štúdiu potenciálnych genotoxických účinkov plazmy u rastlinných buniek. Napríklad boli pozorované genetické efekty nízkotepelnej plazmy, ktorou boli ošetrované biomateriály v podobe DNA plazmidov a oligonukleotidov. Podľa výsledkov tejto štúdie, najpravdepodobnejšie faktory, ktoré spôsobujú zlomy v plazmidovej DNA sú chemicky aktívne formy a UV radiácia plazmy. Takisto ošetrovanie oligonukleotidov plazmou indukovalo lámanie oligonukleotidových reťazcov na malé fragmenty [6]. Na základe týchto pozorovaní sme sa rozhodli otestovať potenciálnu mieru poškodenia DNA v bunkách *P. sativum* L. po ošetrovaní NTP v porovnaní s hodnotami poškodenia v jadrách buniek neovplyvnených jedincov. Vychádzali sme z predpokladu, že ak dochádza vo zvýšenej miere k produkcii voľných radikálov a teda oxidačnému stresu v rastlinách, zvýši sa aj poškodenie DNA. Množstvo genotoxického účinku, ktoré sa premietne v podobe percenta poškodenia DNA však závisí aj od aktivity antioxidačných enzýmov a reparačných procesov, ktorými bunky reagujú na zvýšený stres. V našej práci sme sa zamerali na porovnanie potenciálneho genotoxického poškodenia v jadrách parentálnej a F1 generácie, z hľadiska posúdenia možného efektu plazmy v generácii vzniknutej krížením ošetrovaných jedincov.

Materiál a metódy

Kultivácia a podmienky ošetrovania hrachu siateho nízkotepelnou plazmou

Na sledovanie poškodenia DNA v jadrách buniek sme použili klíčence *Pisum sativum* (L.) odroda Prophet. Semená sa najprv opracovali plazmou generovanou vo vzduchu pri atmosférickom tlaku s využitím difúzneho koplanárneho povrchového barierového výboja (*Diffuse Coplanar Surface Barrier Discharge* (DCSBD) [7]. Opracovanie semien NTP bolo realizované na Katedre experimentálnej fyziky FMFI UK v Bratislave. Semená 24 h po ošetrovaní NTP (nízkotepelnou plazmou) (expozičné dávky 120, 600 a 1200 s), ako aj kontrolné neošetrované sme 6 hodín imbibovali (príjem vody do semien za účelom indukcie klíčenia) v odstátej vode a následne vysiali na Petriho misky s filtračným papierom navlhčeným odstátou vodou. Kultivácia prebiehala 3 – 4 dni v tme pri 24 °C.

Materiál na Comet assay

- Agaróza: 1% NMP (*normal melting point*) v dH₂O
1% LMP (*low melting point*) v 1x PBS
- 0,4 M Tris – HCl (pH 7,5)
- 20 x PBS tlmivý roztok (zložený z KH₂PO₄, Na₂HPO₄ · 2 H₂O, KCl, NaCl, dH₂O)
- 1x PBS tlmivý roztok
- Elektroforetický tlmivý roztok (pH 13) (zložený z NaOH, EDTA a dH₂O)
- 1% Etídium bromid (EtBr, dH₂O)
- 400 μM Peroxid vodíka (H₂O₂)

Princíp *Comet assay*

Technika mikrogélovej elektroforézy, *Comet assay*, sa dnes používa ako štandardná metóda na určenie DNA poškodenia v eukaryotických bunkách. Alkalický variant, ktorý sme zvolili v našej práci, umožňuje kvantitatívne určenie DNA poškodenia, čo sa týka jednovláknových aj dvojavláknových zlomov, apurínových a apirimidínových miest, nekompletne zreparovaných miest a DNA krížových väzieb [8]. Bunky zbavené bunkových stien sú ukotvené pomocou agarózy na mikroskopické sklíčka a pomocou elektroforézy s vysokým pH putuje DNA z jadier smerom k anóde. V prípade, že je uvoľnená DNA poškodená, jej migrácia z jadier pri pozorovaní fluorescenčným mikroskopom sa javí v podobe štruktúry kométy [9].

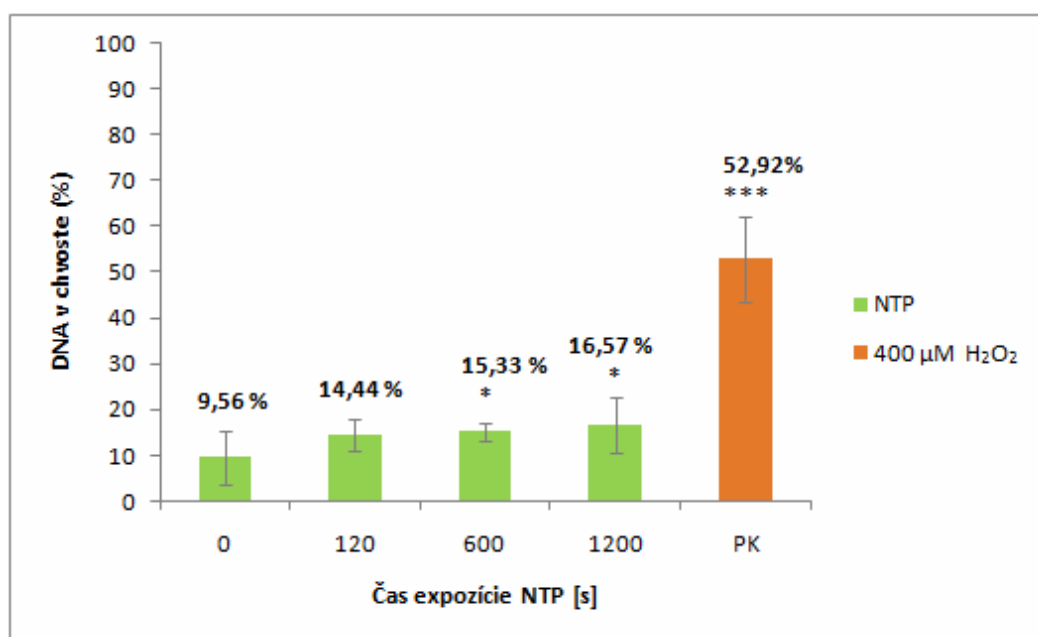
V práci sme využili kroky postupu metódy alkalickéj celulárnej *Comet assay* podľa [10]. Touto metódou sme testovali potenciálne genotoxické poškodenie DNA u semien ošetrovaných NTP v expozičných časoch 120, 600 a 1200 s. Ako negatívnu kontrolu sme použili neošetrené a ako pozitívnu kontrolu klíčence, ktoré boli pred použitím metódy ponorené v 10 ml 400 μM H₂O₂ po dobu 1 hod. Vopred sme si pripravili mikroskopické sklíčka ponorením do 96 % alkoholu na 24 hodín a opálením nad kahanom. Po ochladnutí sme sklíčka ponorili do 1 % roztoku agarózy s normálnou teplotou topenia a destilovanej vody. Takto pripravené sklíčka sme použili na ukotvenie izolovaných jadier z rastlinných buniek.

Pri rastlinných modeloch je dôležité mechanické rozrušenie bunkových stien pred izolovaním jadier z korieňkov klíčencov pomocou žiletky na ľade v 150 μl Tris-HCl tlmivého roztoku. 100 μl tejto suspenzie sme zmiešali so 100 μl 1% LMP agarózy s nízkou teplotou topenia a 1 x PBS. 100 μl sme potom odobrali a naniesli na agarózou potiahnuté podložné sklíčka. Sklíčka s jadrami ukotvenými v agaróze sme ponorili do vychladeného ELFO roztoku v elektroforetickom tanku a nechali sme ich odvíjať 8 minút. Tým sa uvoľnila superspiralizovaná DNA a následne sme spustili elektroforézu pri 25 V a 280-330 mA 15 minút pri 4-8 °C [10]. Po elektroforéze sme jadrá neutralizovali Tris-HCl a zafarbili

fluorescenčnou farbičkou etídium bromid (EtBr). Farbenie prebiehalo 5 minút a prebytok farbičky sme odstránili viacnásobným oplachovaním sklíčok v destilovanej vode. Poškodenie DNA v jadrách sme pozorovali fluorescenčným mikroskopom OLYMPUS BX 51 pri 200-násobnom zväčšení so zeleným excitačným filtrom UMWIG3, s použitím Color View Soft Imaging System Olympus U-CMAD3. Stupeň poškodenia DNA sme hodnotili programom *Comet visual*.

Výsledky a diskusia

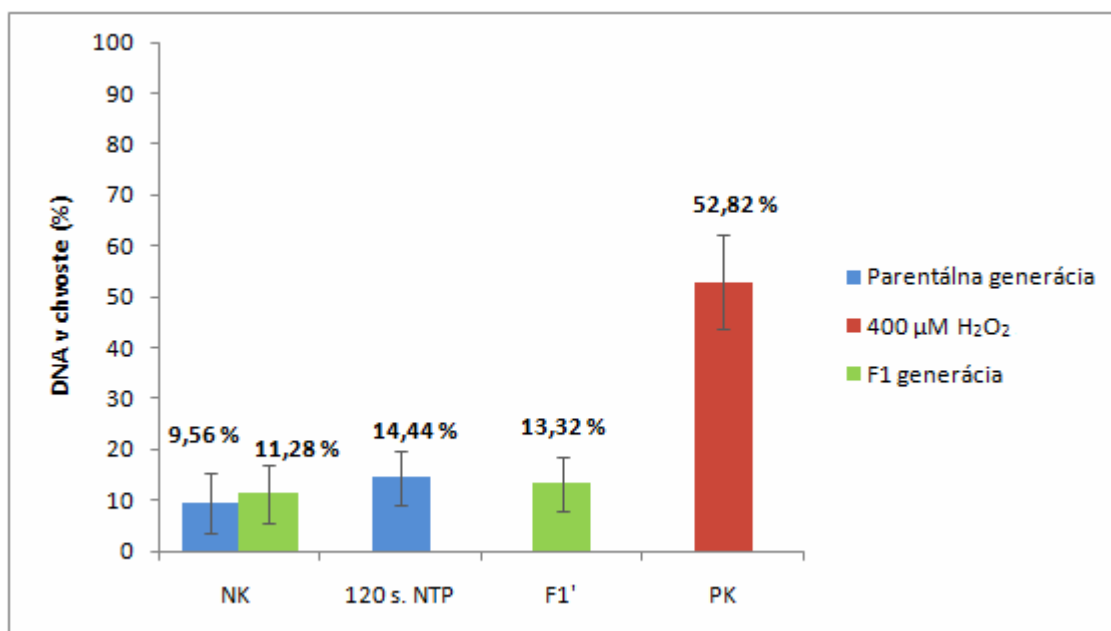
Metódou *Comet assay* sme sa snažili otestovať potenciálne genotoxické účinky rôzneho času expozície NTP na DNA rastlinných bunkách. Výsledky prezentované na grafe (Obr. 1) naznačujú, že v testovaných vzorkách klíčencov ovplyvnených stúpajúcim časom vystavenia NTP v porovnaní s negatívnou kontrolou (bez ovplyvnenia NTP – 0 s) dochádzalo k miernemu zvyšovaniu poškodenia DNA. Všetky tri varianty NTP ovplyvnených vzoriek



Obr. 1 Percento poškodenia DNA stanovené *Comet assay*. Os x: poškodenie DNA v jadrách semien hrachu ošetrených NTP – 0, 120, 600 a 1200 s; PK - pozitívna kontrola 400 μM H_2O_2 /1 hod

vykazovali dokonca podobné percentá poškodenia (do 20 %), čo sa na grafe nezobrazuje v signifikantnom zvýšení poškodenia v porovnaní s negatívnou kontrolou. Na rozdiel od pozitívnej kontroly (52,92 %) je percento poškodenia v sledovaných vzorkách nízke, z čoho usudzujeme, že je spôsobené oxidačným stresom indukovaným NTP, pričom bunky sú schopné sa s týmto poškodením vyrovnáť. To dokazujú aj stanovené podobné hodnoty

percenta poškodenia DNA v testovaných vzorkách hrachu pod vplyvom NTP i keď dochádzalo k zvýšeniu času expozície.



Obr. 2 Porovnanie percenta poškodenia DNA v parentálnej a F1 generácii stanoveného *Comet assay*. Os x: NK – negatívna kontrola bez ovplyvnenia NTP v parentálnej generácii a F1 generácii; 120 s - poškodenie DNA v jadrách semien ošetrených expozičným časom NTP – 120 s; F1' - F1 generácia vzniknutá krížením jedincov ovplyvnených 120 s. NTP; PK - pozitívna kontrola 400 µM H₂O₂/1 hod

V ďalšej sérii experimentov (obr. 2), sme porovnávali percento genotoxického poškodenia v jadrách klíčencov parentálnej a F1 generácii v neovplyvnených vzorkách i vo vzorkách ošetrených expozičným časom 120 s. Ako vidíme na obrázku 2, z celkového hľadiska sa poškodenia v jednotlivých vzorkách len minimálne líšili a boli nízke v porovnaní s pozitívnou kontrolou. Na základe našich dosiahnutých výsledkov môžeme konštatovať, že v F1 generácii rozdiel medzi neovplyvnenými vzorkami a vzorkami zo semien vzniknutých krížením ošetrených rastlín bol nižší než v parentálnej generácii. Dokonca v F1 generácii bolo poškodenie spôsobené predpokladaným oxidačným účinkom NTP nižšie (pribl. o 1 %) než vo vzorkách rodičovskej generácie, ktorá bola priamo ošetrená NTP.

Záver

V práci sme vyhodnotili potenciálne genotoxické účinky rôzneho času expozície NTP v bunkách hrachu. Podľa doterajších štúdií má NTP nielen stimulačné účinky na klíčivosť semien, ale podľa našich výsledkov nespôsobuje v porovnaní s neošetrenými semenami

signifikantné zvýšenie poškodenia DNA v ošetrovaných semenách hrachu a to ani pri najvyššej expozičnej dávke plazmy 1200 sekúnd.

PodĎakovanie:

Táto práca bola finančne podporená grantmi VEGA č.1/0755/10 a 1/0025/11; SK-BG-0006-10; BGSK/206; TA č.02010412. Autori zároveň ďakujú doc. RNDr. Anne Zahoranovej, PhD za opracovanie semien hrachu NTP.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Wan J., Coventry J., Swiergon P., et al. (2009) Trends Food Sci. Tech. 20, p. 414
- [2] Šerá B., Straňák V., Šerý M., et al. (2008) Plasma. Sci. Technol. 10(4), p. 506
- [3] Dhayal M., Lee S. Y., Park S. U. (2006) Vacuum. 80, p. 499
- [4] Volin J. C., Denes F. S., Young R. A., et al. (2000) Crop Sci. 40, p. 1706
- [5] Stolárik T., Henselová M., Slovákova L., et al. (2013) Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2013 (recenzovaný sborník příspěvků) Influence of abiotic and biotic stresses on properties of plants 2013 (Proceedings), Praha, ČR p. 226
- [6] Li G., Li H. P., Wang L. Y., et al. (2008) Appl Phys Lett. 92, p. 221504
- [7] Černák M., Černáková L., Hudec I., et al. (2009) Eur. Phys. J. Appl. Phys. 47(22806) p. 1
- [8] Tice R. R., Agurell E., Anderson D., et al. (2000) Environ. Mol. Mutagen. 35, p. 206
- [9] Collins A. R. (2004) Mol Biotechnol. 26, p. 249
- [10] Gichner T. (2008) Mutat. Res. 652, p. 186

Baktérie prítomné pri výrobe vína v Malokarpatskej vinohradníckej oblasti

Balázs Sallay¹, Zuzana Godálová²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta v Bratislave, Katedra mikrobiológie a virilógie, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika; sallay.balazs@vnet.sk

²Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Microorganisms are playing in the wine making processes a key role. They convert the grape juice (must), to a popular alcoholic beverage, wine. The most important microorganisms in the winemaking processes, responsible for the alcoholic fermentation, are yeasts. From the wines quality point of view is the presence of bacteria very important. Bacteria are able to improve or impair the organoleptic properties of wine, in dependence of the bacterial microflora composition. Therefore the fast identification of bacterial microflora involved in wine making can be for the winemakers very important for finding the right method of production. Cultivation methods of identification are very time-consuming. Therefore it is more preferred to use non-cultivation methods for identification of bacteria, which are using technics of molecular biology. We have used for detection the ITS (Internal Transcribed Spacer) region between the genes for 16S rRNA and 23S rRNA.

Kľúčové slová: ITS (Internal Transcribed Spacer), ITS-PCR (Internal Transcribed Spacer Polymerase Chain Reaction), bakteriálna mikroflóra (bacterial microflora), senzorické vlastnosti (organoleptic properties)

Úvod a formulácia cieľa

Baktérie môžu zhoršiť alebo zlepšiť senzorické vlastnosti a kvalitu vína. Môžu spôsobiť rôzne choroby vína, ako napríklad myšina, horknutie vína, octovanie vína, manitové kvasenie a maslové kvasenie. Na druhej strane môžu aj zlepšovať kvalitu vína, napríklad znížením kyslosti, alebo prispievajúc k tvorbe výslednej chuti či vône vína [1]. Octové baktérie sú pri výrobe vína nežiadúce. Oxidáciou etanolu tvoria kyselinu octovú a acetaldehyd [2]. Môžu vytvárať etyl acetát, ktorý má prenikavú vôňu pripomínajúcu odlakovač nechtov [3]. Mliečne baktérie môžu mať naopak pozitívny účinok. Patria do rodov *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* a *Pediococcus*. Pomocou jablčno-mliečneho kvasenia sú schopné premeniť kyselinu jablčnú na kyselinu mliečnu, čím sa víno stáva senzoricky menej kyslou [4].

Identifikácia baktérií použitím ITS-PCR (Internal Transcribed Spacer Polymerase Chain Reaction) bola úspešne použitá pri analýze baktérií izolovaných z vonkajšieho prostredia [5]. Táto analýza vyžaduje izoláciu DNA, molekulárnu selekciu a amplifikáciu bakteriálnych ITS fragmentov pomocou PCR [6]. Fragменты ITS sa dajú pomocou PCR ľahko amplifikovať a následne aj sekvenovať, lebo je možné pre nich vytvoriť univerzálne primery pomocou konzervovaných oblastí v génoch pre rRNA. Región ITS je

súčasťou transkripčnej jednotky génu pre rRNA, ale počas posttranskripčných úprav sa vyštiepi, a nezabudováva sa do maturovaného ribozómu [7].

Materiál a metódy

Pracovali sme so vzorkami z výroby vína z odrody Veltlínske zelené (Stredná odborná škola vinársko-ovocinárska v Modre). DNA z bobúľ a muštu sme izolovali pomocou DNeasy tissue kit (Qiagen, Hieden, Nemecko). Vzorky z muštu sme pred izoláciou prefiltrovali cez filter o veľkosti pórov 6µm (Membrane filter, Advantec). Z izolovanej DNA sme pomocou PCR (Polymerase Chain Reaction) naamplifikovali ITS oblasť medzi génmi pre 16S rRNA a 23S rRNA. Reakcia prebiehala v objeme 50 µl a obsahovala 1x Cheetah reakčný pufor (Biotium, Hayward, CA, USA), 4 mmol.l-1 MgCl₂ (Biotium), 0.2 mmol.l-1 dNTP, 500 nmol.l-1 primerov (G17/ 5'gtgaagtcgtaacaagg 3', G+-R/ 5'cgctcttcacgscct), 2 U Cheetah Hot Star Taq DNA polymerázu (Biotium) a 1.5 µl.DNA. PCR bola uskutočnená v cykléri AB Veriti 96 (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA) s teplotným programom: úvodná denaturácia 95 °C 5 min., 35 cyklov: denaturácia 94 °C 1 min., anelácia 50 °C 30 s., polymerizácia 72 °C 1 min. a záverečná polymerizácia 72 °C 5 min. Fragmentsy sme vizualizovali pomocou eketroforézy v agarózovom géli (2 %, GelRed farbička) alebo pomocou kapilárnej elektroforézy na prístroji QIAxcel (Qiagen). Najvýraznejšie amlikóny boli z agarózového gélu vyrezané a prečistené QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen). Následne sme fragmenty klonovali prostredníctvom PCR Cloning kitu (Qiagen) do vektora pDrive Cloning vector a transformovali do kompetentných buniek E.coli DH5alfa pripravených pomocou roztoku CaCl₂. Zvolili sme pozitívnu selekciu klonov na prítomnosť kanamycínovej rezistencie, a neutrálnu selekciu pre prítomný lac Z gén. Baktérie s inzertom sme preočkovali na LB pôdu s kanamycínom (100 µg/µl) a po narastení kolónií sme overovali prítomnosť vnesenej DNA prostredníctvom polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) orientovanej na pDrive vector v objeme 20 µl: 1x Cheetah reakčný pufor (Biotium), 2.25 mmol.l-1 MgCl₂ (Biotium), 0.2 mmol.l-1 dNTP, 500 nmol.l-1 primerov (M13F40 5'gtttccagtcacgac 3', M13R 5'aacagctatgaccatg 3'), 2 U Cheetah Hot Star Taq DNA polymerázu (Biotium) a odpichnutá kolónia. Reakcia sa uskutočnila na cykléri AB Veriti 96 (Applied Biosystems) v teplotnom programe: úvodná denaturácia 95 °C 5 min., 35 cyklov: denaturácia 94 °C 2 min., anelácia 58 °C 30 s., polymerizácia 72 °C 1 min. a záverečná polymerizácia 72 °C 5 min. PCR reakčnú zmes sme prečistili QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) a dali sekvenovať. Získané sekvencie sme vyhodnotili prostredníctvom databázy

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Výsledky a diskusia

Pre detekciu baktérií bez kultivačnej analýzy bolo potrebné získať kvalitnú DNA, čo sa nám podarilo pomocou extrakčného kitu DNeasy tissue kit (Qiagen). Mušt sme pred extrakciou DNA prefiltrovali cez filter o veľkosti pórov 6 μm (Membrane filter, Advantec). Z vyextrahovanej DNA bola pomocou PCR naaplikovaná medzerníková oblasť ITS medzi génmi pre 16S rRNA a 23S rRNA. Získané sekvencie sme vyhodnotili v databáze BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Tab. 1).

Tab. 1 Identifikácia baktérií prostredníctvom ITS oblasti

Vzorka (Veltlín Zelený)	Zhoda % pre amplikón bez primerov a s úpravou mnohoznačených báz	Veľkosť amplikónu (bp)
Bobule	Gluconobacter kondonii (99 %) Gluconobacter cerinus (99 %)	762 bp
	Klebsiella pneumoniae (81 %) Salmonella enterica (80 %)	595 bp
	Klebsiella pneumoniae (81 %) Salmonella enterica (80 %)	594 bp
	Enterobacter fergusonii (84%) Salmonella enterica (84%)	450 bp
	Enterobacter asburiae (87 %) Salmonella enterica (87 %)	434 bp
Mušt	Gluconobacter cerinus (98 %) Pseudomonas syringae (99 %)	762 bp
	Pseudomonas syringae (99 %) Pseudomonas syringae (99 %)	628 bp
	Leuconostoc pseudomesenteroides (99 %)	452 bp
	Haemophilus ducreyi (83 %)	575 bp
	Erwinia amylovora (89 %) Pantoea stewartii (88 %)	456 bp
	Klebsiella oxytoca (93 %) Pantoea sp. (87 %) Clostridium sp. (86 %)	452 bp
	Enterococcus silesiacus (93%)	353 bp
	Exiguobacterium sibiricum (99 %)	247 bp

PodĎakovanie

Dakujem všetkým ľuďom, ktorí mi pomohli dosiahnuť tieto výsledky.

Zoznam použitej literatúry

[1] Bratowsky E. J. (2009) Lett. Appl. Microbiol. 48, p. 149

- [2] Minárik E., Navara A. (1986) *Príroda*, Bratislava, SR, p. 484
- [3] Francis I. L., Newton J. L. (2005) *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, p. 114
- [4] Marques A. P., Zé-Zé L., San-Ramao M. V., et al. (2010) *Int. J. Food Microbiol.* 142, p. 251
- [5] Pangallo D., Chovanová K., Drahovská H., et al. (2009) *Int Biodet. Biodeg.* 63, p. 868
- [6] Chovanová K., Kraková L., Ženišová K., et al. (2011) *Lett. Appl. Microbiol.* 53, p. 231
- [7] Baldwin B. G., Sanders M. J., Porter J. M., et al. (1995) *Ann. M. Bot. Gard.* 82, p. 247

Comparison of the oral and intraperitoneal routes of infection with coxsackievirus B3 using recombinant virus vector

Soňa Šarmírová¹, Darina Štípalová¹, Jana Precechtelová¹, Mária Borsányiová¹, Pavol Gomolčák², Shubhada Bopegamage¹

¹*Slovak Medical University, Faculty of Medicine, Institute of Microbiology, Department of Virology, Limbová 12, 833 03 Bratislava, Slovak Republic, sona.sarmirova@szu.sk*

²*Cytopathos s.r.o., Limbová 5, 833 01 Bratislava, Slovak Republic*

Abstract

Human enteroviruses are encountered worldwide and are established as common causes of diverse and serious human diseases. Coxsackievirus B3 (CVB3), a member of the *Enterovirus* genus, is associated with a wide range of syndromes, including meningitis, febrile illness, myocarditis and chronic diseases like type 1 diabetes and chronic human myocarditis. Oral and intraperitoneal routes of experimental infection with CVB3, expressing an enhanced green fluorescence protein (eGFP) have been compared in the present study by detection of viral RNA in organ tissues of the infected mice. Our results indicated an earlier and fast dissemination of the virus in the intraperitoneally infected mice as compared to the orally infected group.

Keywords: *Coxsackievirus B3; enhanced green fluorescence protein; oral and intraperitoneal infection*

Introduction and formulation of aim

Group B coxsackieviruses (CVBs) belong to the family *Picornaviridae* and the genus *Enterovirus* [1]. Coxsackievirus infections often display a subclinical course or may lead to only mild diseases, but also they have been associated with severe life-threatening diseases [2]. Coxsackievirus B3 (CVB3) is more known as an aetiological agent of inflammatory heart diseases and is implicated in the pathogenesis of sub-acute, acute and chronic human myocarditis [3, 4]. CVB3 may cause cardiac arrhythmias and acute heart failure and chronic form of viral myocarditis may lead to dilated cardiomyopathy which contributes to about 50 % of the indications for heart transplantation [5, 6].

Recombinant CVB3 expresses an enhanced green fluorescence protein (eGFP). eGFP was selected as the optimal marker protein because it is relatively small in size enabling its incorporation into recombinant CVB, the protein can be detected in thin, high-resolution sections of formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue or cryosections and it is relatively resistant to photo-bleaching [7, 8].

Understanding pathogenesis of coxsackieviruses, their dissemination *in vivo*, their transmission, role of host immune system, interaction between host and virus will be of use to

develop prevention and control measures to be taken for not only coxsackieviruses but also other human enteroviruses.

The aim of this study was to follow the spread of the virus after CVB oral and intraperitoneal infection using CVB3 recombinant virus during the 12 hours interval by studying the presence of viral RNA in the organs of the infected mice.

Materials and methods

Virus: Recombinant *Coxsackievirus B3* (CVB3) expressing the enhanced green fluorescence protein (eGFP). eGFP-CVB3 was obtained from Dr. Andreas Henke, Jena, Germany.

Mice: CD1 outbred mice.

Infection: 18 mice were orally and 9 mice were intraperitoneally inoculated with recombinant eGFP-CVB3 at a dose of 0.2×10^7 TCID₅₀/mL. Two uninfected mice served as controls.

Intervals/Collection time: 0 hours (h) - uninfected controls. Orally infected mice were dissected at selected intervals: 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h post infection (p.i.). Intraperitoneally infected mice were dissected at intervals: 2h, 6h and 12h p.i. Three mice were sacrificed at each interval.

Collected organs: Heart, pancreas, spleen, small intestine and brain were snap frozen and stored at -80°C.

RNA isolation: Total RNA from the organs was extracted with PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen) according to the supplier's manual for purifying total RNA from animal tissue.

Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction and Nested PCR: The details of the reverse transcription-PCR followed by nested PCR have been described previously [9]. For cDNA synthesis and amplification in a single tube the SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen) was used.

Results and discussion

Organs (heart, pancreas, spleen, small intestine and brain) were collected at 2 hour intervals and studied for the presence of viral RNA by RT-PCR and Nested PCR.

In the orally infected mice (Table 1) the virus appeared in the **small intestine** from 2h p.i., **pancreases** were negative till 12h p.i., in **spleen** the virus was observed from 8h p.i. and **brain** and **heart** showed absence of virus till 12h p.i. mice.

As seen in the table 2 in the intraperitoneally (i.p.) infected mice viral RNA was detected in the **hearts, pancreases, small intestines** and **brains** from 2h p.i., whereas in **spleen** the virus appeared between 4 – 6h p.i.

Uninfected controls were negative.

Tab. 1 Presence of viral RNA in organ tissues of orally infected mice

Orally infected mice					
Organ	Heart	Pancreas	Spleen	Small intestine	Brain
Hour p.i.					
2h p.i.	- 3/3	- 3/3	- 3/3	+ 1/3	- 3/3
4h p.i.	- 3/3	- 3/3	- 3/3	+ 3/3	- 3/3
6h p.i.	- 3/3	- 3/3	- 3/3	+ 3/3	- 3/3
8h p.i.	- 3/3	- 3/3	+ 2/3	+ 3/3	- 3/3
10h p.i.	- 3/3	- 3/3	+ 2/3	+ 3/3	- 3/3
12h p.i.	- 3/3	- 3/3	+ 3/3	+ 3/3	- 3/3

(+) positive, (-) negative, h p.i. – hour post infection

Tab. 2 Presence of viral RNA in organ tissues of intraperitoneally infected mice

Intraperitoneally infected mice					
Organ	Heart	Pancreas	Spleen	Small intestine	Brain
Hour p.i.					
2h p.i.	+ 2/3	+ 1/3	- 3/3	+ 3/3	+ 3/3
6h p.i.	+ 2/3	+ 2/3	+ 3/3	+ 3/3	+ 3/3
12h p.i.	+ 1/3	+ 3/3	+ 3/3	+ 3/3	+ 3/3

(+) positive, (-) negative, h p.i. – hour post infection

The primary route of enteroviral infection is fecal-oral. Initial site of replication is believed to be within oral lymph nodes and the gut. Virus is ingested and multiplies in the lymphoid tissue of the tonsil or in the small intestine and then the local lymph nodes, e.g. cervical and mesenteric. Viremia occurs rapidly, spreading virus to secondary sites of infection which are often involved in disease states such as heart, pancreas, the central nervous system or skeletal muscle [10]. Reduction in the virus occurs in case of oral infection on meeting the gut associated lymphoid tissue. The exact route of dissemination of the virus is not yet known.

Virus dissemination within the host may be an important consideration in predicting eventual pathogenesis in the host.

Conclusion

Almost in all organs of i.p. infected mice the virus was detected at 2h p.i. Orally infected mice were more protected from virus infection and the dissemination of the virus was slower than in the i.p. route of infection. Virus was observed at 2h p.i. only in small intestine. All other organs of the orally infected mice showed negativity for presence of virus at this early interval. In i.p. infected mice the virus spread was rapid. We conclude that the local intestinal immunity plays a role in protecting the mice from the rapid dissemination of the virus in the oral mode of infection.

Acknowledgments

We thank Dr. A. Henke from Jena, Germany for supplying eGFP-CVB3 and Prof. J. M. Galama from Nijmegen, the Netherlands for scientific discussions. This work was supported by grant Ministry of Health of the Slovak Republic 2007/03-RUVZ-01 and the Norwegian financial mechanism, Mechanism EEA and Slovak Government and the State Budget of the Slovak Republic (SK 0082). This article was created by the realisation of the project "Center of excellence of environmental health", ITMS No.24240120033, based on the supporting operational Research and development program financed from the European Regional Development Fund.

References

- [1] Reetoo K. N., Osman S. A., Illavia S. J., et al. (2000) *J. Gen. Virol.* 81, p. 2755
- [2] Dan M., Chantler J. K. (2005) *J. Virol.* 79(14), p. 9285
- [3] Henke A., Jarasch N., Martin U., et al. (2008) *Int. J. Med. Microbiol.* 298, p. 127
- [4] Fechner H., Pinkert S., Geisler A., et al. (2011) *Molecules* 16, p. 8475
- [5] Ahn J., Jun E. S., Lee H. S., et al. (2005) *J. Virol.* 79(13), p. 8620
- [6] Rehren F., Ritter B., Dittrich-Breiholz O., et al. (2013) *Med. Microbiol. Immunol.* 202, p. 11
- [7] Lim B. K., Shin J. O., Lee S. Ch., et al. (2005) *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38, p. 745
- [8] Kar-Roy A., Dong W., Michael N., et al. (2000) *J. Virol. Methods* 84, p. 127
- [9] Bopegamage S., Kovacova J., Vargova A., et al. (2005) *J. Gen. Virol.* 86, p. 3271
- [10] Drescher K. M., Kono K., Bopegamage S., et al. (2004) *Virology* 329, p. 381

Analýza ľudskej mitochondriálnej aDNA z archeologického materiálu

Lukáš Šebest¹, Marian Baldovič¹, Ľudevít Kádaši^{1,2}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; lukas.sebest@atlas.sk

²Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Slovenská akadémia vied, Vlárská 5, 833 34 Bratislava, Slovenská republika

Abstrakt

The term ancient DNA was introduced to define all persistent DNA in the remains of bodies of organisms. Their nucleotide sequences hide a lot of information beneficial for various scientific disciplines. Ancient DNA analysis studies have to cope with the fact that the aDNA presents in archaeological materials in very low abundance with damaged structure and the constant threat posed by a modern DNA contamination. For these reasons much more mitochondrial aDNA than nuclear is used in analysis, because nature of mitochondrial DNA greatly increases its retention in the historical samples. The goal of our work was to isolate aDNA from human archaeological remains, to sequence HVR I of mitochondrial aDNA and to identify mitochondrial haplogroups on the base of our sequencing results. We managed to identify mitochondrial haplogroups of 12 different samples from archaeological site Devín from 11th – 12th century.

KLúčové slová: ľudská aDNA; archeologické materiály; HVR I; mitochondriálne haploskupiny

Úvod a formulácia cieľa

Pojem archaická DNA (aDNA) slúži na označenie všetkej DNA, ktorú je možné izolovať z archeologických nálezov, múzejných vzoriek a čiastočných fosílií, pričom žiaden z týchto zdrojov aDNA nebol predošle úmyselne upravovaný za účelom jeho neskoršej analýzy.

Počiatok štúdií zaoberajúcich sa aDNA siahajú do 80. rokov 20. storočia, kedy bola v roku 1984 vykonaná úplne prvá izolácia aDNA [1] a v roku 1985 aj izolácia ľudskej aDNA [2]. Od vtedy sa vykonalo veľké množstvo ďalších štúdií, ktoré okrem obrovského informačného potenciálu aDNA odhalili aj viaceré problémy a obmedzenia sprevádzajúce prácu s ňou, s ktorými sa museli vyrovnávať. Boli to predovšetkým neustále hroziace riziko kontaminácie aDNA modernou DNA a fakt, že sa aDNA nachádza vo vzorkách vo veľmi nízkych koncentráciách a značne degradovanom stave, zapríčinený absenciou reparačných systémov a pôsobením vonkajších faktorov prostredia (pH, teplota) [3]. Keď sa preto vyvrátila autenticita výsledkov niektorých prác [4-5], obrátila sa hlavná pozornosť vedcov z jadrovej aDNA na mitochondriálnu. Mitochondriálna DNA je na rozdiel od jadrovej DNA multikópiová. Z tohto dôvodu sa zvyšuje šanca jej zachovania v zdrojoch aDNA. A aj napriek tomu, že informácie zapísané v mtDNA reprezentujú len jeden genetický lokus a nepokrývajú

tak celkovú variabilitu genofondu populácie, bola doteraz väčšina izolácií aDNA vykonaná za účelom analýz nukleotidových sekvencií z mitochondrií.

Informácie získané analýzou sekvencií aDNA sú hojne využívané vo viacerých vedných disciplínach, kde slúžia pri štúdiách evolúcie a populačnej genetiky, fylogenetických vzťahov organizmov [6], mapovaní migračných ciest prehistorických populácií [7], na riešenie nejasností pôvodu moderných ľudí [8], výskume stravovacích návykov [9] či paleopatologických štúdiách [10].

Cieľom našej práce bolo nami navrhnutou izolačnou metódou izolovať aDNA z archeologického materiálu, následne sekvenovať HVR I mitochondriálneho genómu a na základe zistených polymorfizmov určiť jednotlivé mitochondriálne haploskupiny.

Materiál a metódy

Spracovaný bol súbor 32 vzoriek ľudských kostrových pozostatkov pochádzajúcich z cintorína z 11. – 12. storočia na hrade Devín. Väčšinu vzoriek tvorili zuby (25) a zvyšok dlhé kosti (7). Pri ich odoberaní bolo nutné dohliadať na to aby boli vybrané len vzorky celistvé a bez povrchových poškodení. Ako zvieraciu kontrolu sme použili kosť z prasťa domáceho (*Sus scrofa domestica*), nájdenú v blízkosti cintorína.

Zuby a kosti sme dekontaminovali ich ponorením do 5% roztoku chlórnanu sodného na 2 minúty, následne opláchli ddH₂O a vystavili účinku UV svetla po dobu 30 minút z oboch strán. Z dekontaminovaných zubov sme rezacím kotúčom (Dremel 542) odstránili korunky. Korene sme opäť vysvietili pod UV svetlom po dobu 30 minút z oboch strán a mechanicky rozdrvili na prach pomocou dvoch skrutiek a predĺženej matky. Vzorky z dekontaminovaných dlhých kostí sme odoberali pomalým navrtávaním pomocou kobaltového vrtáka.

K 0,4 g zubného alebo kostného prachu sme pridali 3 ml extrakčného pufri, ktorý pozostáva z 0,5M EDTA (pH 8,5), 0,5% N-lauryl sarkozyly a 1mg/ml proteinázy K. Zmes zubný prach/extrakčný pufor sme nechali za neustáleho miešania inkubovať cez noc pri teplote 55 °C. DNA z tejto zmesi sme extrahovali pridaním 3 ml roztoku fenol:chloroform:izoamylalkohol (25:24:1), potom sme celú zmes dôsledne vortexovali a centrifugovali pri 9000 rpm (Eppendorf 5804R) pri 4 °C po dobu 8 minút. Odobrali sme vodnú fázu a pridali 3 ml roztoku chloroform:izoamylalkohol (24:1), dôkladne vortexovali a nechali centrifugovať pri 9000 rpm (Eppendorf 5804R) pri 4 °C po dobu 8 minút. Znovu sme odobrali vodnú fázu a pridali 2 ml 5M acetátu amónneho a 3 ml 96% izopropanolu, dôkladne vortexovali a nechali odstáť cez noc. Potom sme tento roztok centrifugovali pri 9500 rpm (Eppendorf 5804R) pri 4 °C po dobu 30 minút. Roztok sme odstránili a pelet

nechali sušiť pri 37 °C po dobu 15 minút. K peletu sme pridali 2 ml 80% etanolu, roztok vortexovali a centrifugovali pri 9500 rpm (Eppendorf 5804R) pri 4 °C po dobu 30 minút. Etanol sme odstránili a pelet nechali sušiť pri 37 °C po dobu 15 minút. Znovu sme pridali k peletu 2 ml 80% etanolu, roztok vortexovali a centrifugovali pri 9000 rpm (Eppendorf 5804R) pri 4 °C po dobu 20 minút. Etanol sme odstránili a pelet nechali sušiť pri 37 °C po dobu 30 minút. Vysušený pelet sme rozpustili v 40 µl ddH₂O.

Na PCR amplifikáciu sekvencií HVR I mitochondriálnej aDNA sme navrhli päť párov primerov, pričom kvôli povahe aDNA sme museli dbať na to, aby dĺžka jednotlivých amplicónov bola čo najmenšia. Údaje k jednotlivým primerom sú uvedené v tabuľke 1.

Tab 1. Primery PCR amplifikácie HVR I mtDNA

Pár	Názov	Sekvencia	T _m	Dĺžka amplicónu
1	mtDNA_15976F	5'-TCCACCATTAGCACCCAAAG-3'	55,4 °C	138 bp
	mtDNA_16113R	5'-TGGCTGGCAGTAATGTACGA-3'	55,4 °C	
2	mtDNA_16052F	5'-CCACCCAAGTATTGACTCACC-3'	57,4 °C	139 bp
	mtDNA_16190R	5'-GAGGGGGTTTTGATGTGG-3'	55,1 °C	
3	mtDNA_16132F	5'-ACCATAAATACTTGACCACCTGTAG-3'	56,3 °C	133 bp
	mtDNA_16264R	5'-GAGGGGTGGCTTTGGAGT-3'	57,1 °C	
4	mtDNA_16217F	5'-TCAACCCTCAACTATCACACAT-3'	54 °C	135 bp
	mtDNA_16351R	5'-TTTGACTGTAATGTGCTATGTACG-3'	54,6 °C	
5	mtDNA_16282F	5'-CAAACCTACCCACCCCTAACAG-3'	57,7 °C	130 bp
	mtDNA_16411R	5'-GGAGGATGGTGGTCAAGG-3'	57,1 °C	

Do celkového objemu reakčnej zmesi 40 µl pridávame 1 µl izolovanej aDNA, 4 µl 10x reakčného pufru S_{1,5}, 1 µl 2 pmol/l⁻¹ primerov, 0,25 µl 10 mM dNTP, 4 µl 50mM Mg²⁺, 1,3 µl 5 U *Taq* polymerázy a doplníme do celkového objemu ddH₂O.

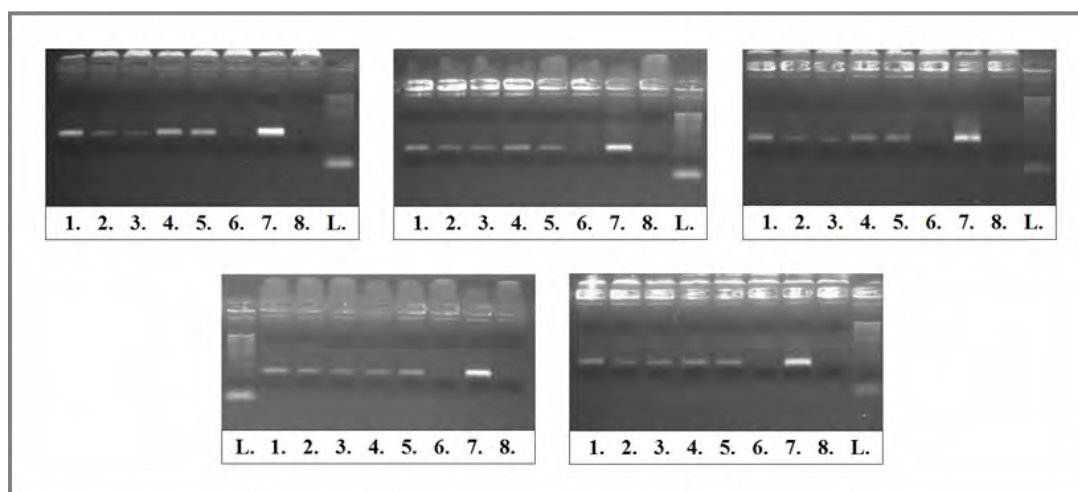
Amplifikácia prebehla „touchdown“ PCR programom: 3 minúty pri 94 °C; 12 cyklov 30 sekúnd pri 94°C, 30 sekúnd pri 59 °C (zmena teploty o -0,5 °C/cyklus) a 35 cyklov pri 72 °C; 18 cyklov 30 sekúnd pri 94 °C, 30 sekúnd pri 54,5 °C a 35 sekúnd pri 72 °C; 7 minút pri 72 °C a 10 minút pri 4 °C.

Precipitáciu PCR produktu sme vykonali podľa doporučeného protokolu purifikačného kitu ExoSAP-IT® For PCR Product Clean-Up (Affymetrix). Samotný proces sekvenovania sme vykonali podľa doporučeného protokolu sekvenačného kitu BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Invitrogen), pričom pre lepšie pokrytie HVR I sme

sekvenovali jednotlivé amplikóny „forward“ aj „reverse“ primerom. Sekvenačný produkt sme precipitovali roztokom pozostávajúcim z 3 M NaOAc (pH 4.6), 95% nedenaturovaného etanolu a ddH₂O. Celú zmes sme dôkladne vortexovali a inkubovali pri izbovej teplote po dobu 15 minút. Potom sme zmes centrifugovali pri 3700 rpm (Eppendorf 5804R) pri 4°C po dobu 35 minút. Supernatant sme odstránili centrifugáciou vzoriek hore dnom pri 780 rpm (Eppendorf 5804R) pri 4°C po dobu 1 minúty. K peletu sme pridali 100 µl 70 % etanolu. Celú zmes sme opäť centrifugovali pri 3700 rpm (Eppendorf 5804R) pri 4°C po dobu 10 minút. Supernatant sme odstránili rovnakým spôsobom ako v predošlom prípade a pelet sme dôkladne vysušili pri teplote 37°C. Takto precipitovaný produkt sme rozpustili v 10 µl HiDi formamidu a denaturovali. Denaturované sekvenačné produkty sme nechali analyzovať v 16-kapilárovom sekvenátore ABI PRISM 3130 XL Genetic Analyzer (AppliedBiosystems).

Výsledky a diskusia

Pred samotným sekvenovaním bola úspešnosť amplifikácie HVR I mtDNA overená elektroforézou v agarózovom géli. Sekvenovaniu boli podrobené len tie vzorky, ktorým sa amplifikovalo všetkých päť amplikónov HVR I, pričom zvieracia aj negatívna kontrola zostali negatívne (obr. 1).



Obr 1. Obrázky ELFO amplikónov HVR I mtDNA. Sprava doľava, zhora nadol - výsledky amplifikácie amplikónov 1 až 5. Dráhy 1 až 5 - vzorky aDNA, dráha 6 - zvieracia kontrola, dráha 7 - testovacia vzorka DNA, dráha 8 - negatívna kontrola. L – dĺžkový štandard DNA fragmentov.

Analýzou sekvenačných údajov HVR I 12 vzoriek boli detegované polymorfizmy, podľa ktorých boli určené mtDNA haploskupiny: H, H1, H1a, J2b, K, T1a, U5a, V a W. Zistené polymorfizmy a určené haploskupiny sú uvedené v tabuľke 2.

Tab 2. Polymorfizmy HVR I s určenými haploskupinami

Číslo	Názov	Zdroj	Polymorfizmus	Haploskupina
1	19/80	zub	CRS	H
2	57/83	zub	CRS	H
3	126/84	zub	16278C>T	H
4	154/85	kosť	16092T>C	H
5	Devín 1.	zub	16209T>C	H1
6	192/86	zub	16051A>G, 16162A>G	H1a
7	171/85	zub	16069C>T, 16126T>C, 16193C>T, 16278C>T	J2b
8	35/83	zub	16224T>C, 16311T>C	K
9	145/80	zub	16126T>C, 16163A>G, 16186C>T, 16189T>C, 16294C>T	T1a
10	166/85	zub	16114C>A, 16256C>T, 16270C>T, 16294C>T	U5a
11	33/83	zub	16298T>C	V
12	153/85	zub	16223C>T, 16292C>T	W

Tieto haploskupiny zapadajú do variability súčasných bežne rozšírených hlavných európskych mitochondriálnych haploskupín. Na to aby sme očakávali úplne odlišné haploskupinové zloženie, je 900 rokov z fylogenetického hľadiska príliš krátka doba. Zaujímavosťou je, že pri určovaní haploskupín K a W, sme nenašli žiadne ďalšie polymorfizmy definujúce ich podtriedy a môžeme preto poznamenať, že sa jedná o haplotypy nachádzajúce sa v hlbšom vetvení fylogenetického stromu dnešných mtDNA a je možné, že ide o línie, ktoré sa už v súčasnosti nevyskytujú.

Amplifikáciou a sekvenovaním oblasti HVR I mitochondriálnej aDNA zo súboru 32 vzoriek (25 vzoriek zubov a 7 vzoriek dlhých kostí) bol získaný kompletný haplotyp u 12 vzoriek (11 vzoriek zo zubov a 1 vzorka z dlhých kostí). To, že z niektorých vzoriek neprebehla žiadna amplifikácia respektíve nebolo možné amplifikovať všetky amplikóny HVR I, mohlo byť zapríčinené zhoršenou kvalitou aDNA (Devín – časté záplavy) alebo nedostatočným odstránením niektorých zložiek z procesu izolácie, ktoré inhibujú PCR. Úspešnosť izolácie aDNA zo vzoriek zubov bola 44 %, pričom zo vzoriek z kostí len 14,3 %. Čo koreluje s doterajšími predpokladmi, že zuby vďaka svojej štruktúre dokážu lepšie ochrániť aDNA pred nepriaznivými vplyvmi prostredia. Celková úspešnosť izolácie aDNA bola 37,5 %, avšak tento údaj nemôže byť chápaný až tak kriticky, pretože do jeho výpočtu neboli zahrnuté vzorky s nekompletno amplifikovanými amplikónmi (7 vzoriek) a pri započítaní týchto vzoriek by bola celková úspešnosť izolácie oveľa vyššia (59,4 %).

Záver

Podarilo sa nám úspešne amplifikovať HVR I mitochondriálnej aDNA z 900 ročných vzoriek ľudských zubov a kostí, a na základe zistených polymorfizmov určiť viacero odlišných mitochondriálnych haploskupín. Preto môžeme skonštatovať, že ciele našej práce boli splnené. V nasledujúcich rokoch sa budeme snažiť našu izolačnú metódu zdokonaľiť a dúfame, že naše poznatky a skúsenosti využijeme v spolupráci s inými vednými odbormi.

Pod'akovanie

Chcel by som sa poďakovať najmä môjmu školiteľovi Mgr. Marianovi Baldovičovi PhD., Mgr. Andrei Šoltýsovej PhD. a Mgr. Andrejovi Ficekovi PhD., za ich pomoc a cenné pripomienky, ďalej doc. RNDr. Radoslavovi Beňušovi PhD. za poskytnutie archeologických materiálov a aj ostatným pracovníkom katedry molekulárnej biológie. Moja vďaka patrí rovnako mojej rodine a priateľke, bez ich podpory by som to nezvládol.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Higuchi R., Bowman B., Freiberger M., et al. (1984) *Nature* 312, p. 183
- [2] Pääbo S. (1958) *Nature* 314, p. 567
- [3] Hofreiter M., Serre D., Poinar H. N., et al. (2001) *Nature Rev. Genet.* 2(5), p. 353
- [4] Soltis P. S., Soltis D. E., Smiley C. J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89(1), p. 449
- [5] Woodward S. R., Weyand N. J., Bunnell M. (1994) *Science* 266(5188), p. 1229
- [6] Miller W., Drautz D. I., Ratan A., et al. (2008) *Nature* 456(7220), p. 387
- [7] Adcock G. J., Dennis E. S., Easteal S., et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(02), p. 537
- [8] Green R. E., Krause J., Briggs A. W., et al. (2010) *Science* 328(5979), p. 710
- [9] Newman M. E., Parboosingh J. S., Bridge P. J., et al. (2002) *J. Archaeolog. Sci.* 29(1), p. 77
- [10] Taylor G. M., Young D.B., Mays S. A. (2005) *J. Clin. Microbiol.* 43(5), p. 2236

Vplyv lipidových partikul na sekréciu mastných kyselín v kvasinke *Saccharomyces cerevisiae*

Peter Seč, Roman Holič

*Slovenská akadémia vied, Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Biochémia membrán,
Moyzesova 61, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovensko; peter.sec@savba.sk*

Abstrakt

In almost all eukaryotic cells, including yeast, there are present specific organelles called lipid droplets, or lipid particles. To form lipid particles (LP), four gene products are needed: Dga1p, Lro1p, Are1p and Are2p. These proteins are responsible for production of neutral lipids: triacylglycerols and sterolesters. If the four proteins are missing in the cell, LP are not formed. Neutral lipids in LP are the main storage of fatty acids. For activation of fatty acids are responsible five genes. Interestingly, combined deletion of two activation genes, *FAA1* and *FAA4*, causes fatty acid secretion phenotype in yeast cells. In our work we studied impact of lipid droplets on fatty acid secretion phenotype in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. We have discovered differences in fatty acid secretion between yeast mutants and found that mutants without LP secrete higher amounts of fatty acids into growth media.

Kľúčové slová: *Saccharomyces cerevisiae*; sekrécia; mastné kyseliny; lipidové partikuly

Úvod a formulácia cieľa

V súčasnosti sa v biotechnologických aplikáciách čoraz častejšie uvažuje o produkcii vzácnych, resp. technologicky zaujímavých mastných kyselín (MK) v kvasinkách. Použitie mikroorganizmov, ktoré by boli schopné sekretovať MK do kultivačného média, by mohlo byť jedným z najúčinnějších spôsobov, ako získať žiadané MK. Preto preskúmanie mechanizmu sekrécie MK u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* môže prispieť k lepšiemu pochopeniu metabolizmu MK a zároveň významným spôsobom ovplyvniť možnosti produkcie heterológnych MK.

Prijaté alebo nadprodukované mastné kyseliny (MK) sa v bunke ukladajú v podobe zásobných lipidov (triacylglycerolov a sterolestero) do lipidových partikul (LP) [1, 2]. Za tvorbu týchto zásobných lipidov sú v kvasinke *Saccharomyces cerevisiae* zodpovedné štyri gény: *DGA1*, *LRO1*, *ARE1* a *ARE2*. Ak sú v kvasinke všetky štyri spomenuté gény deletované, kvasinka nie je schopná tvoriť LP a tento štvoritý mutant označujeme ako quadruple mutant (QM) [3, 4, 5]. Keďže QM mutant nemá LP, nie je schopný ukladať prijaté, resp. nadprodukované MK do zásobných lipidov. Bolo by preto zaujímavé, keby kvasinky namiesto ukladania MK do zásobných lipidov, boli schopné MK sekretovať do kultivačného média.

Fenomén sekrecie MK u kvasiniek bol popísaný len nedávno a existujú značne limitované poznatky o jeho mechanizme. Je známe, že delécie v génoch *FAA1* a *FAA4* umožňujú kvasinke sekretovať MK von z bunky [6]. Proteínové produkty týchto génov (*Faa1p* a *Faa4p*) sú primárne zodpovedné za aktiváciu voľných MK v bunke [7] a vzájomne sa enzymaticky dopĺňajú.

Cieľom našich experimentov bolo testovanie vplyvu LP na sekreciu MK v kvasinke *S. cerevisiae* a sledovanie úlohy jednej formy zásobných lipidov, triacylglycerolov.

Materiál a metódy

Tab. 1 Názvy kmeňov pripravených a použitých v práci

BY4742
BY4742 <i>faa1::HIS3, faa4::LYS2</i>
BY4742 QM
BY4742 QM <i>faa1::HIS3, faa4::LYS2</i>
BY4742 + YCplac33
BY4742 <i>faa1::HIS3, faa4::LYS2</i> + YCplac33
BY4742 QM + YCplac33
BY4742 QM <i>faa1::HIS3, faa4::LYS2</i> + YCplac33
BY4742 QM <i>faa1::HIS3, faa4::LYS2</i> + YCplac33- <i>DGA1</i>
BY4742 QM <i>faa1::HIS3, faa4::LYS2</i> + YCplac33- <i>LRO1</i>

Legenda k tab.1 QM – štvornásobný kvasinkový mutant, deletované gény sú: *DGA1, LRO1, ARE1, ARE2*.
Do kmeňov boli vložené delécie v génoch *FAA1* a *FAA4* – zodpovedné za sekrečný fenotyp
YCplac33 – kvasinkový centromerový plazmid
HIS3, LYS2 – histidínový, lyzínový selekčný marker

Spektrofotometrické meranie sekretovaných mastných kyselín do média

Hladiny vysekretovaných mastných kyselín sme merali pomocou spektrofotometra pri vlnovej dĺžke 600nm. V časových intervaloch sme sledovali zákal média testovaných kmeňov, pričom intenzita zakalenia média nám reprezentovala množstvo sekretovaných MK do média.

Tenkovrstvová chromatografia (TLC)

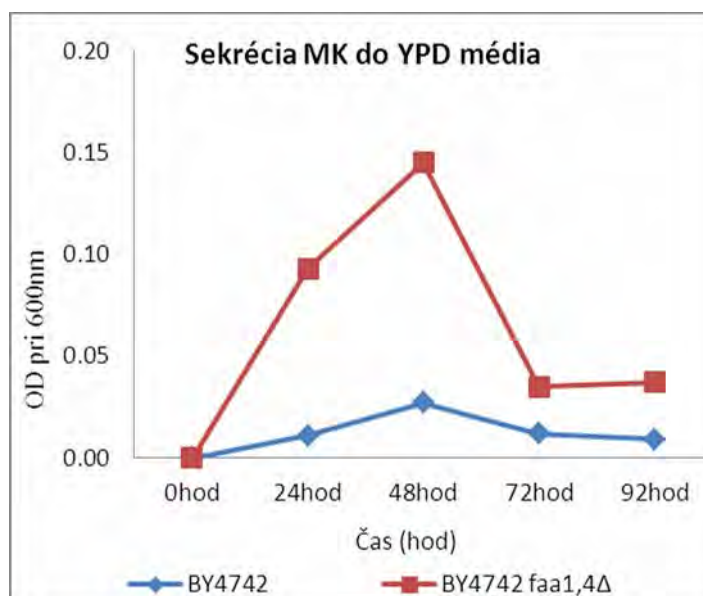
Lipidy boli odparené dosucha a suspendované v malom objeme zmesi chloroform:metanol 2:1 (100 µl). Na TLC platňu bolo nanosených 50µl pomocou poloautomatického nanášacieho prístroja CAMAG Linomat 5. Lipidy boli delené na TLC platni v dvoch krokoch vyvíjacou zmesou I. (petroléter:dietyléter:kys.octová v pomere 70:30:2) do 2/3 TLC platne a následne vyvíjacou zmesou II. (petroléter:dietyléter v pomere 49:1) po koniec platne. Škvrnky lipidov boli vizualizované spálením nasledovne: TLC platňa sa namočila v spaľovacej zmesi a následne inkubovala ≈5 min. pri 130°C v teplovzdušnej

sušičke s priebežným kontrolovaním intenzity spálenia. Jednotlivé lipidy boli identifikované porovnaním s pohyblivosťou štandardov.

Výsledky a diskusia

1. Overenie sekrečného fenotypu

Sekrécia alebo „uvoľnenie“ MK z bunky do okolitého prostredia, nie je pre kvasinky štandardným procesom. Z dostupných zdrojov je zatiaľ známe, že za sekrečný fenotyp je zodpovedná delécia dvoch génov: *FAA1* a *FAA4*. Aby sme mohli podrobnejšie skúmať proces sekrecie MK, najskôr sme si pripravili kvasinkový kmeň BY4742 *faa1::HIS3, faa4::LYS2*. Jeho schopnosť sekretovať MK sme overili porovnaním so štandardným kmeňom BY4742. Na základe výsledkov uvedených v obrázku č. 1 možno konštatovať, že sa aj v kvasinkovom kmeni BY4742 potvrdil sekrečný fenotyp MK po delécii génov zodpovedných za sekreciu mastných kyselín.

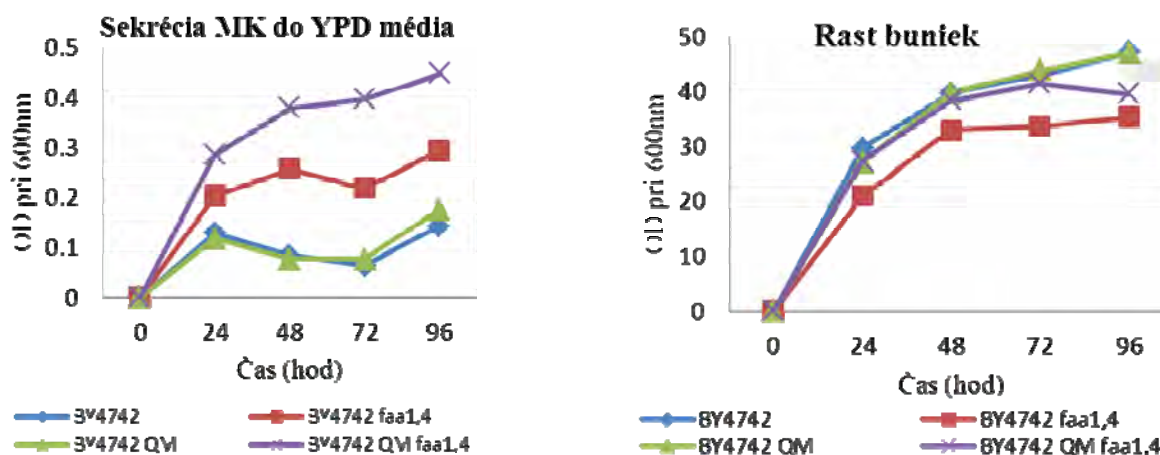


Obr. 1 Sekrécia MK do YPD média štandardného kmeňa BY4742 a sekretujúceho kmeňa BY4742 *faa1,4Δ*.

2. Test zvýšenej sekrecie mastných kyselín v neprítomnosti lipidových partikul

Jednou z funkcií LP je ukladanie MK do zásobných lipidov. Predpokladali sme, že ak by bunka nebola schopná ukladať MK do zásobných lipidov, mohlo by dochádzať k ich zvýšenej sekrecii. Na test nášho predpokladu, sme využili kmeň bez LP (BY4742 QM), v ktorom sú gény zodpovedné za tvorbu zásobných lipidov deletované. V tomto kmeni bez LP sme pripravili delécie v génoch *faa1* a *faa4*, ktoré sú zodpovedné za sekrečný fenotyp MK. Sekréciiu MK nami pripraveného kmeňa sme porovnávali so štandardným kmeňom (BY4742),

s kmeňom bez LP (BY4742 QM) a kmeňom obsahujúcim LP, ale zároveň schopným sekrécie MK (BY4742 *faa1,4Δ*). Z výsledkov možno vidieť, že sa potvrdila naša hypotéza, že sekretujúci kmeň bez LP bude sekretovať viac MK ako sekretujúci kmeň s LP.



Obr. 2 Porovnanie sekrécie mastných kyselín a rastu buniek u štandardného kmeňa (BY4742), kmeňa bez lipidových partikul (BY4742 QM), sekretujúceho kmeňa s lipidovými partikulami (BY4742 *faa1,4Δ*) a sekretujúceho kmeňa bez lipidových partikul (BY4742 QM *faa1,4Δ*)

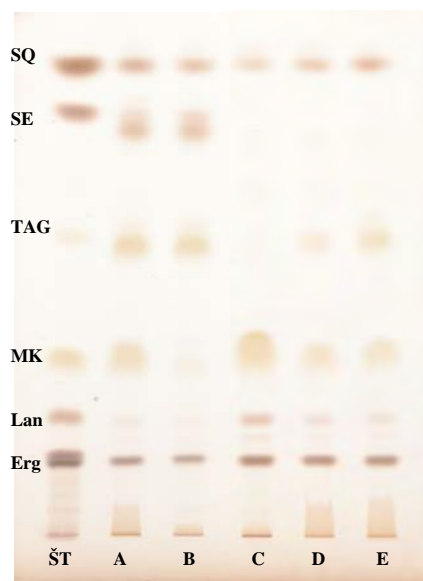
Okrem spektrofotometrického merania je možné zákal pozorovať aj voľným okom (Obr. 3).



Obr. 3 Vizuálne zobrazenie sekrécie MK do média po 144 hodinách. Vľavo kmeň bez lipidových partikul BY4742 QM, vpravo kmeň sekretujúci kmeň bez lipidových partikul (BY4742 QM *faa1,4Δ*)

3. Vplyv tvorby triacylglycerolov na sekréciu mastných kyselín

V ďalšom kroku sme sa rozhodli zistiť ako vplyvajú gény zodpovedné za tvorbu jednej formy zásobných lipidov, triacylglycerolov, na sekréciu MK. Zamerali sme sa preto na gény *DGA1* a *LROI*. Jednotlivé gény sme vniesli do sekretujúceho kmeňa bez LP (BY4742 QM *faa1,4Δ*). Predpokladali sme, že ak niektorí z génov bude výrazne vplyvať na sekréciu MK, zníži sa sekrécia MK u daného kmeňa. V prvom kroku sme overili funkčnosť daných génov. Pomocou TLC analýzy neutrálnych lipidov sme porovnali množstvo jednotlivých lipidov extrahovaných z buniek po 72 hodinovom raste (obr. 4).



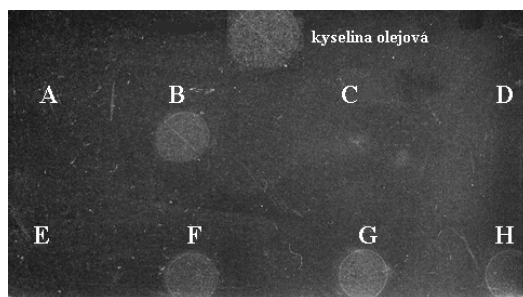
Obr. 4 Delenie neutrálnych lipidov pomocou tenkovrstvovej chromatografie (TLC).

- A. BY4742 + YCplac33 (*URA3*),
- B. BY4742 *faa1::HIS3, faa4::LYS2* + YCplac33
- C. BY4742 QM *faa1::HIS3, faa4::LYS2* + YCplac33
- D. BY4742 QM *faa1::HIS3, faa4::LYS2* + YCplac33-*DGA1*
- E. BY4742 QM *faa1::HIS3, faa4::LYS2* + YCplac33-*LRO1*

ŠT- štandardy, Erg - ergosterol, Lan – lanosterol, MK – mastné kyseliny, TAG – triacylglyceroly, SE – sterolestery, SQ - skvalén

Z TLC analýzy neutrálnych lipidov možno pozorovať, že všetky mutanty QM, podľa predpokladu neobsahujú sterolestery. Zároveň sme overili, že kmene BY4742 QM *faa1::HIS3, faa4::LYS2*+YCplac33-*DGA1* a BY4742 QM *faa1::HIS3, faa4::LYS2*+YCplac33-*LRO1*, vďaka génom *DGA1* a *LRO1* tvoria TAG a pravdepodobne formujú aj lipidové partikuly. Ďalej sa nám potvrdil predpoklad, že kmeň BY4742 QM *faa1::HIS3, faa4::LYS2* + YCplac33, ktorý neobsahuje LP, netvorí ani TAG a ani sterolestery. Chromatografické výsledky naznačujú, že v bunkách tohto kmeňa sa zároveň hromadia vysoké hladiny MK.

Aby sme biologicky overili, že sú do média sekretované MK, urobili sme kvapkový test. V experimente sme využili testerový kmeň, auxotrofný na prídavok externej MK (porucha desaturácie MK: *ole1Δ*). Tento kmeň potrebuje prídavok externej MK do rastového média, na to aby bol schopný rásť. Misky na kvapkanie sme pripravili tak, že sme *ole1Δ* kmeň zalievali do agarových pôd. Ak médium z testovaných kmeňov obsahovalo MK, podporilo rast *ole1Δ* kmeňa. Prejavilo sa to tým, že médium kmeňov BY4742 *faa1::HIS3, faa4::LYS2* + YCplac33, BY4742 QM *faa1::HIS3, faa4::LYS2* + YCplac33, BY4742 QM *faa1::HIS3, faa4::LYS2* + YCplac33-*DGA1* a BY4742 QM *faa1::HIS3, faa4::LYS2* + YCplac33-*LRO1* dopomohlo rastu testerového, *ole1Δ* kmeňa, zaliateho v agarovom médiu (obr. 5).



Obr. 5 Kvapkový test overenia sekrécie MK do média. Kvapkané boli supernatanty kmeňov o objeme 20ul:

A	- BY4742 + YCplac33 (<i>URA3</i>)
B	- BY4742 <i>faa1::HIS3, faa4::LYS2</i> + YCplac33
C	- BY4742 QM + YCplac33
D	- BY4742 QM + YCplac33- <i>DGA1</i>
E	- BY4742 QM + YCplac33- <i>LRO1</i>
F	- BY4742 QM <i>faa1::HIS3, faa4::LYS2</i> + YCplac33
G	- BY4742 QM <i>faa1::HIS3, faa4::LYS2</i> + YCplac33- <i>DGA1</i>
H	- BY4742 QM <i>faa1::HIS3, faa4::LYS2</i> + YCplac33- <i>LRO1</i>

Záver

Na základe získaných výsledkov možno konštatovať, že za sekrečný fenotyp je skutočne zodpovedná delécia génov *FAA1* a *FAA4*. Zároveň získané výsledky potvrdzujú predpoklad, že kmene bez lipidových partikul a so sekrečným fenotypom, sekretujú MK vo výrazne vyššej miere. Úlohu génov zodpovedných za tvorbu zásobnej formy MK, triacylglycerolov, v sekrécii MK si vyžaduje ešte ďalšie skúmanie.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0785-11 a grantom VEGA č. 2/0180/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Sorger D., Daum G. (2002) J. Bacteriol. 184, p. 519
- [2] Meex R. C. R., Schrauwen P, Hesselink M. K. (2009) Am. J. Physiol. 297, p. 913
- [3] Czabany T., Wagner A., Zweytick D., et al. (2008) Int. J. Biol. Chem 283, p. 17065
- [4] Dahlqvist A., Stahl U., Lenman M., et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. 97, p. 6487
- [5] Oelkers P., Tinkelenberg A., Erdeniz N., et al. (2000) J. Biol. Chem. 275, p. 15609
- [6] Scharnewski M., Pongdontri P., Mora G., et al. (2008) FEBS J. 275, p. 2765
- [7] Faergeman N. J., Black P. N., Zhao X. D., et al. (2001) J Biol Chem 276, p. 37051

Analyza obsahu antimikrobiálneho peptidu v materských kašičkách

Mária Šedivá, Jaroslav Klaudíny

*Chemický ústav SAV, Oddelenie glykobiológie, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava;
chemsedm@savba.sk*

Abstrakt

One of the potential tools how to protect honeybees against their microbial pathogens could be higher content of antimicrobial compounds in larval jelly. Larval jelly (LJ) is unique diet of honeybee larvae and peptide defensin1 was described as LJ component with antibacterial properties. In this work, royal jellies from different honeybee colonies were selected and the antimicrobial efficacy of their extracts was analysed on microbial cultures *Micrococcus luteus* and *Bacillus subtilis*. The sizes of inhibition zones were compared and royal jellies with the highest zones were chosen for breeding.

Kľúčové slová: materská kašička; defenzín1; antimikrobiálna aktivita; testy inhibície

Úvod a formulácia cieľa

Vďaka významnej úlohe v ekosystéme a v poľnohospodárstve má v súčasnosti ochrana a starostlivosť o včelu medonosnú vysokú prioritu. V posledných desaťročiach však dochádza k výraznému úhynu včiel. Faktorov zapríčiňujúcich tento fenomén je viacero. Okrem intenzívneho používania pesticídov a fragmentácie a ničenia prirodzeného prostredia sú včely ohrozované aj viacerými chorobami.

K najväznejším chorobám patrí mor včelieho plodu, ochorenie postihujúce larvy včely medonosnej. Pôvodcom tejto nákazy je Gram-pozitívna baktéria *Paenibacillus larvae* [1]. Ďalším významným ochorením je zväpenatenie včelieho plodu vyvolané hubou *Ascosphaera apis* [2].

Jedným z možných nástrojov boja proti spomínaným patogénom by mohlo byť využitie antimikrobiálnych látok, ktoré sú produkované do larválnej kašičky. Larválna kašička je jedinečnou zložkou potravy včelích lariev, ktorú produkujú včely dojčičky v hypofaryngeálnych a mandibulárnych žľazách [3]. Jednou z látok izolovaných z larválnej kašičky s antimikrobiálnymi účinkami je kationický amfipatický peptid bohatý na cysteín, defenzín1. Boli popísané jeho antibakteriálne aj antifungálne účinky [4,5,6]. Zistilo sa tiež, že larválne kašičky z rôznych včelích kolónií sa môžu v množstvách anti-mikrobiálneho peptidu defenzínu1 odlišovať [7].

Cieľom práce bolo analyzovať obsah antimikrobiálneho peptidu defenzínu1 v materských kašičkách získaných z rôznych včelstiev a takto na základe stanovenia antimikrobiálnej aktivity identifikovať včelstvá schopné vyššej produkcie tohto peptidu.

Materiál a metódy

Testované materské kašičky boli získané v roku 2011 z rôznych kolónií včely medonosnej (*Apis mellifera carnica* Pollman) na Ústave včelárstva v Liptovskom Hrádku a z kolónií jedného včelára zo Šiah. Po odobratí do mikroskúmaviek boli kašičky skladované zmrazené pri -20°C .

Na analýzy boli použité lyofilizované materské kašičky. Z každej kašičky bolo odvážených 10 mg. V prvom kroku boli kašičky extrahované organickým rozpúšťadlom v ultrasonikátore (Teson10, Tesla Slovenská republika), aby boli odstránené mastné kyseliny, ktorých antimikrobiálne účinky boli tiež popísané [8].

V ďalšom kroku boli materské kašičky extrahované roztokom 50 mM kyseliny jantárovej s $\text{pH}=4,0$ ($2 \times 200 \mu\text{l}$) v ultrasonikátore ($2 \times 25 \text{ min}$). Vzorky z prvej aj z druhej extrakcie boli použité na antimikrobiálne testy.

Vyizolované extrakty materských kašičiek v roztoku kyseliny jantárovej, do ktorých sa extrahoval antimikrobiálny peptid defenzín1, boli testované na antimikrobiálnu aktivitu s použitím 2 kmeňov mikroorganizmov, *Micrococcus luteus* a *Bacillus subtilis*. Mikroorganizmy boli kultivované na kultivačnom médiu MPA (Fluka, Švajčiarsko) pri $\text{pH}=7,2$. Na testovanie aktivity získaných extraktov bol použitý difúzny test v jamkách. Na Petriho misku bolo naliatych 8 ml kultivačného média zmiešaného s kultúrou mikroorganizmov (10^6 buniek). Po stuhnutí sa do média vyrezali jamky, do ktorých boli nanesené získané extrakty. Na Petriho misky s kultúrou *Micrococcus luteus* boli do jamiek nanesené 3 μl extraktu, testovaný bol extrakt získaný z prvej aj druhej extrakcie. Na Petriho misky s kultúrou *Bacillus subtilis* boli do jamiek nanesené $2 \times 3 \mu\text{l}$ extraktu, pričom testovaný bol len extrakt z prvej extrakcie. Všetky testované kultúry boli inkubované cez noc (16-18 h) pri 37°C .

Antimikrobiálna aktivita extraktov materských kašičiek s defenzínom1 bola určená na základe merania veľkosti inhibičných zón pozorovaných na oboch testovaných kultúrach mikroorganizmov.

Výsledky a diskusia

Testovaný súbor tvorilo 58 materských kašičiek. Na základe veľkosti inhibičných zón boli materské kašičky rozdelené do kategórií: veľmi vysoká aktivita (kašičky zvýraznené v tabuľke tmavočervenou farbou), vyššia aktivita (kašičky zvýraznené v tabuľke svetločervenou farbou) a nižšia aktivita (nezvýraznené). Do kategórie s veľmi vysokou aktivitou boli zaradené materské kašičky 25, 26, 31, 33, 34, 36, 43a, 43, 50, 60, 61, 64. Do

kategórie s vyššou aktivitou boli zaradené materské kašičky 2, 3, 4, 5, 7, 8, 15, 17, 19, 20, 23, 24, 29, 30, 32, 35, 41, 44, 49, 51.

Na základe získaných výsledkov boli identifikované materské kašičky s najvyššími antimikrobiálnymi aktivitami a tieto výsledky boli poskytnuté včelárom, ktorí na základe nášho výskumu pristúpili k experimentálnemu kríženiu vhodných včelstiev.

Tab. 1 Antimikrobiálna aktivita extraktov materských kašičiek

Veľkosť inhibičných zón (mm)				Veľkosť inhibičných zón (mm)			
MK	<i>Micrococcus luteus</i> 1. extrakcia	<i>Micrococcus luteus</i> 2. extrakcia	<i>Bacillus subtilis</i> 1.extrakcia	MK	<i>Micrococcus luteus</i> 1. extrakcia	<i>Micrococcus luteus</i> 2. extrakcia	<i>Bacillus subtilis</i> 1.extrakcia
1	11	6,8	4,5	31	13	9	6,5
2	12	7,8	5	32	11,3	7	5,5
3	12	7	5,5	33	14,3	9,3	8
4	12	7,8	5,5	34	13	8,8	6,5
5	11,5	7,8	5	35	11,3	7	5
6	10,5	6,3	4	36	13	8,5	7
7	12	7,3	5,5	37	8	5	
8	12	6,3	4,8	38	9,5	5,8	3,5
9	11	6,3	4,3	39	8,8	5	
10	10,5	6	4,3	40	6,8	4,3	
11	10	6	3,5	41	11,3	6,8	5
12	10,5	7	4,3	43a	12,3	6,8	6
13	11	6,8	4,5	43	12,5	7,3	6
14	11	7,5	4,5	44	11	6,3	4,5
15	12	6,8	5,3	45	6,5	3,5	
16	11	5,8	4,5	46	9	5,3	
17	11,8	6	4,3	47	10	6,4	4,3
18	9	4,5		48	10	6,5	4,3
19	11,8	7	5,3	49	11,5	7	4,8
20	11,5	6	4,5	50	12,8	7,8	6
21	10	5,3	3,8	51	12	7	6
22	10,8	6	4,5	54	7,5	4,3	
23	11,8	6,3	5	56	9	5,5	
24	12	6,5	5,3	58	11,2	6,8	4,8
25	13	8	6,8	60	13,8	8	7
26	14	9,3	7,8	61	14	8,3	7,3
28	11,3	7	5	62	8	4,3	
29	11,5	6,8	5	63	7,3	4,3	
30	11,5	7,3	5	64	12,5	7,8	5,8

Záver

V tejto práci bol zhodnotený obsah antimikrobiálneho peptidu defenzínu1 v 58 materských kašičkách získaných z rôznych včelstiev. Bola pozorovaná variabilita extraktov materských kašičiek. Boli identifikované materské kašičky s najvyššou antimikrobiálnou aktivitou. Na základe týchto testov boli vyselektované včelstvá schopné vyššej produkcie defenzínu1 do materských kašičiek. Praktickým výstupom predloženej práce bolo poskytnutie získaných výsledkov včelárom za účelom uskutočnenia experimentálneho kríženia včelích kráľovien s trúdmi vo vybratých včelstvách. Krížením by sa mohli získať včelstvá produkujúce antimikrobiálne účinnejšie larválne kašičky.

PodĎakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre Glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja (50%) a finančnej podpore projektu VEGA 2/0178/12 (50%).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Genersch E., Forsgren E., Pentikäinen J., Ashiralieva A., Rauch S., Kilwinski J., Fries I. (2006) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, p. 501
- [2] Spiltoir C. F. (1955) *Am. J. Bot.* 42, p. 501
- [3] Brouwers E. V. M., Ebert R., Beetsma J. (1987) *J. Apicult. Res.* 26, p. 11
- [4] Bíliková K., Gusui W., Šimúth J. (2001) *Apidologie* 32, p. 275
- [5] Bachanová K., Klauďný J., Kopernický J., et al. (2002) *Apidologie* 33, p. 259
- [6] Fujiwara S., Imai J., Fujiwara M., et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, p. 11333
- [7] Klauďný J., Bachanová K., Kohútová L., et al. (2012) *Biologia* 67, p. 200
- [8] Melliou E., Chinou I. (2005) *J. Agric. Food Chem.* 53, p. 8987

Posouzení transpozice musculus tibialis posterior na základě matematické simulace chůze

Darina Šedovičová, Miloslav Vilímek

České vysoké učení technické v Praze, Fakulta strojní, Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky, Technická 4, 166 07 Praha, Česká republika; darina.sedovicova@fs.cvut.cz

Abstrakt

The transfer of the tibial posterior tendon often performs as a last resort musculoskeletal pathology when a walking of patient is very difficult. The aim of this study was to estimate the changes caused by muscle tendon transfer and we reviewed its influence for the patients. We measured walking of a young man and we found muscle forces that represented in this case muscle condition using by mathematical simulation. The transfer of the tibial posterior tendon was simulated on a left leg and the muscle forces were calculated using by static optimization. We registered changes of force interaction for muscles in the left lower leg. The muscle forces were increased for a posterior tibial muscle and an anterior tibial muscle and they were decreased for peroneal muscles. It is presumably from the result that the transfer of the tibial posterior tendon could help to restoring of a foot dorsiflexion. But the elevation of some muscle forces could mean for patient with worse muscle condition overloading of the muscles and it can cause additional complications.

Klíčové slova: matematické modelování; statická optimalizace; svalová síla; transpozice svalu

Úvod a formulace cíle

Transpozice *m. tibialis posterior* se provádí jako poslední řešení onemocnění pohybového aparátu, kdy je pro postiženého z různých důvodů chůze obtížná nebo dokonce nemožná. Nejčastěji se s technikou setkáváme u pacientů s vrozeným neurogenním onemocněním (dětská mozková obrna, Charcot-Marie-Tooth), dále u lidí trpících leprou nebo po pouřazových stavech [1]. Ve všech případech je výrazně oslabena dorziflexe nohy a pacient tudíž není schopen normální chůze.

V minulosti se transpozice aplikovala hlavně u pacientů s vrozeným onemocněním. V roce 1933 Ober [2] použil transpozici *m. tibialis posterior* povrchovou cestou cirkumtibiálně u pacientů s oslabenou dorzální flexí (drop foot). Nevýhodou techniky byla ztráta svalové délky a tím i ztráta svalové síly. V roce 1954 popsali Watkins et al. [3] transpozici přes interosseální membránu na dorzum nohy s ukotvením na střední kost klínovou u 29 pacientů s deformitami nohy a výrazně oslabenou dorziflexí. V roce 1961 aplikoval Singer [4] mírně modifikovaný postup transpozice u pacientů s deformitou nohy ve formě koňské nohy (club foot), kdy z důvodu nedostatečné délky šlachy *m. tibialis posterior* zvolil ukotvení ke šlaše *m. peroneus tertius* nebo na *m. digitorum longus*. Po úspěších zaznamenaných u vrozených onemocnění byla technika aplikována také u pacientů po traumatech v oblasti kolene a bérce nebo u postižených leprou. Společným charakterem

těchto stavů je většinou poškození *n. peroneus*, které má za následek obrnu peroneálních svalů. V řadě případů (viz. Richard [5], Soares [6], Yeap et al. [7], Hove and Nielsen [8]) byla použita metoda transpozice přes interosseální membránu s modifikací v ukotvení svalu na dorzální straně nohy, kdy byla šlacha *m. tibialis posterior* po protažení na dorzum nohy rozdělena na dvě části a následně sešita se *m. tibialis anterior* a *m. peroneus longus* nebo *tertius*. U většiny autorů zaznamenala tato modifikace metody 90% úspěšnost. Ve studii Pilný et al. [9] byla u pacientů s parézou *n. peroneus* využita další možnost transpozice s ukotvením *m. tibialis posterior* na bázi třetího metatarsu. Ze souboru 18 pacientů bylo v 93 % případů dosaženo výborných nebo dobrých výsledků.

Cílem této studie bylo navrhnout postup, pomocí kterého by bylo možno posoudit vhodnost zákroku pro jednotlivé pacienty. Jelikož svalovou kondici v praxi nemůžeme měřit přímo, využili jsme metody matematické simulace, prostřednictvím kterých jsme byli schopni zhodnotit změnu silové interakce svalů před a po zákroku. Svalová kondice byla posuzována dle velikosti svalových sil vyvinutých během pohybu. Svalové síly byly určeny pomocí statické optimalizace s využitím modelu svalu Hillova typu.

Materiál a metody

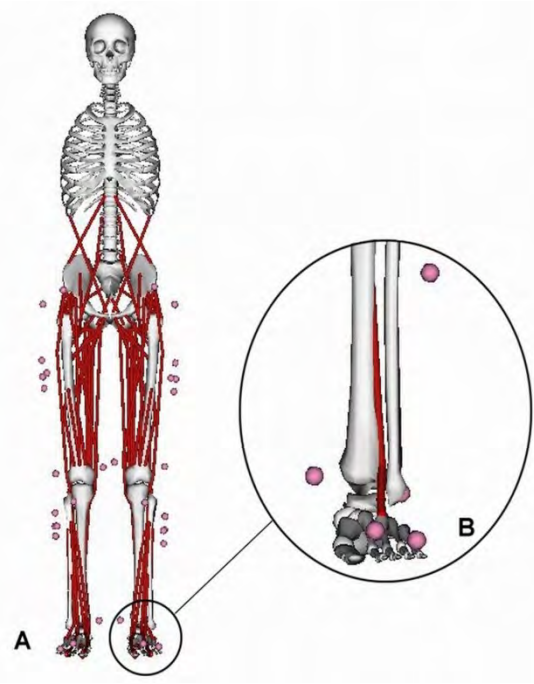
Subjekt a experimentální data. Experimentální data chůze byla získána od mladého muže ve věku 24 let s výškou 181 cm a hmotností 82,3 kilogramů. Subjekt v době měření netrpěl žádným onemocněním pohybového aparátu, proto byla analýza klasifikována jako ideální stav. Kinematika pohybu byla zachycena prostřednictvím systému Qualisys Motion Capture (Qualisys Inc., Švédsko). Před měřením bylo na subjekt umístěno 39 experimentálních markerů především na antropometrické body v oblasti pánve a dolních končetin (Obr. 1). Silové interakce při chůzi byly zaznamenány pomocí dvou silových desek s piezoelektrickými čidly (Kistler Winterthur, Švýcarsko).

Měření probíhalo v dvou krocích. Nejdřív byla nasnímána statická poloha těla při stožení na jedné měřicí desce. Dále se měřený subjekt několikrát prošel po snímané scéně. Při chůzi bylo potřeba, aby měřený subjekt došlápl na obě silové desky celou plantární částí nohy a aby jeho chůze byla co nejpřirozenější. V obou případech byla poloha snímána šesti kamerami vysílajícími infračervené záření s frekvencí 100 Hz.

Musculo-skeletální model lidského těla. Výpočet svalových sil byl realizován v prostředí Opensim (Stanford University, USA) [10]. Základem simulace byl 3D prototyp pohybového aparátu člověka vypůjčen z knihovny OpenSimu (Gait 2392 Model). Prototyp měl 23 stupňů volnosti a obsahoval 92 šlacho-svalových akčních členů, které reprezentovali



Obr. 1 Umístění experimentálních markerů na měřeném subjektu; pohled zezadu a z boku



Obr. 2 A) simulační model měřeného člověka, B) detail transpozice *m. tibialis posterior* na levé končetině

76 svalů v oblasti pánve a dolních končetin [11, 12]. Dynamické vlastnosti šlacho-svalových komplexů byly vyjádřeny modelem svalu Hillova typu, který předpokládá, že výsledná svalová síla je funkcí délky svalu $f_L(L^M)$, rychlosti kontrakce $f_v(v^M)$ a stupně aktivace svalu $a(t)$ a také závisí na volné délce šlachy L_s^T a úhlu zpeření svalu α [13, 14, 15].

K provedení analýzy bylo potřeba vytvořit dva modely měřeného člověka, jeden s normálním postavením *m. tibialis posterior* a druhý se simulovanou transpozicí. V našem případě byla transpozice simulována na levé končetině dle publikace Pilný et al. [9] (Obr. 2). Nakonec byly na oba základní prototypy přiřazeny virtuální markery ve stejných antropometrických místech jako na měřeném jedinci.

Simulace chůze a určení svalových sil. Model měřeného člověka byl vytvořen ze statického měření stoje na jedné desce, kdy na základě polohy experimentálních a virtuálních markerů byly poměřeny jednotlivé segmenty základního prototypu. V tomto kroku byly také stanoveny hmotnostní a setrvační veličiny pro jednotlivé segmenty těla měřeného člověka. V dalším kroku byly vytvořenému modelu přiřazeny kinematické a silové atributy změřeného pohybu, pomocí kterých jsme získali informace o silovém působení v jednotlivých kloubech během chůze. Poslední problém, problém distribuce svalových sil pro jednotlivé segmenty, byl řešen pomocí statické optimalizace [16, 17]. Jelikož byla simulovaným pohybem chůze,

nebylo potřeba zahrnout dynamické projevy pohybu [18]. Optimalizační kritérium bylo zvoleno ve tvaru

$$\min \sum (a_i)^2, \quad [\text{I.}]$$

$$\text{vztaženo na } Q_j = \sum [a_i f(F_{0,i}^M, L_i^M, v_i^M)] \cdot r_{i,j}, \quad [\text{II.}]$$

$$0.01 \leq a_i \leq 1, \quad [\text{III.}]$$

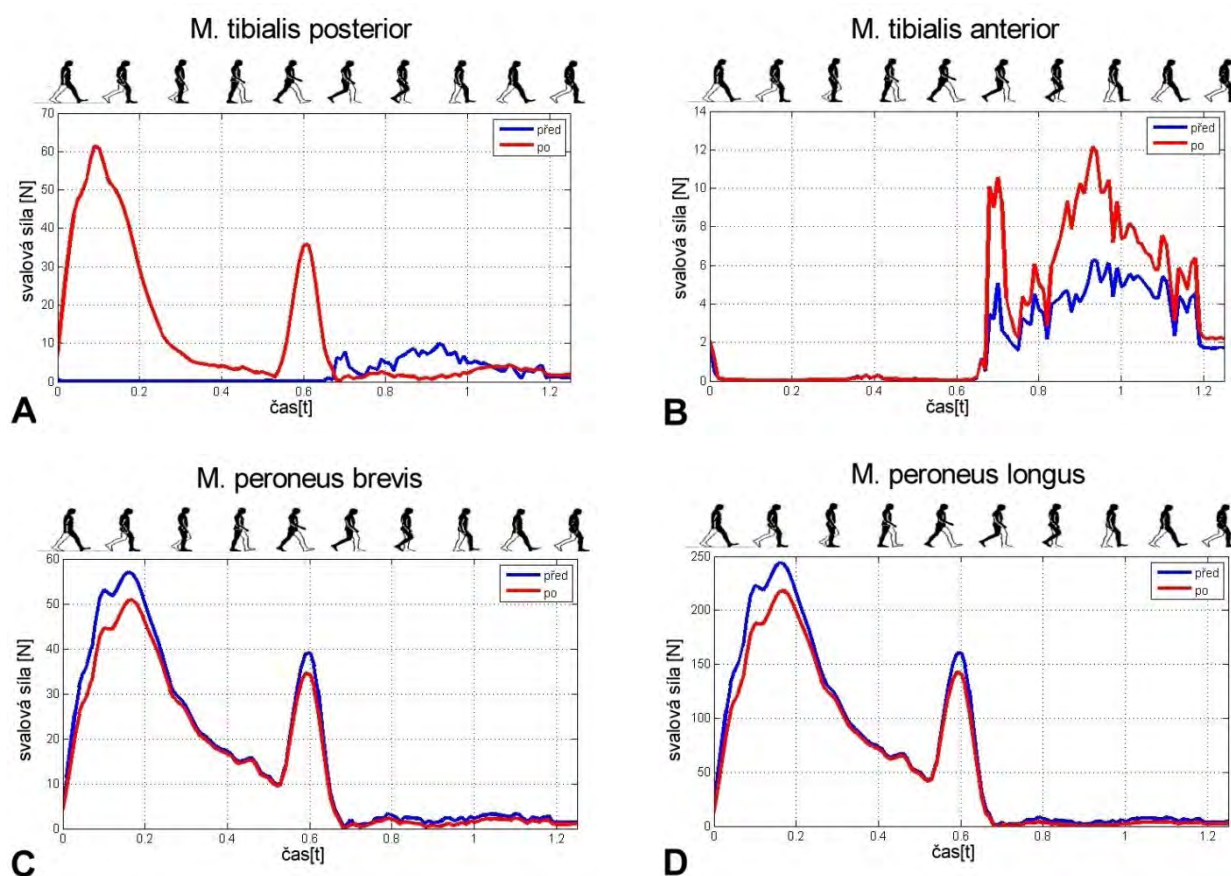
kde a_i je svalová aktivace, Q_j jsou reakce v kloubu během pohybu, $F_{0,i}^M$ je maximální izometrická síla svalu, L_i^M je délka svalu, v_i^M je rychlost kontrakce svalu a $r_{i,j}$ je rameno, na kterém příslušný sval působí. Při výpočtu byly zahrnuty fyziologické parametry svalu a optimalizace byla řešena kvadratickým programováním. Postup byl aplikován na oba modely a v obou případech byla využita stejná experimentální data.

Výsledky a diskuse

Po porovnání silových interakcí ve svalech během chůze pro normální a transponovaný stav *m. tibialis posterior* byly zjištěny výraznější změny pouze u svalů levého bérce kromě *m. triceps surae*. U svalů v oblasti pánve, celé pravé končetiny a svalů levého stehna se silová interakce nezměnila. Nejvýraznější změna byla zachycena u samotného transponovaného svalu (Obr. 3A). Dále byl registrován mírný nárůst svalových sil u flexorů levé nohy, který ovšem lze považovat za zanedbatelný. U extensorů nohy a prstů byla změna nejzajímavější. Dlouhé natahovače palce a prstů transpozici skoro vůbec nezaznamenaly, ale naopak u *m. tibialis anterior* byl úkon registrován a jeho silová interakce během chůze výrazněji narostla (Obr. 3B). Poslední hodnocenou skupinou byly peroneální svaly, kde jsme u obou zaznamenali snížení silových interakcí (Obr. 3C, D).

Z výsledků této studie je zřejmé, že transpozice *m. tibialis posterior* způsobí v oblasti bérce zcela nový stav, na který jednotlivé svaly reagují změnou své silové interakce. Pro zadní sval holenní je tato změna silové interakce nejvýraznější. Z Obr. 3A je patrné, že sval produkuje sílu v zcela jiné fázi cyklu chůze než před transpozicí a jeho svalová síla je v novém postavení mnohem vyšší než v původním stavu. Z dlouhodobého výhledu nemusí být tento nárůst u pacienta zcela kladně přijímán. Sval může být přetěžován, což v konečném důsledku může způsobit ztrátu jeho svalové síly a vznik druhotných deformit nohy. Dále je nutno podotknout, že u pacienta s horší svalovou kondicí *m. tibialis posterior* nemusí

transpozice vést k navrácení dorziflexe. Sval totiž nebude schopen vyprodukovat dostatečně velkou sílu potřebnou k provedení akce.



Obr. 3 Porovnání změny silové interakce hodnocených svalů před a po aplikaci transpozice *m. tibialis posterior*; modře – velikost svalové síly během chůze před transpozicí, červeně – velikost svalové síly během chůze po transpozici

Nárůst svalové síly u *m. tibialis anterior* nebyl tak výrazný jako u předchozího svalu, ale u postiženého může vést i tato skutečnost ke zhoršení stavu (viz např. studie Vertullo a Nunly [19]). Přední sval holenní je jedním ze dvou svalů, které svým postavením udržují příčnou klenbu. Jeho přetěžování může proto v budoucnu vést ke vzniku deformity ve formě ploché nohy.

Poslední hodnocenou skupinou svalů byly peroneální svaly, kterých obrna je velmi častým podnětem k aplikaci transpozice. Důležitým zjištěním této studie je, že po transpozici se jejich svalová síla snížila. Při obrně peroneálních svalů chybí opozice k dorsální skupině svalů v hluboké vrstvě, tudíž noha zůstává v trvalé inverzi. Snížení svalové síly u peroneálních svalů tedy znamená, že transponovaný *m. tibialis posterior* dokáže z části převzít jejich funkci a tím pomoci k obnovení svalové rovnováhy.

Závěr

Cílem této studie bylo odhadnout změny, které vyvolá transpozice *m. tibialis posterior*. Z výsledků numerické simulace je zřetelné, že transfer zmíněného svalu na dorzální stranu chodidla ovlivní kromě jeho samotného i interakce dalších svalových skupin. Nedostatkem této studie může být, že posuzovaným člověkem byl mladý a zdravý muž, který by úkon transpozice nejspíš prodělal bez výraznějších problémů. Na druhou stranu můžeme konstatovat, že zjištění této studie jsou v souladu s dosavadní praxí a ukazují na problémy řešené u reálných pacientů.

Poděkování

Tato práce vznikla v rámci výzkumného záměru TA01010185 „Nové materiály a povrchové vrstvy pro bionický návrh kloubních náhrad“.

Seznam použité literatury

- [1] Salihagić S., Hadziahmetović Z., Fazlić A. (2008) *Bosn. J. Basic. Med. Sci.* 8(2), p. 156
- [2] Ober F. R. (1933) *New Engl. J. Med.* 209, p. 52
- [3] Watkins M. B., Jones J. B., et al. (1954) *J. Bone Joint. Surg. Am.* 36, p. 1181
- [4] Singer M. (1961) *J. Bone Joint. Surg. Br.* 43-B, p. 717
- [5] Richard B. M. (1989) *J. Bone Joint. Surg. Br.* 71(5), p. 834
- [6] Soares D. (1996) *J. Bone Joint. Surg. Br.* 78(1), p. 61
- [7] Yeap J. S., Birch R., Singh D. (2001) *Int. Orthop.* 25(2), p. 114
- [8] Hove L. M., Nielsen P. T. (1998) *Acta Orthop. Scan.* 69(6), p. 608
- [9] Pilný J., Čižmář I., Ehler E., et al. (2009) *Čes. slov. neurol. neurochir.* 72/105(3), p. 279
- [10] Delp S. L., Anderson F. C., et al. (2007) *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 54(11), p. 1940
- [11] Delp S.L., Loan J.P., Hoy M.G., et al. (1990) *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 37, p. 757
- [12] Yamaguchi G.T., Zajac F.E. (1989) *J. Biomech.* 22(1), p. 1
- [13] Zajac F. E. (1989) *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 17(4), p. 359
- [14] Vilímek M. (2007) *Acta Bioeng. Biomech.* 9(2), p. 41
- [15] Hoy M. G., Zajac, F. E., Gordon, M. E. (1990) *J. Biomech.* 23(2), p. 157
- [16] Tsiarakos D., Baltzopoulos V., Bartlett R. (1997) *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 25(4-5), p. 371
- [17] Prilutsky B. I., Zatsiorsky V. M. (2002) *Exerc. Sport. Sci. Rev.* 30(1), p. 32
- [18] Anderson F. C., Pandy M. G. (2001) *J. Biomech.* 34(2), p. 153
- [19] Vertullo C. J., Nunly J. A. (2002) *J. Bone Joint. Surg. Am.* 84, p. 1214

Vplyv prenatálne a perinatálne navodenej hypertenzie na anxiétu a habituáciu laboratórneho potkana v období po odstave, v puberte a dospelosti – predbežná štúdia

Tomáš Senko, Lucia Kršková

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Mlynská dolina B2, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika;
tomas.senky@gmail.com*

Abstrakt

Hypertension is a civilization disease, which etiology is not fully understood. The process of foetal programming plays very important role in development of hypertension. Elevated levels of Angiotensin II (Ang II) and high salty diet in prenatal or perinatal stages could lead to development of hypertension in postnatal life, what includes many physiological and behavioral changes. The aim of our experiment was to observe an influence of prenatally and perinatally induced hypertension on behavioral indicators – anxiety and habituation in *Ratus norvegicus* strain Wistar. We tested animals in three ontogenetic stages (weaning, puberty, adulthood) in the open field test. Elevated levels of Ang II during prenatal stage and high salt diet during perinatal stage caused decrease of anxiotic behavior in both groups in a comparison to normotensive control group. This fact was observed exclusively in adulthood. We did not observe changes in habituation.

Kľúčové slová: hypertenzia; anxieta; habituácia; test otvoreného poľa; prenatálne programovanie.

Úvod a formulácia cieľa

Hypertenzia je ochorenie, ktorého etiológia nie je doposiaľ úplne objasnená. Podľa posledných štúdií [1] zohráva pri jej vzniku dôležitú úlohu aj proces fetálneho programovania. Prenatálny vývin plodu je zložitý proces, ktorý je vo veľkej miere determinovaný genetickou konfiguráciou jedinca, ako aj dostupnosťou nutričných látok, kyslíka, rastových faktorov a hormónov pre matku a vyvíjajúci sa plod [2]. Práve vďaka týmto faktorom môže prísť počas intrauterinného vývinu jedinca k tzv. preprogramovaniu množstva orgánových systémov, čo v konečnom dôsledku môže viesť až k maladaptívnym zmenám [3].

Dôležitú úlohu pri fetálnom programovaní hypertenzie zohráva aktivácia renín-angiotenzín-aldosterónového systému (RAAS) [4]. Jedným z najvýznamnejších komponentov tohto systému je angiotenzín II. Tento hormón účinkuje na viacero sústav a orgánov [5], spôsobuje systémovú a renálnu vazokonstrikciu, ale taktiež zvyšuje reabsorpciu renálneho sodíka [6]. Nie menej dôležité sú jeho behaviorálne účinky [7]. Zvýšené hladiny Ang II sa podieľajú aj na vzniku jedného z najvýznamnejších sprievodných znakov hypertenzie - anxiety [7] a sú spájané aj so vznikom kognitívneho deficitu [8] a zvýšeným príjmom soli [9,

10]. Hlavné biologické účinky tohto hormónu, vrátane behaviorálnych, sú sprostredkované cez dve izoformy receptorov, AT1 a AT2 [6]. Neuroanatomickým miestom anxiogénneho efektu ANG II by mohli byť AT1 a AT2 receptory v amygdale [11], a pravdepodobne tiež AT2 receptory v *locus coeruleus* [12], štruktúrach zapojených do produkcie emócií vrátane anxiety [13].

Zmeny v anxiety boli zaznamenané aj u animálnych modelov hypertenzie SHR a TGR potkanov [14,15]. SHR potkany sú všeobecne popisované ako menej anxiózne ako ich kontrola - LEWIS potkany [14,16]. V porovnaní s WKY potkanmi sa však SHR potkany javia ako anxióznejšie [17]. TGR potkany, ako ďalší model hypertenzie, sa vyznačuje zvýšenou anxiety, ktorá súvisí so zvýšenými hladinami ANG II [18].

Jednou zo základných foriem učenia je habituácia, ktorá odzrkadľuje zrelosť nervovej sústavy [19]. Prejavuje sa poklesom intenzity motorickej zložky exploračného správania [20]. Neuroanatomickým miestom efektu ANG II pre tento proces sú pravdepodobne zmeny v angiotenzínových receptoroch v oblastiach mozgu asociovaných s motorickou aktivitou [11]. Bolo dokázané, že lézie v špecifických väzobných miestach pre ANG II v oblasti *nucleus olivaris* spôsobujú motorický deficit [21]. Výskumy ukázali, že u SHR potkanov je proces habituácie pomalší ako u ich normotenznej kontroly – WKY [17, 22,23].

Keďže je informácií o dôsledkoch ovplyvnenia RAAS v skorých štádiách ontogenézy na postnatálne zmeny v správaní stále nedostatok, stanovili sme si za cieľ našej práce sledovať vplyv prenatálne a perinatálne navodenej hypertenzie na vybrané behaviorálne ukazovatele u potkanov. Svoju pozornosť sme upriamili na anxiety a habituáciu v období odstavu, puberty a dospelosti.

Materiál a metódy

Rodičovskú generáciu predstavovalo 6 samíc a 2 samce kmeňa Wistar, ktoré pochádzali z VELAZ Praha, CZ. Zvieratá boli chované v akreditovanom zverinci Katedry živočíšnej fyziológie a etológie PRIF UK v Bratislave, v plastových klietkach o rozmeroch 57x37x19 cm s hoblinovou podstielkou, v počte 2-3 jedince v jednej klietke. V miestnosti bol zabezpečený regulovaný svetelný režim svetlo : tma 12:12 so začiatkom svetelnej fázy o 6:00 hod. SEČ, priemerná teplota $21 \pm 2^\circ\text{C}$ a relatívna vlhkosť $55 \pm 5 \%$.

Po povinnej 7-dňovej karanténe boli samice - matky rozdelené na základe výsledkov testu otvoreného poľa do troch z hľadiska excitability vyrovnaných skupín: kontrolnej (K: n=2), kontrolnej soľnej (Ks: n=2) a angiotenzínovej (A: n=2). Následne boli pripustené v

pomere 3 samice : 1 samec. Fázu ovulačného cyklu, ako aj graviditu, sme u samíc určili prostredníctvom metódy [24].

Na prenatálne navodenie hypertenzie u A skupiny sme využili vystavenie zvýšeným hladinám Ang II. Perinatálne bola u Ks skupiny hypertenzia vyvolaná príjmom soľnej diéty.

A samiciam sme na 5.-6. deň gravidity implantovali osmotické pumpičky (Alzet model 2002), z ktorých bol Ang II (koncentrácia 19,23 mg/ml vo fyziologickom roztoku) uvoľňovaný kontinuálne, v množstve 10 µg/kg/hod počas 14 dní. K a Ks samice sme na ten istý deň podrobili Sham operácii, počas ktorej sme im implantovali oválny predmet z intaktného materiálu rovnakého tvaru a veľkosti ako alzetová pumpička. Ako narkózu sme použili roztok ketamín (c=135mg/ml) a xylazín (c=18mg/ml). Potom boli zvieratá chované za rovnakých podmienok ako pred zákrokom, a to až do pôrodov.

Po pôrode sme K a Ks vrhy optimalizovali a pod samicou sme ponechali až do odstavu po 8 mláďat (4 samce : 4 samice). Keďže boli A vrhy menej početné (spolu 5 samcov + 3 samice), boli pod matkami ponechané všetky živo narodené mláďatá. Z nich sme však ďalej sledovali už iba 3 samcov a 2 samice, a to z dôvodu úhynu zvyšných jedincov. Každá samica so svojím vrhom mala k dispozícii vlastnú klietku. Vodu a potravu (K /po celú dobu pokusu/, Ks a A /do pôrodu/: štandardná krmná zmes MP-OŠ-06; Ks, A /v období od pôrodu/: štandardná krmná zmes MP-OŠ-06 s 2% koncentráciou NaCl) mali zvieratá k dispozícii *ad libitum*.

Potomstvo (K samce: n=8 , K samice: n=8, Ks samce: n=8, Ks samice: n=8 a A samce: n=3, A samice: n=2) bolo podrobené 20 min. testu otvoreného poľa. Testovanie za využitia aparatury Conducta (Experimatria Ltd., Maďarsko, rozmery komory: 48x48x40cm, podlaha rozdelená na 5x5 štvorcov), prebiehalo v 3 obdobiach ontogenézy: v období odstavu (4. týždeň), v puberte (7. týždeň) a v dospelosti (11. týždeň).

Anxietu sme hodnotili na základe celkovej aktivity (horizontálna + vertikálna motorická aktivita) vo vonkajšej, resp. vnútornej zóne. Habituáciu sme hodnotili za využitia exponenciálnej funkcie $Y(t) = Y_0 e^{-kt}$ (Y= množstvo pohybovej aktivity v jednotlivých 5-minútových intervaloch, k= individuálna miera/rýchlosť habituácie, t= čas pozorovania) [25].

Po dosiahnutí dospelosti bol u všetkých testovaných zvierat meraný systolický krvný tlak neinvazívnou metódou, pomocou zariadenia PowerLab 4/30 (AD Instruments, Nemecko). K zvieratá dosahovali hodnoty systolického tlaku 120 mmHg, Ks 125 mmHg a A 130 mmHg [26].

Sledované formy správania sme hodnotili využitím štatistického softvéru STATISTICA v 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA). Dáta sme analyzovali multifaktorovou

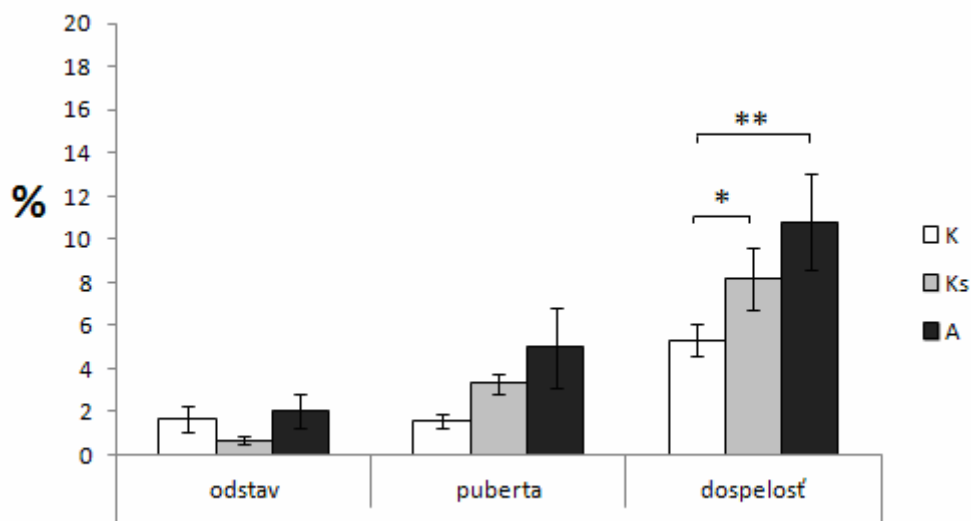
analýzou rozptylu (ANOVA) s opakovaním s fixnými faktormi skupina, pohlavie a vek. Variabilitu medzi vrhmi sme v analýze zohľadnili ako faktor vrhu testovaný v rámci skupiny. V prípade zistenia signifikancie sme dáta následne analyzovali za využitia Fisherovho LSD post hoc testu.

Výskum bol schválený etickou komisiou PRIF UK v Bratislave.

Výsledky a diskusia

V prípade anxiety sme za využitia multifaktorovej analýzy rozptylu zistili signifikantný efekt veku [F(2,56) = 28,79; p < 0,001] a interakcie vek vs. skupina [F(2,56) = 2,79; p < 0,05].

A (p < 0,01), ale aj Ks potkany (p < 0,05) sa javili v dospelosti v porovnaní s K potkanmi ako axióznejšie - trávili menej času vo vnútornej zóne (obr. 1). V období odstavu, ale aj puberty sme signifikantné rozdiely v sledovanej forme správania medzi nami testovanými skupinami nezaznamenali.



Obr. 1 Anxieta vyjadrená percentuálne celkovou aktivitou (horizontálna a vertikálna) strávenou vo vnútornej zóne u kontrolnej (K: n=16), kontrolnej soľnej (Ks: n=16) a angiotenzínovej (A: n=5) skupiny potkanov v teste otvoreného poľa. Hodnoty sú udávané ako priemer ±S.E.M. Hviezdička označuje signifikantnosť rozdielov medzi skupinami (* p < 0,05; ** p < 0,01)

Na základe výsledkov uverejnených Svitokom [26]., ktorý zistil u A a Ks zvierat zvýšené hodnoty systolického krvného tlaku, ako aj na základe údajov o účinkoch zvýšenej hladiny Ang II na anxiétu [8] sme predpokladali, že aj u nami testovaných zvierat príde k jej nárastu, čo sa nám však nepotvrdilo. Zvýšená anxiéta bola zistená aj u animálneho modelu

hypertenzie - TGR potkanov [18], avšak u iného modelu - SHR zvierat prichádzalo podobne ako u nami testovaných A a Ks zvierat k jej zníženiu [16].

Na bližšie objasnenie nami zistených behaviorálnych zmien by bolo potrebné dôkladnejšie štúdium vybraných oblastí CNS, zodpovedných za realizáciu sledovanej formy správania.

Čo sa týka procesu habituácie, dochádzalo k nemu u všetkých nami sledovaných zvierat, pričom v rýchlosti habituácie signifikantné rozdiely medzi testovanými skupinami v žiadnom z nami sledovaných období neexistovali.

U SHR potkanov je podľa dostupných literárnych údajov proces habituácie pomalší ako u ich normotenznej kontroly [17, 22, 23]. Informácie o rýchlosti habituácie v teste otvoreného poľa u TGR potkanov, ako aj informácie o účinkoch zvýšenej hladiny Ang II (cestou injekčnej aplikácie, resp. aplikácie formou osmotickej pumpičky) na tento proces žiaľ v nami dostupnej literatúre absentujú.

Nami získané výsledky mohli byť do určitej miery ovplyvnené nízkym počtom A jedincov. V záujme verifikácie získaných dát, by preto bolo dobré tento experiment zopakovať.

Záver

U nami testovaných jedincov s prenatálne a perinatálne navodenou hypertenziou došlo, v porovnaní s normotenznou kontrolou, k poklesu anxiety v období dospelosti. Rozdiely v rýchlosti habituácie sme nezistili.

Pod'akovanie

Tento projekt bol zrealizovaný vďaka grantu VEGA 1/0686/12 a VEGA 2/0107/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Zandi-Nejad K., Luyckx V. A., Brenner B. M. (2006) Hypertension 47(3), p. 502
- [2] Štefan Bezek Š., Mach M., Dubovický M., et al. (2008) Asklepios, Bratislava, p. 3
- [3] Bellingham-Young D.A., Adamson-Macedo E.N. (2003) Neuroendocrinol. Lett. 24(6), p. 412
- [4] Sherman R. C., Langley-Evans S. C. (2000) Clin. Sci. 98, p. 269
- [5] Silbernagl S., Despopoulos (1993) Atlas fyziologie člověka. Grada, Praha, p. 352
- [6] Brewster U. C., Perazella M. A. (2004) Am. J. Med. 116(4), p. 263

- [7] Braszko J. J., Kulakowska A., Winnicka M. M. (2003) *J. Physiol. Pharmacol.* 54(2), p. 271
- [8] Saavedra M. (2005) *Cell. Mol. Neurobiol.* 25(4), p. 485
- [9] Takata Y., Yamashita Y., Takishita S., et al. (1986) *Clin. Exp. Hypertens.* 8(7), p. 1149
- [10] Dinicolantonio R., Hutchinson J. S., Mendelsohn F. A. O. (1982) *Nature* 298, p. 846
- [11] Tsutsumi, K., Saavedra, J. M. (1991) *Am. J. Physiol.* 261(1), p. 209
- [12] Okuyama S., Sakagawa T., Inagami T. (1999) *Jpn. J. Pharmacol.* 81(3), p. 259
- [13] Nutt D. J., Glue P. (1989) *Pharmacol. Ther.* 44(3), p. 309
- [14] Gentsch C., Lichtsteiner M., Feer H. (1987) *Behav. Brain Res.* 25(2), p. 101
- [15] Kršková L., Vrabcová M., Talarovičová A., Zeman M. (2009) *Acta Biol Hung* 60(4), p. 369
- [16] Ramos A., Mellerin Y., Morme`de P., Chaouloff F. (1998) *Behav. Brain. Res.* 96(1-2), p. 195
- [17] Kruchenko Z. A. (2006) *Fiziol. Zh.* 52(4), p. 51
- [18] Wilson W., Voight P., Bader M., et al. (1996) *Brain. Res.* 729(1), p. 1
- [19] Leussis M. P., Bolivar V. J. (2006) *Neurosci. Biobehav. R.* 30(7), p. 1045
- [20] Meneses A., Castillo C., Ibarra M., Hong E. (1996) *Physiol. Behav.* 60(2), p. 341
- [21] Walters D. E., Speth R. C. (1988) *J. Neurochem.* 50(3), p. 812
- [22] Powell D. A., Buchanan S. L., Hernandez L. L. (1991) *Prog. Neurobiol.* 36(3), p. 201
- [23] Svensson L., Harthon C., Linder B. (1991) *Physiol. Behav.* 49(4), p. 661
- [24] Gleich J., Froberg H. In: Neubert D., Merker H. J., Kwasigroch T. E. (1977) *Methods in Prenatal Toxicology*. Georg Thieme Publishers, Stuttgart, p. 94
- [25] Dubovický M., Ježová D. (2004) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1018, p. 199
- [26] Svitok P. (2012) *Dôsledky fetálnych manipulácií na reguláciu tlaku krvi v dospelosti u potkanov*. (Diplomová práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p. 47

Štúdium významu metabolickej dráhy syntézy tetrapyrolov v procese vybielovania euglén

Aneta Šidíková¹, Lucia Hadariová¹, Miroslav Oborník², Juraj Krajčovič¹

¹Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, Mlynská dolina, 84215 Bratislava, Slovenská republika; aneta.sidikova@gmail.com

²Biologické centrum AV ČR, v.v.i., Parazitologický ústav, Laboratoř evoluční protistologie, Branišovská 31, 37005 České Budějovice, Česká republika

Abstrakt

A bleaching process in *Euglena gracilis* is accompanied by the loss of plastid DNA, but some of the genes are retained. In present, we do not understand why is it so. The answer for this question should be, that products of these genes could be used in other metabolic pathways, for example the tetrapyrrole (heme) synthesis metabolic pathway. By observing the influence of streptomycin on non-photosynthesizing *Euglena longa* (close relative to *Euglena gracilis* with reduced plastome) culture growth with addition of hemin in medium, it is possible to prove or contradict the importance of heme synthesis pathway in bleaching process. Our findings indicate that this hypothesis of plastid genes retaining could be justified.

KLúčové slová: vybielovanie; syntéza tetrapyrolov; plastóm; *Euglena longa*; *Euglena gracilis*

Úvod a formulácia cieľa

Vybielovanie buniek *Euglena gracilis* je fenoménom, pri ktorom pod vplyvom antibakteriálnych látok sa pôvodne zelené bunky stávajú bielymi, pričom dochádza k strate funkčných chloroplastov a degradácii plastidového genómu. [1]. Niektoré gény zostávajú v plastóme trvalo zachované, napriek odlišným mechanizmom účinku bieliacich agens (rôzne typy antibiotík, UV žiarenie, zvýšená teplota a pod.). Na otázku prečo si bunky euglén zachovávajú niektoré plastidové gény, v súčasnosti neexistuje uspokojivá odpoveď. Uvažuje sa o zapojení plastidových génov a plastidov do rôznych metabolických dráh. Medzi najviac spomínané metabolické dráhy v súvislosti s neúplnou stratou plastómu v procese vybielovania patria metabolické dráhy biosyntézy tetrapyrolov, isoprenooidov a mastných kyselín.

Metabolická dráha syntézy hému je jedna z najdôležitejších metabolických dráh u živých organizmov. Produkuje prekursor pre syntézu hému, cytochrómov, fotosyntetických pigmentov a vitamínu B12. Hlavným prekursorom syntézy všetkých tetrapyrolov je δ -aminolevulinová kyselina (ALA). ALA môže byť syntetizovaná 2 spôsobmi a to: konverziou glutamyl-tRNA^{Glu} na ALA prostredníctvom dvoch enzýmov (C5 dráha) alebo syntézou sukcinyl-koenzýmu A a glycínu prostredníctvom enzýmu ALA-syntázy (C4 dráha, Sheminova dráha) [2]. U primárnych heterotrofov a α -proteobaktérií [3] je dráha

biosyntézy hému lokalizovaná v mitochondriách a cytosole a ALA je syntetizovaná C4 dráhou. U fotosyntetizujúcich eukaryotov dochádza k formovaniu ALA prostredníctvom C5 dráhy [4], ktorá je lokalizovaná v chloroplastoch a tRNA^{Glu} je kódovaná práve plastidovým genómom. Časť dráhy však môže byť premiestnená do mitochondrie a u niektorých organizmoch nadobúda mozaikový charakter [5].

E. gracilis má unikátny spôsob syntézy ALA, pretože využíva C4 aj C5 dráhu a má obe separátne dráhy syntézy tetrapyrolov – plastidovú pre produkciu chlorofylu a hému pre plastid, aj mitochondriovo-cytosolovú pre produkciu hému pre celú bunku [6].

Euglena longa je blízko príbuzná k *E. gracilis* a považuje sa za prírodne vybielenú euglénu. Veľkosť jej plastómu a aj počet plastidových génov dosahuje približne polovicu plastómu *E. gracilis* [7,8]. *E. longa* má zachovaný vo svojom plastóme práve aj gén pre tRNA^{Glu} [7], ktorý sa nachádza na počiatku metabolickej dráhy biosyntézy hému v plastidoch [3]. *E. longa*, na rozdiel od *E. gracilis*, však po pôsobení bieliacich agens nie je schopná strácať ďalšie gény, a po čase hynie [9]. Práve z tohto dôvodu je *E. longa* vhodným kandidátom na štúdium významu metabolickej dráhy syntézy tetrapyrolov.

Cieľom tohto projektu je zistiť, či má metabolická dráha syntézy tetrapyrolov význam v zachovávaní plastidových génov v procese vybielovania *E. gracilis*.

Materiál a metódy

Kultúry *Euglena longa* boli pestované staticky na 24-jamkovej platničke v 1,5 ml modifikovaného Cramer-Meyersovho média (pH = 6,8) [10] s pridaným etanolom (0,8 %) pri teplote 25 °C a vo svetelnom režime svetlo: tma = 12: 12 hodín.

Počiatkové dve kultúry boli naočkované na koncentráciu 5000 buniek/ ml. Počet buniek bol stanovený pomocou Bürkerovej komôrky. V exponenciálnej fáze rastu (5. deň) sa do jednej z kultúr pridal streptomycín (výsledná konc. v médiu = 173 µM). Po 48 hodinách sa kultúry preočkovali do nového média opäť na konc. buniek 5000 b/ ml, pričom z kultúry ovplyvnenej streptomycínom sa naočkovali nové kultúry, ktorým sa do média pridávali okrem streptomycínu aj záchranné látky vo finálnej koncentrácii: 10 µM hemín, 15 µM hemín, 20 µM hemín a 30 µM hemín.

Výsledky a diskusia

Kultúra ovplyvnená streptomycínom vykázala spomalený rast hneď na nasledujúci deň po ovplyvnení. Po 48 hodinách v čase preočkovania na ďalší týždeň a v čase založenia

nových kultúr dosahovala hustotu buniek rovnajúcu sa 61,5 % hustoty buniek neovplyvnenej kontrolnej kultúry. Ďalší týždeň počet buniek v kultúre nepresiahol množstvo 2×10^4 buniek/ml.

Kultúra ovplyvnená streptomycínom s prídavkom $10 \mu\text{M}$ hemínu 4 dni vykazovala narastajúce množstvo buniek a dosiahla hustotu buniek rovnajúcu sa 37,5 % z hustoty buniek kontroly v ten deň. V 5. deň sme pozorovali náhly pokles, V 6. deň došlo k veľmi malému nárastu počtu buniek. Toto množstvo buniek si udržala aj do nasledujúceho dňa.

Kultúra ovplyvnená streptomycínom s prídavkom $15 \mu\text{M}$ hemínu mala tendenciu narastajúceho množstva buniek až do 6. dňa, kedy dosahovala 15,6 % počtu buniek kontroly v daný deň. Nasledujúci deň došlo k výraznému poklesu počtu buniek v tejto kultúre.

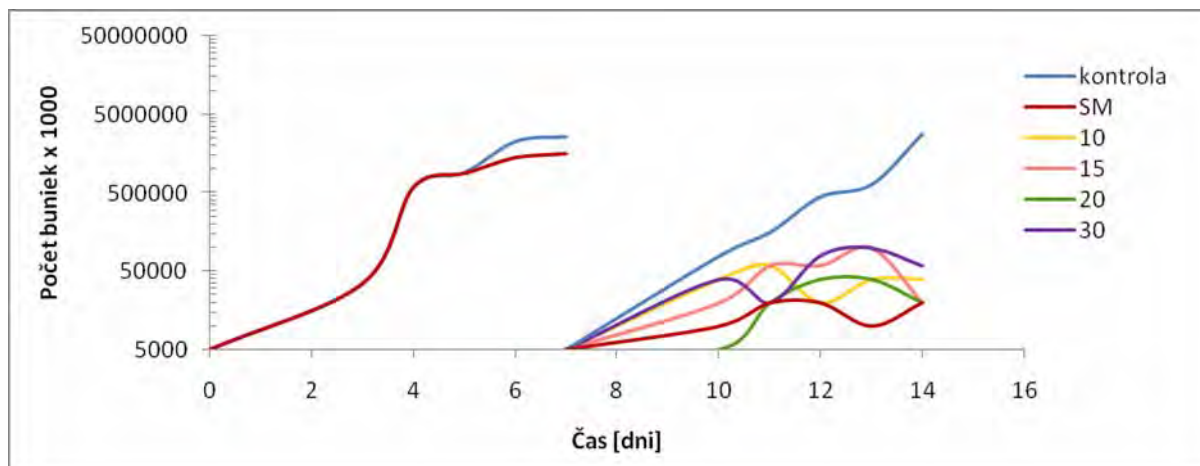
Kultúra ovplyvnená streptomycínom a pridaným $20 \mu\text{M}$ hemínom vykázala v priebehu týždňa veľmi malý nárast počtu buniek, ktorý bol neporovnateľný s kontrolou, a vrcholom rastu bol 5. a 6. deň. V posledný deň týždňa došlo k poklesu počtu buniek aj tu.

Kultúra ovplyvnená streptomycínom a pridaným $30 \mu\text{M}$ hemínom mala spočiatku rastúcu tendenciu počtu buniek, v 4. deň došlo k poklesu počtu buniek. V 5. deň sme pozorovali nárast, ktorý si udržala do 6. dňa, kedy dosiahla hustotu buniek rovnajúcu sa 15,6 % hustoty buniek kontroly v daný deň. Nasledujúci deň došlo k poklesu.

Počet buniek v jednotlivých kultúrach zobrazuje Tabuľka 1 a priebeh rastu vybraných kultúr znázorňujú rastové krivky na Obr. 1.

Tab. 1 Počet buniek na 1 ml média v jednotlivých kultúrach v rôznych časových intervaloch. Ružové označenie upozorňuje na moment ovplyvnenia dovtedy neovplyvnenej kultúry $173 \mu\text{M}$ streptomycínom

	0. deň	3. deň	4. deň	5. deň	6. deň	7. deň
kontrola	5×10^3	$3,6 \times 10^5$	6×10^5	$9,2 \times 10^5$	$2,28 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$
173 μM SM	5×10^3	$3,6 \times 10^5$	$5,7 \times 10^5$	9×10^5	$1,4 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$
	7. deň	10. deň	11. deň	12. deň	13. deň	14. deň
kontrola	5×10^3	8×10^4	$1,6 \times 10^5$	$4,4 \times 10^5$	$6,4 \times 10^5$	$2,8 \times 10^6$
173 μM SM	5×10^3	1×10^4	2×10^4	2×10^4	1×10^4	2×10^4
10 μM hemín	5×10^3	4×10^4	6×10^4	2×10^4	4×10^4	4×10^4
15 μM hemín	5×10^3	2×10^4	6×10^4	6×10^4	1×10^5	2×10^4
20 μM hemín	5×10^3	5×10^3	2×10^4	4×10^4	4×10^4	2×10^4
30 μM hemín	5×10^3	4×10^4	2×10^4	8×10^4	1×10^5	6×10^4



Obr. 1 Rastové krivky.

Rastové krivky vybraných kultúr vyjadrujúce nárast alebo pokles počtu buniek na 1 ml v čase. SM – kultúra ovplyvnená iba streptomycínom; 10 - ovplyvnená kultúra s pridaným 10 μM hemínom; 15 - ovplyvnená kultúra s pridaným 15 μM hemínom; 20 - ovplyvnená kultúra s pridaným 20 μM hemínom 30 – ovplyvnená kultúra s pridaným 30 μM hemínom

Z výsledkov je možné vyčítať, že prítomnosť hemínu v médiu má čiastočne pozitívny vplyv na rast kultúr, keďže takmer u všetkých bol pozorovaný mierny nárast v porovnaní s kultúrou, do ktorej bol pridávaný len streptomycín. Priebeh rastu jednotlivých kultúr fluktuuje. Je možné, že v stacionárnych podmienkach niektoré bunky *E. longa* nedokážu efektívne zachytiť, prípadne využiť hemín z média. V prípade, že by boli kultúry kultivované za stáleho miešania, mohlo by dôjsť k zvýšeniu účinnosti hemínu a k zlepšeniu rastu kultúr. Preto sú potrebné ďalšie analýzy.

Záver

Výsledky nášho experimentu naznačujú, že by metabolická dráha syntézy tetrapyrolov mohla mať význam v zachovaní redukovaného plastidového genómu v procese vybielovania *E. gracilis*.

Pod'akovanie

Naše pod'akovanie patrí laboratóriu doc. Oborníka na Parazitologickom ústave AV ČR v Českých Budějoviciach za spoluprácu pri tomto projekte a grantu UK/275/2013.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Krajčovič J., Ebringer L., Schwartzbach S. D. (2002) Reversion of endosymbiosis? The case of bleaching in *Euglena*. *Symbiosis: Mechanism and Model Systems*, J.

- Seckbach (Ed.), Kluwer Acad. Publ., Dodrecht, The Netherlands, p. 185
- [2] Ferreira G. C., Gong J. (1995) *J Bioenerg Biomembr.* 27, p. 151
 - [3] Panek H., O' Brian M. R. (2002) *Microbiology.* 148, p. 2273
 - [4] Schulze J. O., Schubert W. D., Moser J., et al. (2006) *J Mol Biol.* 358, p. 1212
 - [5] Oborník M., Green B. R. (2005) *Mol Biol Evol.* 22, p. 2343
 - [6] Kořený L., Oborník M. (2011) *Genome Biol Evol.* 3, p. 359
 - [7] Gockel G., Hachtel W. (2000) *Protist.* 151, p. 347
 - [8] Hallick R.B., Hong L., Drager R.G., et al. (1993) *Nucleic Acid Res.* 21, p. 3537
 - [9] Krajčovič J. - osobná komunikácia
 - [10] Cramer M., Myers J. (1952) *Arch. Mikrobiol.* 17, p. 384

Rozdiely v bielkovinovom obraze kľúčnych rastlín kukurice (*Zea mays* L.) v podmienkach zasolenia, pod vplyvom kremíka a zinku

Lenka Šimková¹, Zuzana Kochanová², Miroslava Luxová²

¹Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyziológie rastlín, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, SR; sprekelia@gmail.com

²Slovenská akadémia vied, Botanický ústav, Oddelenie fyziológie rastlín, Dúbravská cesta 9, 845 23 Bratislava, SR

Abstrakt

Recently, soil salinity is a serious environmental problem, which reduces productivity of crops. Still greater area of land is affected by salinity. High concentration of ions in cytoplasm is generally toxic for metabolism of plants. Increased salt contentation has a significant effect on proteosynthesis. Proteins participate in stabilization of the cell structure and transport of ions. A great effort is payed to reduction of inhibitory effects of salinity in plants. Application of specific active substance reduces negative effects of NaCl on growth of plants. Silicon is not considered an essential element, but it is confirmed that silicon reduces biotic and abiotic stress. Zinc is a biogenic element that is toxic in high concentrations for plants. We observed effects of silicon and two concentrations of zinc on the protein content of maize seedlings in conditions of salinity. Maize is one of economically most important crops. We compared tree hybrids of maize. Salt, silicon and zinc caused changes in protein content.

Kľúčové slová: Bielkoviny; kremík; stres; zasolenie; zinok.

Úvod a formulácia cieľa

Stúpajúca salinita pôd je v súčasnosti jedným z najzávažnejších poľnohospodárskych problémov. Najvýraznejšie sa prejavuje pri suchej a zavlažovanej pôde, v ktorej koncentrácia minerálov stúpa. Zasolením je zasiahnutá stále väčšia plocha poľnohospodársky využívannej pôdy [1]. Zvýšená salinita pôd má za následok zníženú tvorbu biomasy rastlín a pokles rastlinnej produkcie. Vzhľadom na rast ľudskej populácie to predstavuje závažný problém [2]. Negatívny vplyv zasolenia spočíva v osmotickom účinku, keď rastliny trpia fyziologickým suchom a toxickým účinku, ktorý vyplýva z narušenia iónovej rovnováhy. Toxický vplyv je spôsobený predovšetkým hromadením Na⁺ [3].

Kremík (Si) je jedným z najhojnejšie sa vyskytujúcich prvkov v zemskej kôre. Je známe, že zmiernuje negatívny dopad biotického aj abiotického stresu na rastliny. Presný mechanizmus, ako sa kremík zapája do metabolizmu rastlín vystavených stresu stále nie je známy [4]. Napriek tomu, že kremík je prirodzenou súčasťou všetkých vyšších rastlín, priemerne tvorí 1-10 % sušiny, nie je klasifikovaný ako ich biogénny prvok [5].

Zinok je súčasťou množstva enzýmov a transkripčných faktorov. Napriek tomu sú jeho vysoké koncentrácie pre rastliny toxické [6]. Vo vhodnej koncentrácii Zn zmiernuje

dôsledky oxidačného stresu, zvyšuje aktivitu antioxidantných enzýmov a stabilizuje membrány [7].

V našej práci sme sa zaoberali vplyvom Si (2,5 mM) na stres spôsobený zasolením (150 mM NaCl) a jeho interakciou s dvomi rôznymi koncentraciami zinku (50 μ M, 500 μ M Zn). Sledovali sme zmeny v obsahu rozpustných bielkovín a zmeny v bielkovinovom obraze v koreni a koleoptile kukurice.

Materiál a metódy

Ako biologický materiál sme použili kukuricu siatu (*Zea mays* L. hybridy Almansa, Novania, Valentína). Semená klíčili 72 h v tme pri 26°C. Klíčne rastliny sme pestovali v Hoaglandovom živnom roztoku [8]. Pracovali sme s 12 variantmi, ktoré sa líšili obsahom NaCl, Si a Zn: 1 - kontrola, 2 - 50 μ M Zn, 3 - 500 μ M Zn, 4 - 2,5 mM Si, 5 - 50 μ M Zn + 2,5 mM Si, 6 - 500 μ M Zn + 2,5 mM Si, 7 - 150 mM NaCl, 8 - 150 mM NaCl + 50 μ M Zn, 9 - 150 mM NaCl + 500 μ M Zn, 10 - 150 mM NaCl + 2,5 mM Si, 11 - 150 mM NaCl + 50 μ M Zn + 2,5 mM Si, 12 - 150 mM NaCl + 500 μ Zn + 2,5 mM Si. pH roztokov sme upravili na 6 – 6,2. Každý variant obsahoval 30 rastlín. Klíčne rastliny sme pestovali v termostate pri teplote 25°C v tme, 24 a 48 h.

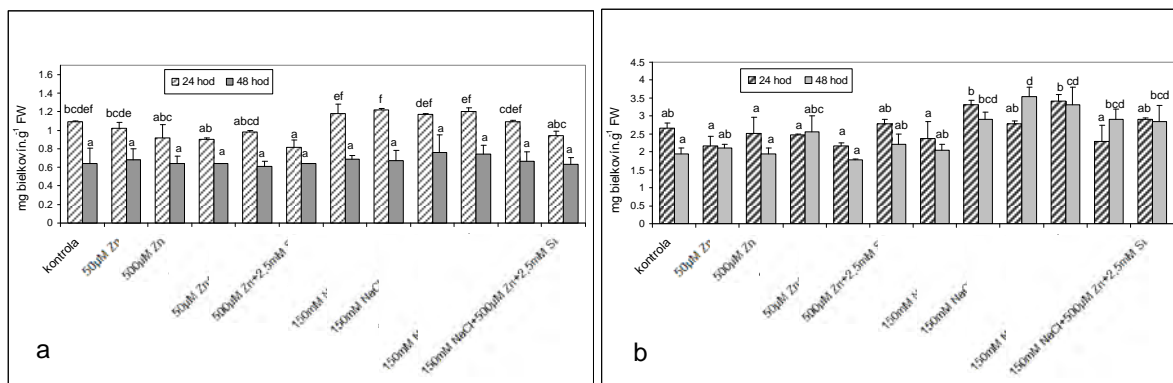
Odoberali sme koreň a koleoptilu. Vzorky (0,5 g) sme homogenizovali v tekutom dusíku a následne trelí s extrakčným činidlom (Na-fosfátový pufo, pH 7,3 pre koleoptilu a pH 7,8 pre koreň), filtrovali a centrifugovali pri 12 000 g 20 min. Supernatant sme prečistili gélovou filtráciou na kolóne Econo-Pack 10 DG. Obsah bielkovín v supernatante sme stanovili Bradfordovej metódou [9] použitím BSA ako štandardu. Bielkoviny sme separovali anodicou SDS-PAGE [10] a vizualizovali pomocou farbenia striebrom [11]. Údaje sme štatisticky vyhodnocovali pomocou programu Statgraphics (LDS test).

Výsledky a diskusia

Pozorovali sme odlišný vplyv kremíka, 50 μ M a 500 μ M koncentrácie zinku a NaCl na obsah rozpustných bielkovín v koreni a koleoptile. Rovnako sme pozorovali rôzny obsah bielkovín medzi rovnakými variantmi troch rôznych hybridov kukurice. Z toho vyplýva, že použité tri hybridy, Almansa, Novania a Valentína nie sú rovnako citlivé na pôsobenie soli, Zn a Si.

V koreni sme po 24 hodinách zaznamenali preukazný rozdiel v porovnaní s kontrolou, v obsahu rozpustných bielkovín, len v hybride Almansa, vo variante 500 μ M Zn + 2,5 mM Si

(Obr. 1). V rovnakom variante hybridu Valentína sme pozorovali, po rozdelení rozpustných bielkovín pomocou SDS-PAGE, kvantitatívny nárast množstva bielkovín s molekulovou hmotnosťou 137,4 kDa. V ostatných hybridoch sme zmeny nepozorovali.



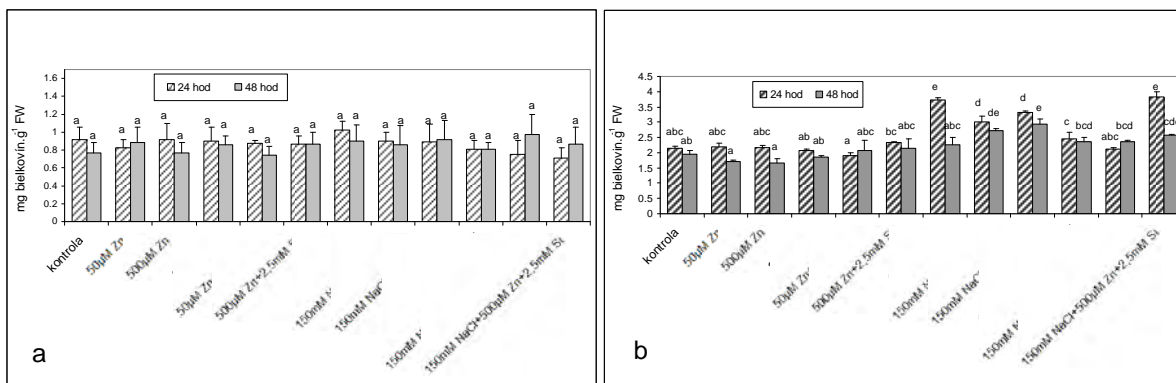
Obr. 1 Obsah rozpustných bielkovín v koreni (a) a koleoptile (b) kukurice (hybrid Almansa)

Po 48 hodinách sme pozorovali nárast obsahu bielkovín vo variante obsahujúcom NaCl pri všetkých troch hybridoch, ale rozdiel v porovnaní s kontrolou nebol štatisticky preukazný. Kvantitatívny nárast bielkovín s molekulovou hmotnosťou 58,74 kDa sme v porovnaní s kontrolou pozorovali len pri hybride Valentína.

V koleoptile sme zaznamenali výraznejšie rozdiely ako v koreni. Po 24 h sme pozorovali v rôznych variantoch akumuláciu izozýmov bielkovín s molekulovou hmotnosťou 137,4 kDa vo všetkých troch hybridoch.

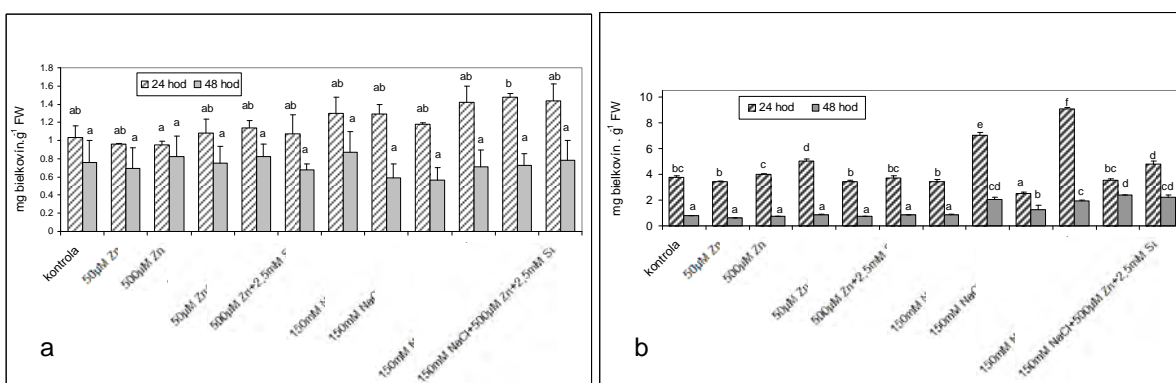
V hybride Almansa sme, po 24 hodinách, zaznamenali kvantitatívny nárast v obsahu rozpustných bielkovín vo všetkých variantoch, ktoré obsahovali okrem NaCl aj Zn alebo Si.

V hybride Novania sme zaznamenali väčší počet rozdielov. Na rozdiel od Almansy a Valentíny sme zaznamenali preukazný nárast v obsahu bielkovín vplyvom NaCl. Varianty obsahujúce NaCl aj Zn, obsahovali viac bielkovín ako kontrola, ale menej ako NaCl bez Zn. Medzi variantmi s NaCl, ktoré obsahovali 50 a 500 μM Zn, nebol štatisticky preukazný rozdiel. Varianty obsahujúce NaCl, Si aj Zn sa preukázane nelíšili od kontroly, okrem variantu obsahujúceho 150 mM NaCl + 500 μM Zn + 2,5 mM Si (**Obr. 2**).



Obr. 2 Obsah rozpustných bielkovín v koreni (a) a v koleoptile (b) kukurice (hybrid Novania)

Hybrid Valentína, bol ako jediný, z nami skúmaných hybridov, citlivý na prítomnosť 2,5 mM Si. Kvantitatívny nárast v obsahu bielkovín sme zaznamenali okrem variantu s aj bez prítomnosti NaCl a Si aj vo variantoch s obsahom NaCl + 50 µM Zn a NaCl + 2,5 mM Si + 500 µM Zn. Je zaujímavé, že vo variante NaCl + 500 µM Zn sme zaznamenali pokles koncentrácie bielkovín v porovnaní s kontrolou (**Obr. 3**). Vo variante s obsahom 150 mM NaCl + 2,5 mM Si sme pozorovali akumuláciu izozýmov bielkovín s malou molekulovou hmotnosťou. V tomto hybride sme pozorovali aj pokles akumulácie izozýmov bielkovín s hmotnosťou 137,4 kDa sme zaznamenali vo variantoch s 50 µM Zn a 50 µM Zn + 2,5 mM Si. Zmeny v bielkovinovom obraze medzi kontrolou a variantmi s obsahom NaCl a Si pozorovali aj Šestková a kol. [12].



Obr. 3 Obsah rozpustných bielkovín v koreni (a) a v koleoptile (b) kukurice (hybrid Valentína)

V koleoptile, po 48 hodinovom pôsobení stresu sme pozorovali v hybride Almansa málo štatisticky preukazných rozdielov. Nezaznamenali sme preukazný rozdiel medzi variantmi s obsahom NaCl a Si alebo 50 Zn µM, ale variant obsahujúci NaCl, Si aj 50 µM Zn obsahoval kvantitatívne nižší obsah bielkovín.

Hybrid Novania, podobne ako po 24 aj po 48 hodinách akumuloval preukazné vyšší obsah bielkovín v dôsledku pôsobenia NaCl v porovnaní s kontrolou. Zaznamenali sme to pri variante 150 mM NaCl + 500 μ M Zn + 2,5 mM Si. Varianty 150 mM NaCl + 50 alebo 500 μ M Zn akumulovali preukazne vyšší obsah bielkovín nielen v porovnaní s kontrolou, ale aj 150 mM NaCl (**Obr. 2**).

Pri hybride Valentína sme zaznamenali kvantitatívny nárast bielkovín vo všetkých variantoch s NaCl, obsahujúcich Zn, Si alebo aj Si aj Zn v porovnaní s kontrolou aj variantom obsahujúcim len NaCl. Rozdiel sme zaznamenali aj medzi variantmi obsahujúcimi NaCl a 500 μ M Zn, ale líšiacimi sa obsahom Si. Variant s obsahom Si mal preukazne vyššiu koncentráciu bielkovín. Pri hybride Valentína sme pozorovali aj kvalitatívne zmeny niektorých izozýmov bielkovín, ktoré sa vo variantoch bez obsahu Zn a Si neakumulovali vôbec, zatiaľ čo v ostatných variantoch sa akumulovali. Vyššia koncentrácia Zn (500 μ M) vyvolávala v bielkovinovom obraze výraznejšie zmeny v porovnaní s kontrolou ako nižšia koncentrácia (50 μ M). Naše výsledky sú v súlade s pozorovaniami, že Zn môže mať vplyv na rast rastlín kukurice (*Z. mays* L.) [13].

Záver

Najväčší počet zmien sme pozorovali pri bielkovinovom obraze koleoptily po dlhšom, teda 48 hodinovom, pôsobení stresu. Najviac zmien bolo pozorovateľných v kvalitatívnom zastúpení izozýmov bielkovín s molekulovou hmotnosťou 137,4 kDa.

Rovnako, viac štatisticky preukazných rozdielov v obsahu bielkovín sme zaznamenali v koleoptile. Vo variantoch pestovaných 24 hodín sme zaznamenali zväčša vyšší obsah rozpustných bielkovín. Pridanie kremíka k rastlinám pestovaným v 150 mM NaCl preukazne zvýšilo obsah bielkovín v hybridoch Almansa aj Valentína v koleoptile po 24 aj 48 hodinách. Pôsobenie zinku malo tiež výraznejší vplyv na koleoptilu ako na koreň. Výraznejšie rozdiely spôsobené vplyvom Zn sme pozorovali v koleoptile po 24 hodinovom pôsobení. Rozdiel vplyvu 50 a 500 μ M sa líšil podľa hybridu, v ktorom sme ho pozorovali. Pri hybride Novania sme v porovnaní s kontrolou zaznamenali najmenej preukazných rozdielov.

PodĎakovanie

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0140-10 a projektom VEGA 2/0022/13.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Meloni D. A., Gulotta M. R., Martínéz C. A., et al. (2004) *Braz. J. Plant Physiol.* 16(1), p. 39
- [2] Yamaguchi T., Blumwald E. (2005) *Trends Plant Sci.* 10(12), p. 615
- [3] Matoh t., Kairusmee P., Takahashi E. (1986) *Soil Sci. Plant Nutr.* 32(2), p. 295
- [4] Ma J. F. (2004) *Soil Sci. Plant Nutr.* 50(1), pp. 11
- [5] Epstein E. (1994) *PNAS.* 91(1), p. 11
- [6] Aravind P., Prasad M. N. V. (2004) *Plant Sci.* 166(5), p. 1321
- [7] Aravind P., Prasad M. N. V. (2003) *Plant Physiol. Biochem.* 41(4), p. 391
- [8] Hoagland D. R., Arnon D. I. (1950) *Circ.* 347. Univ. of Calif. Agric. Exp. Station, Berkeley, p. 1
- [9] Bradford M. M. (1976) *Anal. Biochem.* 72(1-2), p. 248
- [10] Leammi U. K. (1970) *Nat.* 277(5234), p. 673
- [11] Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., et al. (1996) *Anal. Chem.* 68(5), p. 850
- [12] Šestková E., Jašková K., Luxová M. (2010) XII. Konference Experimentální Biologie Rostlin, Sborník abstraktů, Praha, CZ, p. 151
- [13] Bokor B., Vaculík M., Pavlovič, A., et al. (2010) XII. Konference Experimentální Biologie Rostlin, Sborník abstraktů, Praha, CZ, p. 141

Molekulárna a morfológická analýza podeniiek (Ephemeroptera: Leptophlebiidae: Atalophlebiinae) z Venezuely

Darina Šípošová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra ekológie, Mlynská dolina, 824 15 Bratislava, Slovensko; siposova.darina@gmail.com

Abstrakt

The material of 57 samples of mayfly larvae and adults from the family Leptophlebiidae, collected in the Guayana region in south-eastern Venezuela in 2005, 2007, 2009, 2010 and 2011 was studied. Mitochondrial DNA from 19 nymphs and 6 adults was extracted, amplified and sequenced. The nymphs were morphologically similar to the genus *Paramaka* (Leptophlebiidae, Atalophlebiinae), but some characters (e.g. shape of labrum) indicated that there could be a new genera in the studied material. However, the results of mtDNA analysis did not confirm this assumption. Morphological analysis showed that there are several species presented, and one of them is unknown and undescribed. Nymphal and male adult diagnostic characters are described.

Kľúčové slová: podenky; Ephemeroptera; *Hermanella* komplex; *Paramaka*; Venezuela

Úvod a formulácia cieľa

V Južnej Amerike je opísaných viac ako 450 druhov podeniiek patriacich do 100 rodov a 15 čeľadí. Z Venezuely bolo donedávna známych len okolo 33 druhov (7,5 % juhoamerickej fauny) reprezentujúcich 20 rodov a 6 čeľadí [1]. Systematické poznatky o faune podeniiek Venezuely sú veľmi obmedzené, aj keď v posledných rokoch pribudlo viacero nových taxónov, hlavne z čeľadí Baetidae a Leptophlebiidae [2, 3].

Typickými zástupcami podeniiek v oblasti Guayanskej vysočiny sú zástupcovia komplexu rodov *Hermanella* (čeľaď Leptophlebiidae). Tento komplex zahŕňa niekoľko rodov charakteristických silno modifikovanými a zväčšenými ústnymi orgánmi [4]. Jedným z komplexu je rod *Paramaka* opísaný Savagem & Domínguezom (1992) [5] pre druh *Thraulius convexus*, ktorý bol opísaný Spiethom (1943) z 2 imág zo Surinamu [6]. Blanco-Belmonte & Peters (2003) opísali nymfu druhu *Paramaka convexa* [7]. Sartori (2005) opísal z Guyany na základe lariev druh *Paramaka antonii* [4]. Zatiaľ posledným opísaným druhom je *Paramaka pearljam* z Brazílie, u ktorého sú známe larvy aj imága [8].

Cieľom práce bolo pomocou kombinácie molekulárnych metód a morfológickej analýzy odlíšiť taxóny (rody a druhy) v rámci komplexu rodov *Hermanella* a prípadne opísať doteraz neznáme taxóny. Cieľom bolo aj overiť hypotézu, či morfológicky odlišné jedince, vyznačujúce sa extrémne širokým labrom lariev a atypickým penisom imág, patria k novému, doteraz neznámemu rodu.

Materiál a metódy

Materiál bol zozbieraný v juhovýchodnej Venezuele v rokoch 2005, 2007, 2009, 2010, 2011. Larvy boli zbierané pomocou hydrobiologickej sieťky a okrídlené štádiá boli odchytené smýkaním pobrežnej vegetácie a na svetelnú pascu. Materiál bol na mieste fixovaný 97% etanolom.

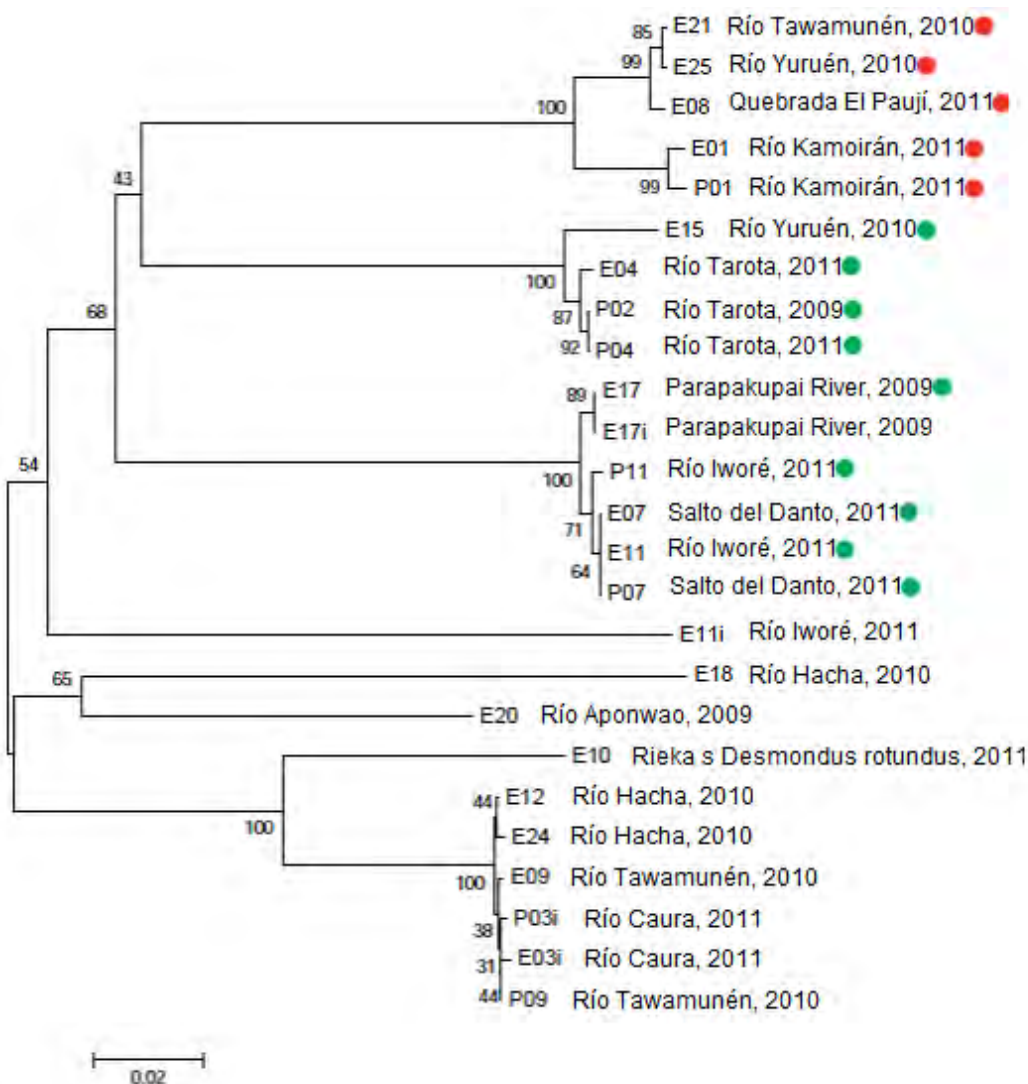
Na izoláciu mtDNA bol použitý extrakčný kit [Bench Protocol: Animal Tissues (Spin-Column Protocol)] od firmy Qiagen. Pred samotnou extrakciou boli larvy ponechané na filtračnom papieri v izbovej teplote na odparenie 97% etanolu. Cez PCR reakciu bol amplifikovaný fragment mitochondriálneho génu COI (subjednotka cytochrom c oxidázy). Sekvencie pre COI boli amplifikované pomocou primerov LCO1490 a HCO 2198 [9]. PCR prebiehala v termocykléri (Vapo.protect, Eppendorf) v trojhodinovom intervale za nasledovných podmienok: 2'94°C– 38x(40s 94°C–40s 45°C–1'72°C)–10'72°C. Po prebehnutí gélovej elektroforézy (PowerPac Basic, BIO-RAD) bol PCR produkt vizualizovaný v 1% agarózovom gély v UV transluminátore (Gel Logic 2/2 PRO, Carestream). PCR produkty boli odoslané na purifikáciu a sekvenovanie do externého laboratória (Macrogen Europe Inc., Amsterdam, Holandsko). Získané sekvencie boli upravené v programe Sequencher 5.0.1. Vytvorená matica znakov a následná analýza boli vykonané v programe MEGA 5.05. Pre odhad príbuznosti, resp. podobnosti analyzovaných vzoriek bola použitá metóda neighbor-joining. Algoritmus neighbor-joining pracuje s kritériami minimálnej evolúcie pre fylogenetické stromy a preferuje topológiu s najmenšou celkovou dĺžkou všetkých vetiev, teda takú dĺžku, ktorá zodpovedá minimálnemu počtu evolučných zmien. Najväčšou výhodou tohto algoritmu je jeho rýchlosť a je ho možné aplikovať na rozsiahle súbory dát [9]. Intervaly spoľahlivosti jednotlivých uzlov boli vypočítané neparametrickou metódou bootstrapping [10]. Spoľahlivosť jednotlivých uzlov je smerodajná pri hodnote nad 50.

Morfologické znaky boli sledované na larvách a imágach v dočasných (glycerínových) a trvalých (Hoyerov roztok) preparátoch pomocou stereomikroskopu Leica M80 a mikroskopu Leica DM1000.

Výsledky a diskusia

Z 57 analyzovaných vzoriek sa podarilo izolovať a amplifikovať mtDNA z 28 vzoriek. Z týchto vzoriek sa podarilo osekvenovať 25, z ktorých bol spracovaný výsledný kladogram. Na jeho základe je možné zaradiť netypické larvy so širokým labrom a k nim patriace imágo s atypickým penisom do rodu *Paramaka* (Obr. 1). Aj keď jedince E15-P04 sú na kladograme

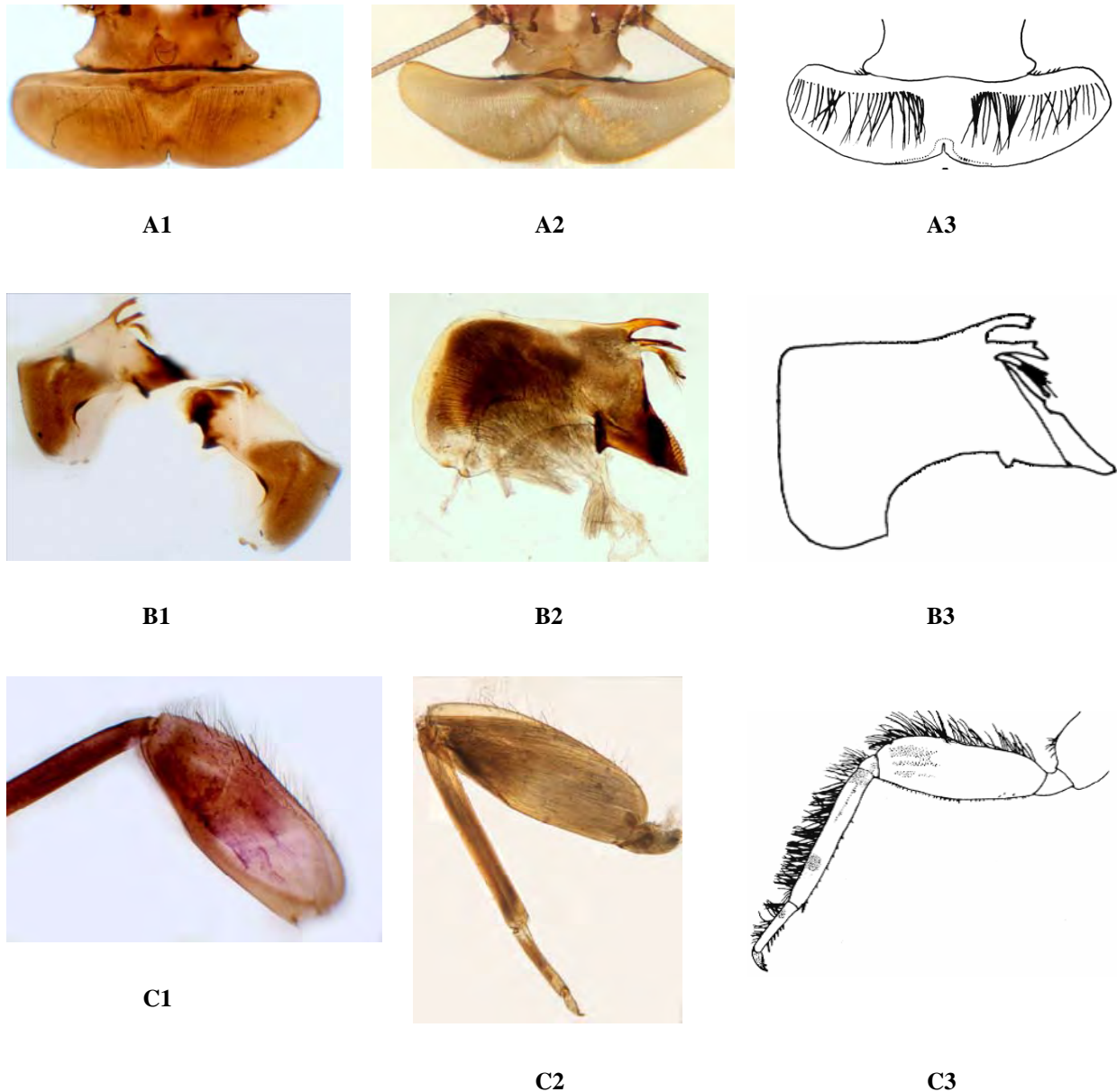
oddelene od jedincov E17-P07, čo naznačuje, že ide o dva odlišné druhy, nepodarilo sa nájsť medzi nimi nijaké morfológické rozdiely. Keďže kladogram bol spracovaný na základe iba 1 génu a pri morfológickej analýze bolo sledovaných viacero znakov, je potrebné klásť väčšiu váhu morfológickej analýze. Dôležitý je aj uzol s hodnotou 43, ktorý nie je preukazný, čo sa týka vzťahu medzi hornou (E21-P01) a dolnou vetvou (E15-P04). V spodnej časti kladogramu (E18-P09) sa nachádzajú imága.



Obr. 1 Kladogram lariev a imág z čeľade Leptophlebiidae: *Paramaka antonii* E01-E25 ●, nový druh P07-P04 ●, *Needhamella* sp. E18, imága E11, E20, E10-P09

Prideliť imága k larvám sa na kladograme nepodarilo, pretože zo vzoriek príslušných lariev nebola úspešná extrakcia mtDNA. Jediné samčie imágo pridelené na kladograme k larve (Obr. 1-E17i) bolo dochované z dospeljej nymfy priamo v teréne.

Na základe morfológických znakov bola časť lariev (E21-P01) identifikovaná ako *Paramaka antonii* a časť ako nový druh (E15-P04 a E17-P07), morfológicky podobný druhu *Paramaka convexa* Spieth, 1943.



Obr. 2 Zástupcovia rodu *Paramaka* s charakteristickými morfológickými znakmi: A- labrum – A1 *Paramaka antonii*, A2 nový druh, A3 *Paramaka convexa* [7]; B- mandibula – B1 *P. antonii*, B2 nový druh, B3 *P. convexa* [7]; C- predná noha – C1 *P. antonii*, C2 nový druh, C3 *P. convexa* [7]

Nový druh sa dá od známych druhov odlišiť kombináciou nasledovných znakov: pomer šírky/dĺžky labra: *P. convexa* 1,7-1,9 [7], *P. antonii* 1,6 [4], *P. pearljam* 1,3 [8], nový druh 2,13-2,55. 6 párov dvojité tracheálnych žiabier, 7. pár absentuje, pričom u doteraz

známych druhov je 7. pár jednoduchý, redukovaný. Tracheálne žiabre sú bez apikálnych zašpicatených výbežkov ako u *P. pearljam*, zatiaľ čo u *P. convexa* a *P. antonii* sú 3., resp. 4.-6. pár tracheálnych žiabier s apikálnymi zašpicatenými výbežkami. Vonkajší okraj mandibúl zaokrúhlený (Obr. 2-B2), u známych druhov viac zahrotený, (takmer) pravouhly (Obr. 2-B1,B2). Posterolaterálne abdominálne výbežky sú prítomné na 7. 8. a 9. článku, kým pri opísaných druhoch sa nachádzajú len na 8. a 9. článku. Tíbia prednej končatiny bez štetín ako u *P. antonii* (Obr. 2-C1, C2), kým pri *P. convexa* je tíbia husto porastená štetinami (Obr. 2-C3). Penis imága ventrálne s dvomi dlhými trňovitými výbežkami vyrastajúcimi z apikálnej časti lalokov. Dĺžka trňovitých výbežkov je zhruba rovnaká ako dĺžka lalokov. U *P. convexa* a *P. pearljam* sú tieto výbežky relatívne krátke, nedosahujú ani 1/3 dĺžky lalokov a vyrastajú približne uprostred lalokov. 2. a 3. článok gonopoditov je krátky a guľatý, kratší a guľatejší ako u *P. convexa* a *P. pearljam*.

Na základe analýzy mtDNA spolu s morfológickou analýzou možno vyvodit' záver, že skúmaný materiál patrí do nového druhu rodu *Paramaka*.

Záver

Používanie kombinácie molekulárnych a morfológických dát vo fylogenetických analýzach je stále kontroverznou záležitosťou, avšak v mnohých prípadoch vedie tento kombinovaný prístup k silným a spoľahlivým rekonštrukciám výsledkov [12]. Vďaka tejto kombinácii sa vyvrátila hypotéza o novom rode, ale jednoznačne bolo preukázané, že ide o nový druh patriaci do rodu *Paramaka*. Analýza mtDNA bola užitočným nástrojom pri identifikácii materiálu na rodovej úrovni, zatiaľ čo morfológická skôr na druhovej úrovni.

Pod'akovanie

Za vedenie pri práci a poskytnutý materiál chcem poďakovať RNDr. Tomášovi Derkovi, PhD. Za pomoc pri vyhodnotení výsledkov DNA analýzy ďakujem RNDr. Fedorovi Čiamporovi, PhD. a Mgr. Kristíne Laššovej.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Domínguez E., Molineri C., Pescador L., et al. (2006) Ephemeroptera of South America. In: Adis J. R., Rueda-Delgado G., Wantzen K. M. (Eds.): Aquatic Biodiversity in Latin America (ABLA), Pensoft, Sofia-Moscow, vol. 2, p. 28
- [2] Chacón M. M., Pescador M. L., Hubbard M. D., et al. (2009) Check List. 5(3), p. 723
- [3] Nieto C., Derka T. (2012) Zootaxa. 3256, p. 58

- [4] Sartori M. (2005) *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. 40(3), p. 237
- [5] Savage M., Dominguez E. (1992) *Aquatic Insects*. 14(4), p. 243
- [6] Spieth H. T. (1943) *Amer. Mus. Nov.* 1244, p. 1
- [7] Blanco-Belmonte L., Ruaise V., Peters J. G. (2003) The nymph of *Paramaka* SAVAGE & DOMÍNGUEZ (Ephemeroptera: Leptophlebiidae: Atalophlebiinae). In: Gaino E. (Ed.): *Research update on Ephemeroptera & Plecoptera*, University of Perugia, Perugia, Italy, p. 117
- [8] Mariano R. (2011) *Zootaxa*. 3038, p. 45
- [9] Folmer O., Black M., Hoeh W., et al. (1994) *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3(5), p. 294
- [10] Mihaescu R., Levy D., Pachter L. (2007) *Algorithmica*. 54, p. 1
- [11] Makarenkov V., Boc A., Xie J., et al. (2010) *BMC Evol. Biol.* 10, p. 250
- [12] Ogden T. H., Gattolliat M., Sartori A., et al. (2009) *Systematic entomology*. 34(4), p. 616

Rezistencia na antihelmintiká u *Haemonchus contortus* – rozdiel v *in vitro* odpovedi pri experimentálnej infekcii oviec a kôz

Elena Školníková, Alžbeta Königová, Michaela Dolinská, Marián Várady

Slovenská akadémia vied, Parazitologický ústav, Hlinkova 3, 040 01 Košice,
Slovenská republika; skolnikova@saske.sk

Abstrakt

Diseases caused by gastrointestinal nematodes are a major health constraint affecting productivity in small ruminants. Parasite nematode *Haemonchus contortus* is causing haemonchosis followed by gastropathy and acute anaemia. These parasitoses obtain importance particularly in countries, where sheep and goats play vital role in the agricultural economies. A significant component of the losses attributable to parasitoses is anthelmintic resistance, which is more common in goats. The increased prevalence of anthelmintic resistance in goats can be explained to a certain measure by unique aspects of their pharmacology, immunology and behaviour. The management of anthelmintic resistance has been more extensively researched in sheep, but extending our current understanding of the issue of anthelmintic resistance in the two species should lead to more effective control of caprine resistance. Examining an experimental infection by resistant and sensitive population of *Haemonchus contortus* we were able to confirm a similar result of phenotypisation by *in vitro* tests in both sheep and goats.

Kľúčové slová: anthelmintic resistance; sheep; *Haemonchus contortus*; goat; *in vitro* tests.

Úvod a formulácia cieľa

Haemonchus contortus (Nematoda: Trichostrongylidae) je hematofágný druh parazita, ktorý infikuje malé prežúvavce. Parazituje v sleze, kde spôsobuje gastropatiu a akútnu anémiu, ktorá môže byť pre mladé kategórie oviec a kôz smrteľná [1]. Hemonchóza je považovaná za významné obmedzenie produkcie oviec a kôz a spôsobuje anémiu, anorexiu, hnačku, zhoršenú kondíciu a vychudnutie zvierat, čo má za následok znížené hmotnostné prírastky, zvýšenú mortalitu a zníženú jatočnú cenu zvierat [2].

Konvenčnou metódou kontroly parazitických červov je frekventované používanie antihelmintík. Nanešťastie rozsiahle používanie týchto liečiv nevyhnutne viedlo k selekcii populácií parazitov, ktoré sú na nich rezistentné. U červov rezistentných na tieto liečivá vznikla genetická zmena v schopnosti týchto parazitov prežiť liečbu odporúčanou dávkou antihelmintika [3]. Rezistencia na všetky tri dostupné triedy antihelmintík sa za niekoľko desaťročí stala vážnym celosvetovým problémom živočíšnej výroby hlavne v krajinách s intenzívnym chovom oviec a kôz ako sú Nový Zéland, Austrália, Veľká Británia, India a krajiny Južnej Ameriky a Afriky [4].

Na monitorovanie antihelmintickej rezistencie sa používa viacero metód. Z doterajších poznatkov vyplýva, že najspoľahlivejšími *in vitro* testami sú *in vitro* test liahnutia vajíčok (egg hatch test, EHT) a test vývinu lariev (larval development test, LDT), ktoré dokážu

diagnostikovať rezistenciu už u pre-parazitických štádií parazitov oviec [4, 5]. Ovce a kozy sa navzájom líšia viacerými vlastnosťami - kozy majú vyššiu metabolickú aktivitu a preto na dosiahnutie vysokého antiparazitárneho účinku vyžadujú vyššie dávky antihelmintík. Navyše u nematódov kôz sa zvyčajne vyvinie rezistencia na antihelmintiká oveľa skôr ako u parazitov oviec a taktiež sa u nich skôr stretávame aj s polyrezistenciou. Viacero výsledkov štúdií dokázalo, že stratégie redukcie parazitárnej infekcie sa u oboch hostiteľov výrazne líšia podľa behaviorálnych, imunologických a fyziologických charakteristík [3, 6].

Hlavným cieľom tejto štúdie bolo zistiť *in vitro* rozdiely medzi identickou parazitárnou infekciou u kôz a oviec pomocou dvoch *in vitro* metód (EHT, LDT), ktoré sa používajú na detekciu antihelmintickej rezistencie.

Materiál a metódy

14 kozliat a 14 jahniat (7+7) bolo infikovaných 5000 larvami vývinového štádia L3 citlivého izolátu (ISE – Moredun Škótsko, Veľká Británia) a izolátu *Haemonchus contortus* rezistentného na benzimidazol a ivermektín (White river – Van Wyk and Malan 1988). Na vyšetrenia boli odoberané vzorky trusu oviec a kôz z rekta, ktoré boli ihneď spracované alebo anaeróbne uskladnené podľa metódy Hunta and Taylora (1989) [7]. Odoberané boli 5x do týždňa od 30. do 50. dňa po experimentálnej infekcii. Vajíčka nematódov boli izolované pomocou sústavy sít s rozmermi ôk 250, 100 a 20 μm (Analysensieb, Nemecko). Materiál zachytený na 20 μm site bol premytý vodou, sedimentovaný, flotovaný Füllebornovým soľným roztokom (360 g NaCl/1 l vody) a vajíčka boli následne použité na *in vitro* testy.

EHT je založený na ovocídnej vlastnosti benzimidazolov a porovnaní schopnosti vajíčok embryonovať a vyvíjať sa v rôznych koncentráciách benzimidazolového antihelmintika a bol uskutočnený podľa odporúčaní Svetovej asociácie pre pokrok vo veterinárnej medicíne (WAAVP) [7, 8]. Do 24 jamkovej platničky s objemom jamôk 3 ml bolo pridaných 1,99 ml vodného roztoku s vajíčkami (100-150 strongylidných vajíčok/1 ml) k 10 μl roztoku thiabendazolu rozpusteného v DMSO (dimetylsulfoxid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemecko) so stúpajúcou koncentráciou v nasledujúcej jamke: 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,3 $\mu\text{g/ml}$. Kontrola zahŕňala pridanie 10 μl DMSO bez liečiva do jednej jamky. Platničky boli inkubované 48 hodín v termostate (Memmert, Nemecko) pri teplote 27°C a inkubácia bola ukončená pridaním 10 μl jódového (Lugolovho) roztoku (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemecko) do každej jamky [8].

Mikroagarový LDT je založený na schopnosti lariiev prežívať a vyvíjať sa v prostredí s rôznou koncentráciou antihelmintika a bol urobený podľa metódy Coles et al. (2006) [8, 9].

Zásobné riedenie pre thiabendazol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemecko) a ivermektín aglikón (Tebu-bio, Francúzsko) bolo pripravené v pomere 1:2 s DMSO a následne riedený v pomere 1:4 s destilovanou vodou. Z takto pripravených koncentrácií sme preniesli 12 μ l do dvoch radov mikrotitračnej platničky, tretí rad slúžil ako kontrola, kde bolo namiesto antihelmintika pridané DMSO zriedené destilovanou vodou v pomere 1:4. Ku každej koncentrácii antihelmintika a do kontrolných jamiek bolo pridaných 150 μ l 2% agaru. Agar sme pripravili z 2 g agarózy a 100 ml destilovanej vody, zohriali sme ho do varu a ochladili na 45°C. Po stuhnutí agaru bolo ku každej koncentrácii antihelmintika aj do kontrolných jamiek pridaných 110 μ l destilovanej vody, 20 μ l výživného média z extraktu z kvasiniek, a 10 μ l suspenzie vajíčok (80-100 vajíčok/10 μ l). Výživné médium sme získali zmiešaním 90 ml 0,85 % fyziologického roztoku a 1 g extraktu z kvasiniek (Yeast Extract, ICN Biomedicals Inc., USA). K tejto zmesi sme po autoklávovaní pridalí 3 ml Earleho rovnovážneho soľného roztoku (Earle's Balanced Salt Solution, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemecko) na 27 ml kvasinkového extraktu. Na zabránenie rastu húb a nežiaducej mikroflóry bol k vodnému roztoku s vajíčkami navyše pridaný amfotericín B (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemecko). Mikrotitračné platničky (Nuncleon, Dánsko, objem jamôk 250 μ l) boli inkubované za rovnakých podmienok ako u EHT s rozdielom trvania inkubácie, ktorá trvala 7 dní [8]. Pri *in vitro* teste liahnutia vajíčok ako aj *in vitro* teste vývinu lariev sme na určenie ED₅₀/ED₉₉ pri EHT a LD₅₀/LD₉₉ pri LDT použili logitsovú analýzu podľa Waller a kol., 1985 [10]. Štatistický program nám poskytol Dr. Dobson, CSIRO, McMaster Laboratory, Sydney, Austrália.

Výsledky a diskusia

Výsledkom štúdie rozdielov *in vitro* testov pri identickej parazitárnej infekcii 14 oviec a 14 kôz boli hodnoty ED₅₀/ED₉₉ pri EHT (Tab. 1) a LD₅₀/LD₉₉ pri LDT (Tab. 2, 3). Z týchto hodnôt sme vypočítali faktory rezistencie (FR), ktoré nám udávajú koľkokrát je rezistencia väčšia u rezistentnej populácie parazitov (HCR) v porovnaní s populáciou citlivých parazitov *Haemonchus contortus* (HCS). Vo všeobecnosti možno povedať, že čím je vyšší FR, tým je testovaná metóda citlivejšia a tým aj vhodnejšia na detekciu rezistentných parazitov. Takáto metóda je teda vhodná na použitie nielen v laboratórnych podmienkach, ale aj pri terénnej diagnostike rezistencie [5, 9].

Ak vychádzame z predpokladu, že u kôz a oviec sa vyskytujú rovnaké druhy parazitov, potom rezistentné/citlivé populácie helmintov selektované jedným hostiteľom by mali byť rovnako životaschopné ako populácie selektované v inom druhu hostiteľa zo skupiny

malých prežúvavcov [4, 5, 6]. Výsledok fenotypizácie pomocou *in vitro* testov by u týchto parazitov mal byť identický alebo podobný u obidvoch hostiteľov. To sa potvrdilo aj v našom experimente, pretože výsledné hodnoty ED₅₀/ED₉₉ pri EHT a LD₅₀/LD₉₉ pri LDT ako aj vypočítané faktory rezistencie sa pri porovnaní údajov získaných z kôz a oviec len veľmi málo líšili.

Tab. 1 Výsledky testu liahnutia vajčiek

EHT	ED ₅₀ (µg.ml ⁻¹) ± SD	ED ₉₉ (µg.ml ⁻¹) ± SD
HCS kozy	0,036 ± 0,005	0,142 ± 0,072
HCS ovce	0,036 ± 0,002	0,149 ± 0,035
HCR kozy	0,077 ± 0,005	0,513 ± 0,394
HCR ovce	0,079 ± 0,003	0,457 ± 0,163
Faktor rezistencie HCR/HCS		
kozy	FR50 - 2,13	FR99 - 3,61
ovce	FR50 - 2,19	FR99 - 3,06

EHT (egg hatch test) - test liahnutia vajčiek, HCS - populácia citlivých parazitov *Haemonchus contortus*, HCR - rezistentná populácia parazitov *Haemonchus contortus*, FR – faktor rezistencie

Tab. 2 Výsledky mikroagarového testu vývinu lariev (thiabendazol)

LDT thiabendazol	LD ₅₀ (µg.ml ⁻¹) ± SD	LD ₉₉ (µg.ml ⁻¹) ± SD
HCS kozy	0,015 ± 0,002	0,022 ± 0,005
HCS ovce	0,014 ± 0,004	0,023 ± 0,014
HCR kozy	0,043 ± 0,013	0,939 ± 0,980
HCR ovce	0,057 ± 0,019	1,550 ± 1,125
Faktor rezistencie HCR/HCS		
kozy	FR50 - 2,86	FR99 - 42,68
ovce	FR50 - 4,07	FR99 - 67,39

LDT (larval development test) - test vývinu lariev, HCS - populácia citlivých parazitov *Haemonchus contortus*, HCR - rezistentná populácia parazitov *Haemonchus contortus*, FR – faktor rezistencie

Tab. 3 Výsledky mikroagarového testu vývinu lariev (ivermektín aglikón)

LDT ivermektín aglikón	LD ₅₀ (ng.ml ⁻¹) ± SD	LD ₉₉ (ng.ml ⁻¹) ± SD
HCS kozy	1,106 ± 0,609	5,516 ± 3,763
HCS ovce	1,317 ± 0,491	6,982 ± 2,362
HCR kozy	12,93 ± 2,53	58,39 ± 24,75
HCR ovce	16,52 ± 5,14	82,04 ± 17,44
Faktor rezistencie HCR/HCS		
kozy	FR50 - 11,69	FR99 - 10,59
ovce	FR50 - 12,54	FR99 - 11,75

LDT (larval development test) - test vývinu lariev, HCS - populácia citlivých parazitov *Haemonchus contortus*, HCR - rezistentná populácia parazitov *Haemonchus contortus*, FR – faktor rezistencie

Záver

Obe *in vitro* metódy ukázali porovnateľné výsledky, ktoré sú spoľahlivé na detekciu benzimidazolovej a ivermektínovej rezistencie u parazitov *Haemonchus contortus*. Rozdiely medzi hodnotami ED₅₀/ED₉₉ pri EHT a LD₅₀/LD₉₉ pri LDT u kôz a oviec boli minimálne, čo poukazuje na fakt, že identická parazitárna infekcia vyvolala identickú *in vitro* odpoveď pri detekcii antihelmintickej rezistencie.

Pod'akovanie

Štúdia bola podporovaná grantovou agentúrou VEGA, grant č. 2/0131/13 vedeckej agentúry MŠ a SAV a slovenskou agentúrou pre výskum a vývoj, projekt č. APVV-0539-10.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Karlsson L. J. E., Greeff J. C. (2012) *Vet. Parasitol.* 189, p. 104
- [2] Yacob H. T. (2009) *Vet. Parasitol.* 166, p. 119
- [3] Jackson F., Várady M., Bartley D. J. (2012) *Small Ruminant Res.* 103, p. 3
- [4] Várady M., Papadopoulos E., Dolinská M., et al. (2011) *Helminthologia.* 48(3), p. 137
- [5] Coles G. C. (2005) *Res. Vet. Sci.* 78, p. 99
- [6] Hoste H., Torres-Acosta J. F. J., Aguilar-Caballero A. J. (2008) *Parasite Immunol.* 30, p. 79
- [7] Coles G. C. et al. (1992) *Vet. Parasitol.* 44, p. 35.

- [8] Letková V., Čisláková L., Halánová M., et al. (2010) Laboratórne diagnostické metódy vo veterinárskej parazitológii. Edičné stredisko UVL, Košice, p. 99
- [9] Coles G. C., Jackson F., Pomroy W. E., et al. (2006) *Vet. Parasitol.* 136, p. 167
- [10] Waller P. J., Dobson R. J., Donald A. D., et al. (1985) *Int. J. Parasitol.* 15. p. 669

Detekcia interferónov typu I a typu III v pľúcach Balb/c myší

Lucia Škorvanová, Petra Švančarová, Darina Svetlíková, Tatiana Betáková

Slovenská akadémia vied, Virologický ústav, Oddelenie molekulárnej patogenézy vírusov, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika; lucia.skorvanova@savba.sk

Abstrakt

Influenza A virus belongs to the family *Orthomyxoviridae*. It causes respiratory tract infections that are often complicated by secondary bacterial infections. In response to influenza infection, the immune system produces cytokines, including interferons (IFNs). IFNs are a family of small regulatory glycoproteins that play a central role in the defense against viral infections. They exhibit antiviral, antiproliferative and immunomodulation activities. In the present study, we developed a PCR method for detection of type I and III IFN in the lungs of Balb/c mice. The optimal annealing temperature for primer pairs was determined using gradient PCR.

Kľúčové slová: interferón; vírus chrípky typu A; primer; anelačná teplota; PCR reakcia

Úvod a formulácia cieľa

Vírus chrípky typu A je jedným z najrozšírenejších a súčasne vysoko infekčných pôvodcov ľudských ochorení [1]. Vyvoláva infekcie dýchacích ciest, ktoré bývajú často sprevádzané bakteriálnymi infekciami [2]. Tento závažný a kozmopolitne rozšírený patogén je príčinou značnej morbidita a mortality nielen u človeka, ale aj u zvierat [1].

Vírus chrípky typu A je obalený vírus, ktorý patrí do čeľade *Orthomyxoviridae*. Vírusové častice sú zvyčajne sférického alebo elipsovitého tvaru s priemerom približne 80 – 120 nm [3]. Chrípkový genóm je tvorený 8 segmentami jednovláknovej RNA negatívnej polarita a podľa najnovších štúdií kóduje 14 vírusových proteínov [4].

Imunitný systém bojuje proti chrípkovej infekcii okrem iného aj produkciou cytokínov, z ktorých najvýznamnejšiu úlohu vo vrodenej, ako aj získanej imunitnej odpovedi plnia interferóny (IFN) [5]. IFN sú malé regulačné glykoproteíny [6], produkované predovšetkým leukocytmi a fibroblastami ako odpoveď na prítomnosť dsRNA, ktorá je kľúčovým ukazovateľom vírusovej infekcie [7]. Boli objavené koncom 50-tych rokov minulého storočia Britom Alickom Isaacsom a Švajčiarom Jeanom Lindenmannom [8]. V súčasnosti sú známe tri triedy IFN: IFN typu I, typu II a typu III (IFN-lambda), ktoré tvoria len nedávno opísanú skupinu IFN [9].

Interferóny navodzujú svoje biologické účinky väzbou na špecifické receptory, ktoré sú prítomné na povrchu cieľových buniek [10]. Táto interakcia spúšťa komplexnú kaskádu

vnútrobunkových dejov vedúcich k expresii početných interferónom indukovaných génových produktov, ktoré sú považované za mediátory biologického účinku IFN [6]. IFN sa vyznačujú antivírusovou, antiproliferačnou a imunomodulačnou aktivitou, vďaka čomu našli uplatnenie nielen v liečbe vírusových, ale i rôznych nádorových ochorení [11].

Cieľom tejto práce bolo zaviesť PCR metódu na detekciu interferónov v pľúcach Balb/c myší.

Materiál a metódy

Vírusy

A/PR/8/34 – kmeň vírusu chrípky A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)

delNS – mutant vírusu chrípky A/PR/8/34 s deléciou v NS géne

Experimentálne zvieratá

Balb/c myši – inbredná línia bielych laboratórnych myší

Izolácia vírusovej RNA z pľúc Balb/c myší

Vírusovú RNA sme izolovali z homogenizovanej pľúcnej suspenzie pomocou komerčne dodávaného kitu, NucleoSpin[®] RNA XS, podľa protokolu výrobcu.

RT-PCR

Vírusovú RNA, ktorú sme získali vyššie uvedeným spôsobom, sme použili na prepis do formy cDNA. K 15 µl reakčnej zmesi, ktorá obsahovala 4 µl 5x koncentrovaného tlmivého roztoku pre reverznú transkriptázu, 2 µl zmesi dNTP, 1 µl z každého primeru, 1 µl reverznej transkriptázy a 6 µl ultračistej vody, sme pridali 5 µl vyizolovanej RNA do výsledného objemu 20 µl. Inkubovali sme 90 minút pri teplote 42°C.

Gradientová PCR

PCR reakciu sme uskutočnili v reakčnej zmesi s objemom 10 µl: 5 µl 2x PCR Master Mix, 3 µl ultračistej vody, 0,5 µl z každého primeru. Ako templát sme použili 1 µl cDNA. Teplotný a časový profil PCR amplifikácie pri 30 cykloch:

1. počiatočná denaturácia	94°C	1 minúta
2. denaturácia	94°C	30 sekúnd
3. anelácia	48°C – 56°C	30 sekúnd
4. polymerizácia	72°C	30 sekúnd
5. záverečná polymerizácia	72°C	5 minút

Elektroforéza DNA v agarózovom géli

DNA sme separovali v 2% agarózovom géli. Separovanú DNA s interkalovaným

etídium bromidom sme vizualizovali na UV iluminátore. Pomocou programu GeneSnap from SynGene sme vytvorili 3D vizualizáciu elektroforetického gélu.

Izolácia DNA z agarózového gélu

DNA fragmenty požadovanej veľkosti sme skalpelom vyrezali z gélu, preniesli do skúmavky a izolovali použitím komerčne dodávaného kitu Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System podľa návodu výrobcu. Koncentráciu purifikovanej DNA sme stanovili spektrofotometrom pri vlnovej dĺžke 260 nm.

Výsledky a diskusia

Najskôr sme navrhli špecifické primery na detekciu interferónov (IFN), menovite IFN- α , IFN- β patriacich do triedy IFN typu I a IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL-28A) a IFN- λ 3 (IL-28B), ktoré sú členmi triedy IFN typu III. V našich experimentoch sme na infekciu Balb/c myši použili chrípkový vírus A/PR/8/34 a delečný mutant tohto vírusu delNS, ktorý nesie mutáciu v NS géne. Jedným z proteínov kódovaných NS génom je NS1 proteín, ktorý pôsobí ako antagonist IFN. Zavedením mutácie v tomto géne sme získali vírus s delečnou formou NS1 proteínu. Vírusovú RNA sme izolovali z pľúcnej suspenzie Balb/c myši, ktoré boli intranazálne infikované danými chrípkovými vírusmi. Pľúca boli odoberané po 2 a 4 dňoch po infekcii a následne homogenizované.

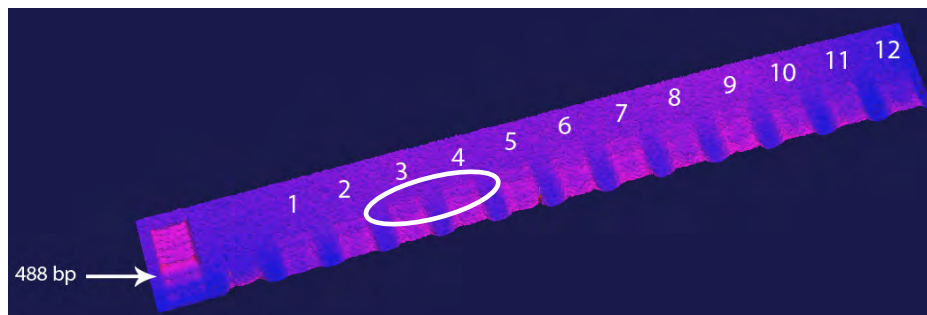
Pomocou RT-PCR sme prepísali izolovanú RNA do formy cDNA, ktorú sme použili ako templát v gradientovej PCR. Tento typ PCR reakcie sme zvolili ako metódu na stanovenie optimálnej anelačnej teploty pre nami navrhnuté primery. PCR amplifikácia prebiehala v 30 cykloch za podmienok popísaných v časti materiál a metódy. Testovali sme anelačné teploty v rozsahu 48 až 56°C. Namnoženú DNA sme analyzovali horizontálnou elektroforézou v 2% agarózovom géli. V nasledujúcej tabuľke sú uvedené jednotlivé anelačné teploty a im prislúchajúce dráhy na elektroforetickom géli.

Tab. 1 Testované anelačné teploty

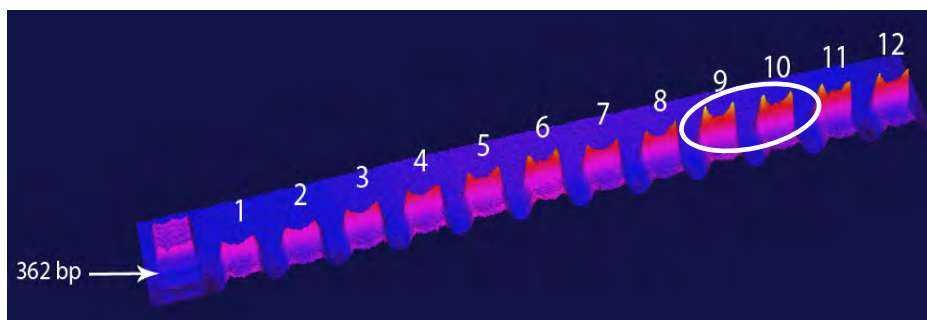
Poradie dráh	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anelačná teplota (°C)	48	48,7	49,5	50,2	50,9	51,6	52,4	53,1	53,8	54,5	55,3	56

Z nižšie uvedených obrázkov vyplýva, že pre primery určené na detekciu IFN- α , IL-28A, IL-28B a IL-29 sú vhodnejšie nižšie anelačné teploty v porovnaní s primermi pre IFN- β ,

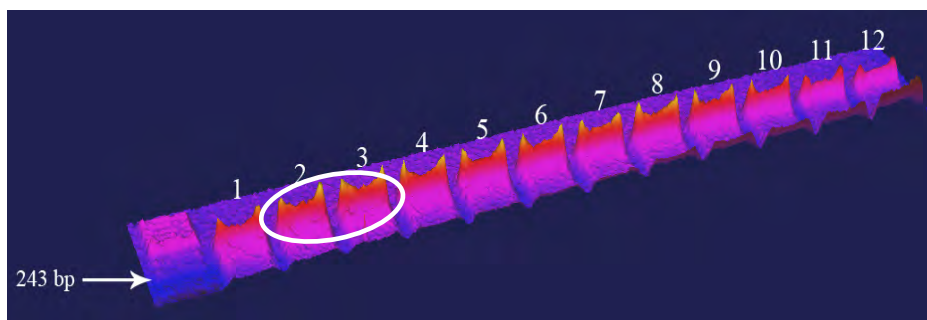
čoho dôkazom je intenzita signálov v 3D prevedení elektroforetického gélu, ktorá zodpovedá koncentrácii DNA.



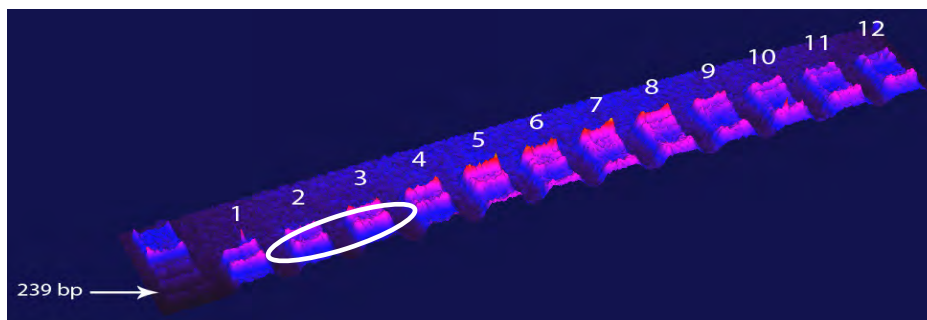
Obr. 1 Stanovenie optimálnej anelačnej teploty pre dvojicu primerov na detekciu IFN- α (RNA bola izolovaná z pľúc myší odobratých po 2-dňovej infekcii vírusom delNS)



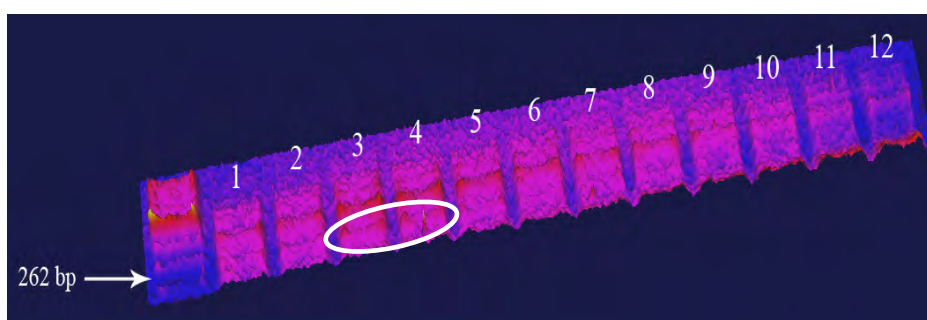
Obr. 2 Stanovenie optimálnej anelačnej teploty pre dvojicu primerov na detekciu IFN- β (RNA bola izolovaná z pľúc myší odobratých po 4-dňovej infekcii vírusom A/PR/8/34)



Obr. 3 Stanovenie optimálnej anelačnej teploty pre dvojicu primerov na detekciu IL-28A (RNA bola izolovaná z pľúc myší odobratých po 4-dňovej infekcii vírusom delNS)



Obr. 3 Stanovenie optimálnej anelačnej teploty pre dvojicu primerov na detekciu IL-28B (RNA bola izolovaná z pľúc myši odobratých po 4-dňovej infekcii vírusom A/PR/8/34)



Obr. 4 Stanovenie optimálnej anelačnej teploty pre dvojicu primerov na detekciu IL-29 (RNA bola izolovaná z pľúc myši odobratých po 4-dňovej infekcii vírusom delNS)

V nasledujúcej tabuľke sú uvedené optimálne anelačné teploty pre nami navrhnuté primery na detekciu jednotlivých IFN.

Tab. 2 Optimálne anelačné teploty

Interferóny	IFN- α	IFN- β	IL-28A	IL-28B	IL-29
Anelačná teplota (°C)	50	54	49	49	50

DNA fragmenty požadovanej veľkosti sme vyrezali z jednotlivých dráh na géli, ktoré prislúchali optimálnym anelačným teplotám. Skutočnosť, že sa naozaj jedná o dané interferóny, sme potvrdili sekvenovaním.

Záver

Navrhli sme špecifické primery a zaviedli PCR metódu na detekciu interferónov skupiny IFN typu I a typu III v pľúcach Balb/c myši.

Pomocou gradientovej PCR sme stanovili optimálne anelačné teploty pre nami

navrhnuté primery. Optimálna anelačná teplota pre primery detegujúce IFN- α , IL-28A, IL-28B a IL-29 je nižšia v porovnaní s anelačnou teplotou pre IFN- β primery (IFN- α a IL-29 – 50°C; IL-28A a IL-28B – 49°C; IFN- β – 54°C).

Prítomnosť daných interferónov sme potvrdili sekvencovaním.

Pod'akovanie

Táto štúdia/publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: TRANSMED 2, ITMS: 26240120030, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja, projektu VEGA 1/0265/11 a projektu VEGA 2/0005/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Sládková T., Kostolanský F. (2006) *Acta Virol.* 50(3), p. 151
- [2] Julkunen I., Sareneva T., Pirhonen J., et al. (2001) *Cytokine Growth Factor Rev.* 12(2-3), p. 171
- [3] Noda T. (2012) *Front. Microbiol.* 2, p. 269
- [4] Wise H. M., Hutchinson E. C., Jagger B. W., et al. (2012) *PLoS Pathog.* 8(11), p. e1002998
- [5] Österlund P., Veckman V., Sirén J., et al. (2005) *J. Virol.* 79(15), p. 9608
- [6] Varedi M. (2005) *I. J. I.* 2(2), p. 67
- [7] Randall R. E., Goodbourn S. (2008) *J. Gen. Virol.* 89(Pt 1), p. 1
- [8] Isaacs A., Lindenmann J. (1957) *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 147(927), p. 258
- [9] Kotenko S. V., Gallagher G., Baurin V. V., et al. (2003) *Nat. Immunol.* 4(1), p. 69
- [10] Schindler C. (1999) *Exp. Cell Res.* 253(1), p. 7
- [11] Meager A. (2006) *The interferons: Characterization and Application.* Wiley-VCH, Weinheim, Germany , p. 344

Príprava produkčného kmeňa na produkciu rekombinantného pretrombínu-2 s afinitným His-tagom na N-terminálnom konci proteínu

Eva Šliková, Michaela Osadská, Hana Halászová, Ján Krahulec, Ján Turňa

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; eva.slikova@gmail.com

Abstrakt

One of the key enzymes of blood coagulation, thrombin, is often used in the pharmaceutical industry as a topical hemostatic agent in surgery. *Escherichia coli* expression system is one of the simplest and most commonly used systems for heterologous expression of recombinant proteins which are further used in various industries. In this work we have used *E. coli* expression system and gene for pretrombin-2, the smallest single-chain immediate precursor of α -thrombin containing various sequences for affinity His-tag on the 5' end. Pretrombin-2 produced in *E. coli* host cells was found to be insoluble, because it aggregates into inclusion bodies. For obtaining of the final product it was necessary to solubilise inclusion bodies and refold the recombinant protein. In the next step we will focus on the activation of refolded pretrombin-2 with His-tag on N-terminal. Connecting affinity His-tag at N-terminal of the protein can increase the subsequent purification and refolding process of recombinant protein by using immobilized metal ion affinity chromatography.

Kľúčové slová: His-tag; pretrombín-2; *Escherichia coli*; heterologická expresia

Úvod a formulácia cieľa

Pre významné funkcie v procese hemokoagulácie sa trombínu venuje mimoriadna pozornosť napr. v antikoagulačných terapiách [1] a tiež pri príprave resp. dizajnovaní liečiv. Ukázalo sa, že produkcia rekombinantného ľudského trombínu pomocou vhodných expresných systémov predstavuje bezpečnú alternatívu k získavaniu trombínu z ľudskej alebo hovädzej plazmy, ktoré sú spájané s rizikom patogenity a imunogenicity. Takýto produkt by mal byť využiteľný farmaceutickým priemyslom a vylúčila by sa akákoľvek kontaminácia produktu patogénmi.

Na produkciu ľudského rekombinantného trombínu v *Escherichia coli* expresnom systéme sa najčastejšie používa jeho najmenší jednovláknový prekurzor, pretrombín-2, ktorý je tvorený z 308 aminokyselinových zvyškov [2; 3]. Maturovaný α -trombín, často popisovaný tiež ako Faktor IIa (FIIa), je v aktívnej forme zložený z ľahkého reťazca (A) s dĺžkou 36 aminokyselinových zvyškov a ťažkého reťazca (B) z 259 aminokyselinových zvyškov [4]. Reťazce A a B sú kovalentne spojené disulfidickou väzbou medzi dvoma cysteínovými zvyškami (C1 a C122). Doteraz bola na našom pracovisku dosiahnutá úspešná expresia proteínu pretrombín-2 (PT2) a jeho revitalizácia z inklúzných teliesok. Pre účely purifikácie proteínu pomocou afinitnej chromatografie na imobilizovaných iónoch kovu bolo ďalším krokom pridanie afinitného His-tagu na N-terminálny koniec proteínu PT2, pričom sme vychádzali zo štyroch rôznych sekvencií pre tento afinitný tag. V rámci sekvencie pre His-tag

sme sa zamerali na optimalizáciu sekvencie pre His-tag z hľadiska využitia preferenčných kodónov využívaných v bunkách *E. coli* pre histidín, kde pomer zastúpenia kodónov CAT:CAC v *E. coli* je cca 60:40. Taktiež sme sa zamerali na rôzne aminokyselinové zloženie pred samotným His-tagom. Naším cieľom bolo vniesť štyri sekvencie pre afinitný His-tag na 5' koniec génu pre PT2, čím sme pripravili štyri rôzne expresné vektory: pJK100-HT1PT2, pJK100-HT2PT2, pJK100-HT3PT2, pJK100-HT4PT2. Týmto spôsobom je možné zistiť vplyv jednotlivých sekvencií His-tagu na expresiu cieľového rekombinantného proteínu, čo môže byť užitočné pri návrhu konštruktov pre expresiu rôznych cieľových proteínov. Proteín, ktorý vykazoval najvyššie úrovne expresie sme ďalej využili pre expresiu v kultúrach s vysokou koncentráciou buniek vo fermentore a následne ho izolovali z inklúzných teliesok a revitalizovali pomocou metódy kontinuálnej dialýzy a tiež na kolónke s niklovou maticou.

Materiál a metódy

Príprava produkčného kmeňa: Plazmidovú DNA sme izolovali metódou podľa Birnboim & Doly [5] a purifikovali pomocou Plasmid Mini Kit (Qiagen). Na vnesenie sekvencií pre His-tag na 5' koniec génu pre pretrombín-2 sme použili PCR reakciu, ktorá bola pripravená v objeme 50µl reakčnej zmesi podľa protokolu PfuUltra Fusion HS DNA Polymerase od firmy Agilent Technologies. Označenie primerov a prehľad sekvencií sú uvedené v tabuľke č.1. PCR reakcia prebiehala v termocykléri podľa teplotného programu 95°C 2min, 30x (95°C 20sek, 56°C 20sek, 72°C 15sek), 72°C 3min. Produkty PCR sme stanovili elektroforeticky v 1% agarózovom géli.

Tabuľka č.1 Označenie primérov a prehľad sekvencií

Primer	Sekvencia
pFHT1PT2N	ggggcatatgggcagcagccatcatcaccatcatcacgatggccgtacggcgacc
pFHT2PT2N	ggggcatatgggcatcatcaccatcatcaccatcacgatggccgtacggcgacc
pFHT3PT2N	ggggcatatgcatcatcaccatcatcacgatggccgtacggcgacc
pFHT4PT2N	ggggcatatggcgcatcatcaccatcatcacgatggccgtacggcgacc
pRPT2N	cccc gaattc tca ttc acc aaa ctg atc aat cac ttt ctgg

Na štiepenie DNA sme používali restričné endonukleázy NdeI a EcoRI (Fermentas). Následne sme DNA fragmenty klonovali do vektora pJK100 (Tab. 2) *downstream* za T7 promótor ligáciou pomocou T4 DNA ligázy od spoločnosti TaKaRa. DNA fragmenty sme

analyzovali agarózovou elektroforézou. Hostiteľské bunky *E. coli* K12 RV308ai, BL21ai (Tab. 3) [6] sme transformovali pripravenými expresnými vektormi pJK100-HT1PT2, pJK100-HT2PT2, pJK100-HT3PT2, pJK100-HT4PT2 elektroporáciou pomocou elektroporátora GenePulser (Biorad) s parametrami: kapacita 25 μ F, napätie 2,5 kV a odpor 200 Ω . Výsledná časová konštanta bola 4,8-4,9 ms. Transformované bunky sme ďalej kultivovali v 0,5 ml TB pôdy (Terrific Broth: 1,2% enzymatický kazeínový hydrolyzát, 2,4% kvasničný extrakt a 0,4% glycerol).

Tabuľka č. 2 Konštrukty na transformáciu *E. coli*, ich genotyp a zdroj

Konštrukt	Genotyp	Zdroj
pJK100-PT2	<i>pUCori, bla(ApR), parB+</i> , expresná kazeta PT7- gén pre pretrombín 2	nepublikované
pJK100-EK-LL37	<i>pUCori, bla(Ap^R), parB⁺</i> , expresná kazeta P _{T7} -trx-LL37	Krahulec, 2010

Tabuľka č. 3 Použité bakteriálne kmene *E. coli*, ich genotyp a zdroj

Kmeň <i>E. coli</i>	Genotyp	Zdroj
K12 RV308 ai	<i>Su- lacX74, gal::ISII(OP308), araBAD::T7, RNAP, strA</i>	Krahulec, 2010
BL21ai	<i>F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) araB::T7RNAP-tetA</i>	Invitrogen

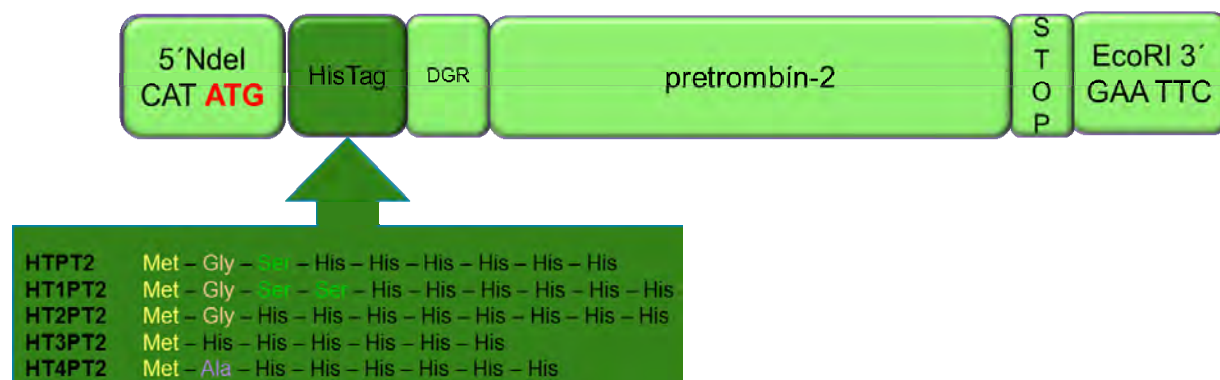
Expresia rekombinantného plazmidu s génom pre PT-2 s rôznymi afinitnými His-tagmi na N-konci proteínu v Erlenmayerových bankách: Transformované bunky sme preočkovali do 2ml TB pôdy s ampicilínom (100 μ g/ml) ako selekčným markerom a 1% glukózou na zabezpečenie inhibície bazálnej expresie a nechali kultivovať pri 37°C. Bunky sme po 6-7 hodinách preočkovali do 2ml TB pôdy s ampicilínom a 1% glukózou a kultivovali cez noc pri 37°C. Nočnú kultúru sme inokulovali do 50 ml TB média v pomere 1:100 s obsahom 0,05 % glukózy. Expresiu sme indukovali pri optickej hustote buniek OD₆₀₀ 1 s arabinózou vo výslednej koncentrácii 0,1%. Počas kultivácie sme sledovali rýchlosť rastu buniek spektrofotometrickým meraním optickej hustoty buniek OD₆₀₀. Tiež sme odoberali vzorky na analýzu expresie jednotlivých cieľových proteínov pomocou SDS-PAGE [7]. Odoberané množstvo vzorky na SDS-PAGE analýzu obsahuje konštantné množstvo buniek, ktoré zodpovedá množstvu buniek v 1ml pri OD₆₀₀= 0,5. Výsledky sme kvantifikovali softvérom Gene Tools verzia 4.03.01.0 (SynGene).

Expresia rekombinantného plazmidu s génom pre PT-2 s afinitným His-tagom na N-konci proteínu vo fermentore: Na kultiváciu buniek sme použili fermentačné zariadenie

firmy Sartorius typ Biostat B plus–2L MO. Kultivácia prebiehala v objeme modifikovaného chemicky definovaného média, (kyselina fosforečná 7,5 ml/l; kyselina sírová 1,9 ml/l; kyselina citrónová 0,9 g/l; hydroxid sodný 1,9g/l; hydroxid draselný 9,6g/l; chlorid sodný 0,5g/l; síran horečnatý 100mM; glycerol 40g/l; TES (trace element solution) 2ml/l; 1M thiamine 0,1 ml/l, uhlíkový zdroj do 0,4%) 1dm³ pri 37°C. Podmienky kultivácie boli nasledovné: pH= 7,2 (automatická titrácia s 3,6 % HCl a 28-30 % NH₄OH) pO₂ sa udržiavalo na 60% zvyšovaním otáčok rotora (300 - 2000 ot.min.⁻¹) a prevzdušňovaním média (do 2 dm³.min.⁻¹). Tvorbe peny sa zamedzovalo automatickým pridávaním odpeňovacieho činidla Antifoam B Emulsion A6707 (Sigma). Expresiu sme indukovali pri optickej hustote buniek OD₆₀₀ 19 s arabinózou vo výslednej koncentrácii 1 %. Heterologickú expresiu sme vykonávali 4h od indukcie. Výsledky sme kvantifikovali softvérom Gene Tools verzia 4.03.01.0 (SynGene). Po ukončení fermentácie sme sediment bakteriálnej kultúry skladovali pri -20°C.

Výsledky a diskusia

Sekvenciami pre jednotlivé His-tag sekvencie vloženými pomocou primerov (Tab. 1) metódou PCR za štiepne miesto pre restriktázu NdeI, sme pozmenili 5'koniec génu pre PT2. Pripravili sme štyri rôzne konštrukty obsahujúce His-tag prívesky na N-konci génu pre PT2. V jednotlivých His-tagoch sme sa nezamerali iba na preferenčné kodóny v *E. coli* pre histidín, ale taktiež aj na aminokyselinové zloženie pred jednotlivými His-tagmi (Obr.1).

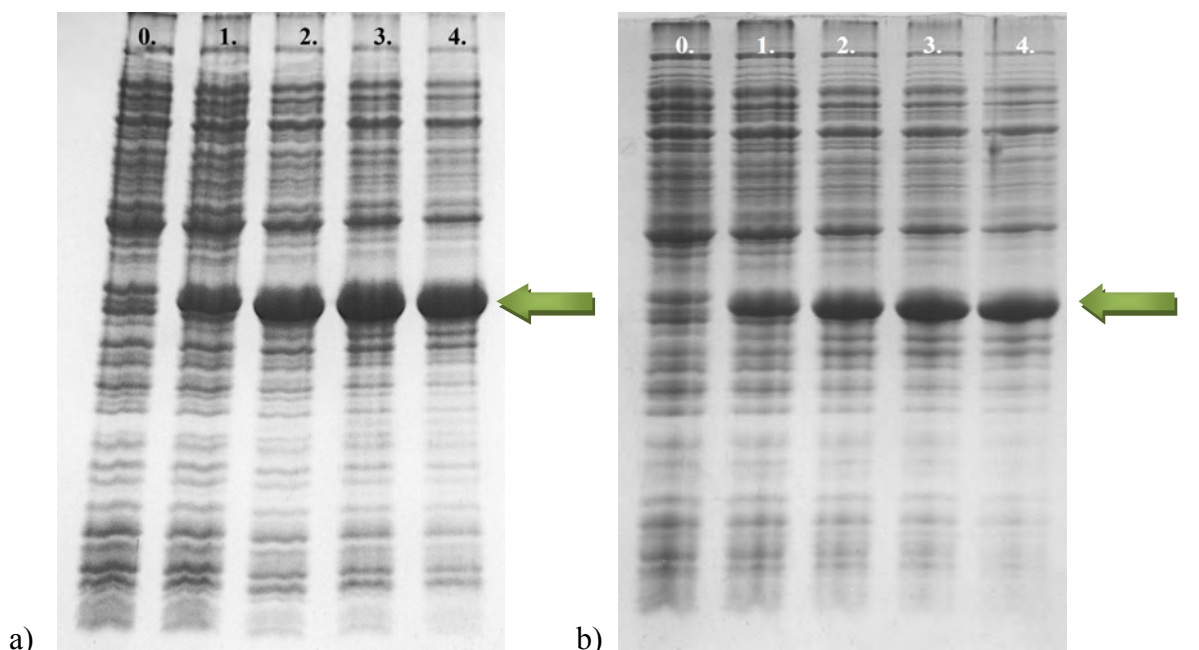


Obr. 1.: Sekvencie jednotlivých génov obsahujúcich rôzne sekvencie pre afinitný His-tag

Vytvorenými expresnými vektormi pJK100-HT1PT2, pJK100-HT2PT2, pJK100-HT3PT2, sme transformovali hostiteľské bunky *E. coli* K12 RV308ai a BL21ai [6].

Na kultiváciu buniek určených na heterologickú expresiu sme v baničkách používali TB médium. Expresiu rekombinantného proteínu sme v kmeňoch *E. coli* K12 RV308ai

a BL21ai indukovali s rôznymi hodnotami koncentrácie induktora L-arabínózy v intervale 0,005 – 0,1% pri optickej hustote buniek OD_{600} 0,8 a OD_{600} 1. Expresnú fázu sme sledovali po dobu 4 hodín. Pri jednotlivých konštruktoch sme zaznamenali rôzne vysokú produkciu rekombinantného proteínu, pričom najvyššiu úroveň expresie sme zaznamenali pri proteíne HT3PT2, kde pri indukcii expresie pri OD_{600} a koncentrácii L-arabínózy 0,1% po štvrtej hodine od indukcie bola úroveň expresie 38,7% (Obr 2a). Vysokú úroveň expresie tohto cieľového proteínu sme zaznamenali aj pri zmenených podmienkach heterologickej expresie (optická hustota buniek pri indukcii expresie, koncentrácia induktora). V ďalšom kroku nasledovala optimalizácia expresie vybraného proteínu HT3PT2 v kultúrach s vysokou koncentráciou buniek vo fermentore. Na kultiváciu buniek sme použili modifikované chemicky definované médium, pričom pri indukcii cieľového proteínu pri $OD_{600} = 19$ s 1% arabínózou sme dosiahli úroveň expresie až 36,4% (Obr.2b).



Obr. 2 SDS-PAGE profil proteínov transformovaných buniek *E. coli* BL21ai s plazmidom nesúcim gén pre a) HT3PT2 produkovanom v 50ml TB média v baničke a b) HT3PT2 produkovanom v 1l modifikovaného chemicky definovaného média vo fermentore

- a) Indukcia expresie HT3PT2 s 0,1 % arabínózou; pri $OD_{600} = 0,900$; pri teplote 37°C počas celej doby kultivácie. Dráhy: 1.-5. – 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h po indukcii; úroveň expresie HT3PT2 po 4.h.: 38,7%
- b) Indukcia expresie HT3PT2 s 1 % arabínózou; pri $OD_{600} = 19$; pri teplote 37°C počas celej doby kultivácie, pH= 7,2 Dráhy: 1.-5. – 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h po indukcii; úroveň expresie HT3PT2 po 4. h.: 36,4 %

Po optimalizovaní podmienok expresie nasledovala izolácia rekombinantného proteínu z inklúzných teliesok. Na solubilizáciu inklúzných teliesok sme na porovnanie použili $8 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ močovinu a $6 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ guanidín hydrochlorid, pričom vyššie výtťažky solubilného proteínu oproti nerozpustnej frakcii sme zaznamenali v $8 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ močovine.

Záver

Podarilo sa nám pripraviť štyri konštrukty obsahujúce rôzne cieľové gény pre pretrombín-2 s rôznymi sekvenciami pre His-tag vnesenými na 5'konci génu. Týmito expresnými vektormi sme transformovali bunky *Escherichia coli* RV308ai, BL21ai a následne sme optimalizovali podmienky expresie, pričom sme dosahovali vysoké úrovne expresie cieľového proteínu. Následne sme vybraný proteín HT3PT2 vyznačujúci sa najvyššími úrovňami expresie vybrali pre expresiu v kultúrach s vysokou hustotou buniek vo fermentore, kde sme pomocou modifikácie chemicky definovaného média dosiahli taktiež pomerne vysokú úroveň expresie. Následne bol rekombinantný proteín izolovaný a solubilizovaný z inklúzných teliesok. V ďalších krokoch bude nasledovať purifikácia proteínu metódou IMAC na niklovej matrici a taktiež aj jeho revitalizácia na kolónke.

Pod'akovanie

Práca vychádza z projektu štrukturálnych fondov ASF EU na tému: Priemyselný výskum nových liečiv na báze rekombinantných proteínov (ITMS 26240220034).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Bates, S. M., Weitz, J. I. (2006) Br. J. Haematol. 134, p. 3–19
- [2] So, I.S., et al. (1992) KoreanBiochem. J. 25, p. 60-65
- [3] Soejima, K., et al. (2001) J. Biochem 130, p. 269-277
- [4] Bode, W., et al. (1989) EMBO J. 8, p. 3467–3475
- [5] Birnboim, H. C., Doly, J. (1979) Nucleic Acids Res. 7(6), p. 1513
- [6] Krahulec, J., Hyršová, M., Pepeliaev, S., et al. (2010) Appl. Microbiol. Biotechnol. 8(1), p. 167
- [7] Laemmli, U. K. (1970) Nature 227(5259), p. 680

Príprava a analýza cDNA z miRNA-21 pre použitie v kapilárnej izotachoforéze malých nukleových kyselín

Martina Šnegoňová¹, Milan Fraňo²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, Mlynská dolina, 84215 Bratislava, Slovenská Republika; schmegy@gmail.com

²Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 84215 Bratislava, Slovenská Republika

Abstrakt

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs molecules, that negatively regulate gene expression at the post-transcriptional level. RNA are suitable biomolecules in the development of new affinity diagnostic methods using DNA:RNA hybridization. In real samples miRNAs are difficult to quantify, because of their low concentration and rapid degradation by ribonucleases. This paper describes the preparation of cDNA from one of the main onco-RNA miR-21 and its detection by capillary isotachopheresis. The total RNA from HeLa cells was isolated, subsequently the miR-21 cDNA was prepared using PCR with stem-loop primer and cloned in *E. coli* inserting to the pJET 1.2 vector. This cDNA was also chemically modified at the 5' end by amino group. Prepared DNA and RNA was used to set the conditions for capillary isotachopheresis in the analysis of small nucleic acids.

Kľúčové slová: miRNA; cDNA; PCR; izotachoforéza

Úvod a formulácia cieľa

MikroRNA sú nekódujúce molekuly RNA, negatívne regulujúce expresiu génov na post-transkripčnej úrovni. Negatívna regulácia expresie pomocou miRNA bola potvrdená u rôznych ochorení, vrátane rakoviny. V našom laboratóriu sa venujeme riešeniu širšieho problému regulácie angiogenézy cez interakcie VEGF a VEGF-R pri rakovinovom ochorení, čo zahŕňa aj reguláciu pomocou miRNA. Tieto sa pri ich nízkej koncentrácii a rýchlej degradácii ribonukleázami v reálnych vzorkách náročne kvantifikujú. Záujem v našom laboratóriu sa upriamuje na hybridizáciu vybranej markerovej miRNA s komplementárnym oligonukleotidom a analýzu príslušného duplexu kapilárnou izotachoforézou s fluorescenčnou detekciou. Pre kvantifikáciu miRNA je nutné vykonať série experimentov s optimalizovaním podmienok stanovenia kapilárnej izotachoforézy a fluorescenčnej detekcie. Objavenie rozdielov v expresii miRNA medzi zdravým a chorým tkanivom, alebo medzi rôznymi druhmi ochorení, ich vývojového štádia a rozsahu, spolu s našimi znalosťami identifikácie miRNA, podieľajúcich sa pravdepodobne na vzniku a vývoji ochorenia, nám dávajú silnú zbraň v podobe miRNA markera pre diagnostiku a prognózu ochorenia [1].

Cieľom práce bolo:

- pripraviť pomocou PCR so stem-loop primerom príslušnú cDNA pre jednu z hlavných onko-RNA (miR-21)
- pripraviť 5'-aminomodifikovanú cDNA pre prípravu cDNA sondy na detekciu hybridizácie
- analyzovať pripravené vzorky krátkych nukleových kyselín kapilárnou izotachoforézou

Materiál a metódy

Zo zbierky kmeňov katedry organickej chémie (CH2-150) sme použili konštrukty uvedené v tab. 1.

Tab. 1 Bunkové kmene, konštrukty, expresné vektory, primery

syntéza cDNA	SuperScript-First-Stand Synthesis System for RT-PCR stem-loop primer: 5'GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACT CAA CA 3' Forward primer 5' GCCCCTAGCTTATCAGACTGATG 3' Reverse primer 5'GTGCAGGGTCCGAGGT 3'	Invitrogen KRD, SR KRD, SR KRD, SR
pJET 1.2	bla (ApR), eco471R s MCS, P lacUV5, rep.(pMB1)	Fermentas
E.coli TG1	SupEthi-1 (lac-proAB hsd(5 (F' traD36+proAB+lacIq lacIq lacZ (M15)))	KOCH

Syntéza cDNA z izolovanej celkovej RNA HeLa buniek bola robená podľa manuálu firmy Invitrogen (SuperScript-First-Stand Synthesis System for RT-PCR) pre gén špecifické primery s použitím stem-loop primeru pre miR-21. Reverzná transkriptáza v optimálnych podmienkach syntetizovala komplementárne vlákno k miR-21 pomocou špecifického stem-loop primeru a následne prepísala toto vlákna do cDNA, komplementárnej s pôvodnou miR-21. Syntetizovaná cDNA so sekvenciou 5'- GTG CAG GGT CCG AGG TAT TCG CAC TGG ATA CGA CTG AAC ATC AGT CTG ATA AGC TAG CGG GC – 3' bola hneď po syntéze použitá na PCR, zvyšok sa uchoval pri -20°C.

Takto pripravenú cDNA sme ligovali do pJET1.2 klonovacieho vektora a transformovali do kompetentných buniek *E.coli* TG1. Bunky sme kultivovali na tuhom LB médiu s 0,1M ampicilínom pri 37°C do OD = 0,5.

Na amplifikáciu klonovanej cDNA a kontrolu jej kvality sa použila PCR metóda. K master mixu pre PCR sa pridali 2 µl cDNA. PCR amplifikácia prebiehala v termocykléri Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) nastavenom na program pre krátke DNA podľa rozpisu v tab.2.

Tab. 2 PCR program pre krátke DNA

Krok	teplota	čas	počet cyklov
Počiatočná denaturácia	94°C	2 min.	1x
Denaturácia	90°C	30 sec.	40 x
Polymerizácia	65°C	30 sec.	

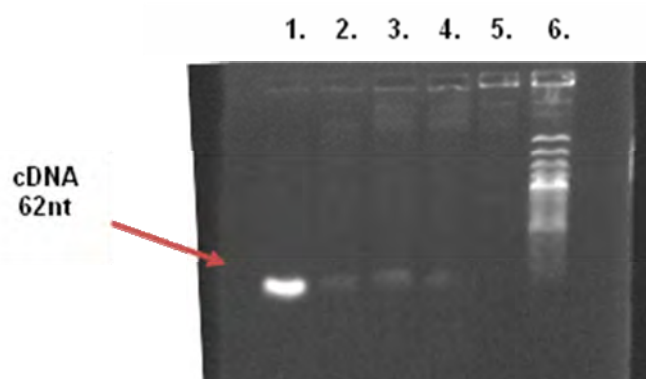
Pripravená cDNA bola modifikovaná diaminohexánom karbonyldiimidazolovou metódou [2] a následne 5'-aminoalkyl cDNA reagovala s NHS-biotínom [3] na 5'-biotinylovanú cDNA.

cDNA sa fluorescenčne analyzovala na spektrofluorimetri F2000 od firmy Hitachi pri excitačnej vlnovej dĺžke 380 nm meraním emisných spektier v rozsahu 400-600 nm. Meraný roztok obsahoval v 1ml 50mM HEPES (pH= 7,32), 0,1M NaCl, 5 μ l (1 μ M) chemosenzora MG6 [4] a 5 μ l preparátu nukleovej kyseliny (cDNA, 5' biotinylovanej cDNA).

Technikou kapilárnej izotachofórey (pITP Villa Labeco s UV-VIS detektorom) sa analyzovala cDNA a vzorka totálnej RNA z HeLa buniek. 10 μ l vzorky (cDNA -2,8 μ g/ml, totálnej RNA -1,2 μ g/ml) bola nanášaná medzi vedúci elektrolyt (LE) (10mM histidín, 10mM histidín HCl, pH= 6,2) a zakončujúci elektrolyt (5mM kys. glutámová, 10mM histidín, pH= 6,2). Pre separáciu vzorky totálnej RNA sa použil vedúci elektrolyt s prídavkom 2% polyvinylpyrolidónu (PVP).

Výsledky a diskusia

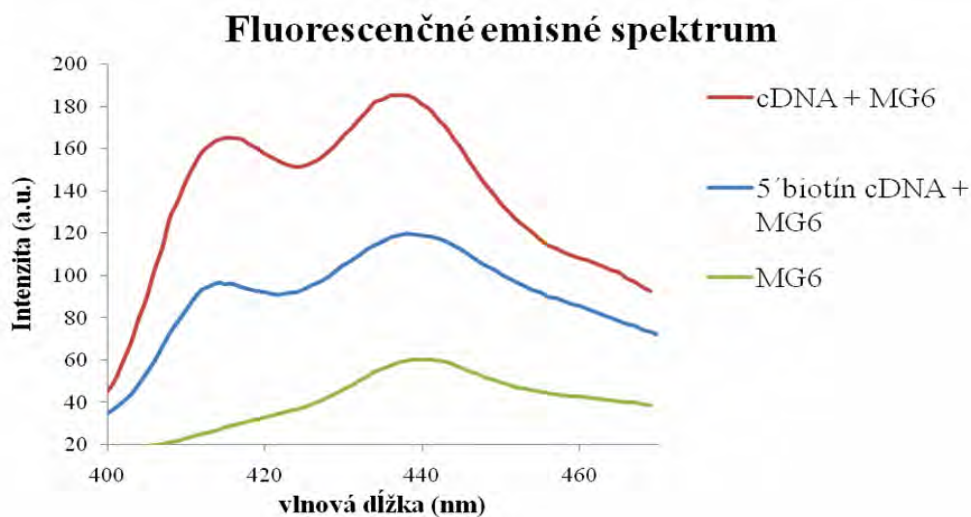
PCR analýza cDNA z miR-21 (Obr.1)



Obr.1 Elektroforeogram analýzy cDNA v 1,5% agarózovom géli, vizualizácia s GelRed. 1. dráha – cDNA po syntéze reverznou transkriptázou a následnej PCR (32.3 μ g/ml), 2-4. cDNA izolovaná z buniek *E.coli* TG1 s konštruktom cDNA po PCR (18.3- 20,1 μ g/ml) 5. negatívna kontrola, 6. Low Range DNA Ladder (Fermentas)

Z výsledkov PCR s gén špecifickými primermi vyplýva, že hladina izolovanej cDNA z buniek *E.coli* TG1 s konštruktom pJET1.2/cDNA je síce nižšia ako pri priamej syntéze

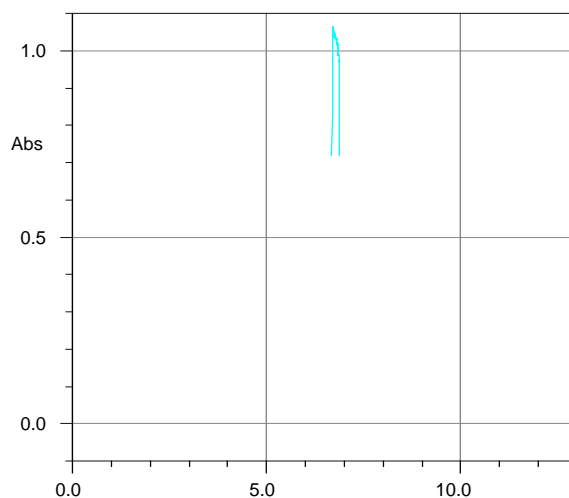
cDNA reverznou transkriptázou, ale touto cestou máme k dispozícii bunky s konštruktom príslušnej cDNA, ktoré je možné použiť priamo na amplifikáciu bez použitia reverznej transkriptázy.



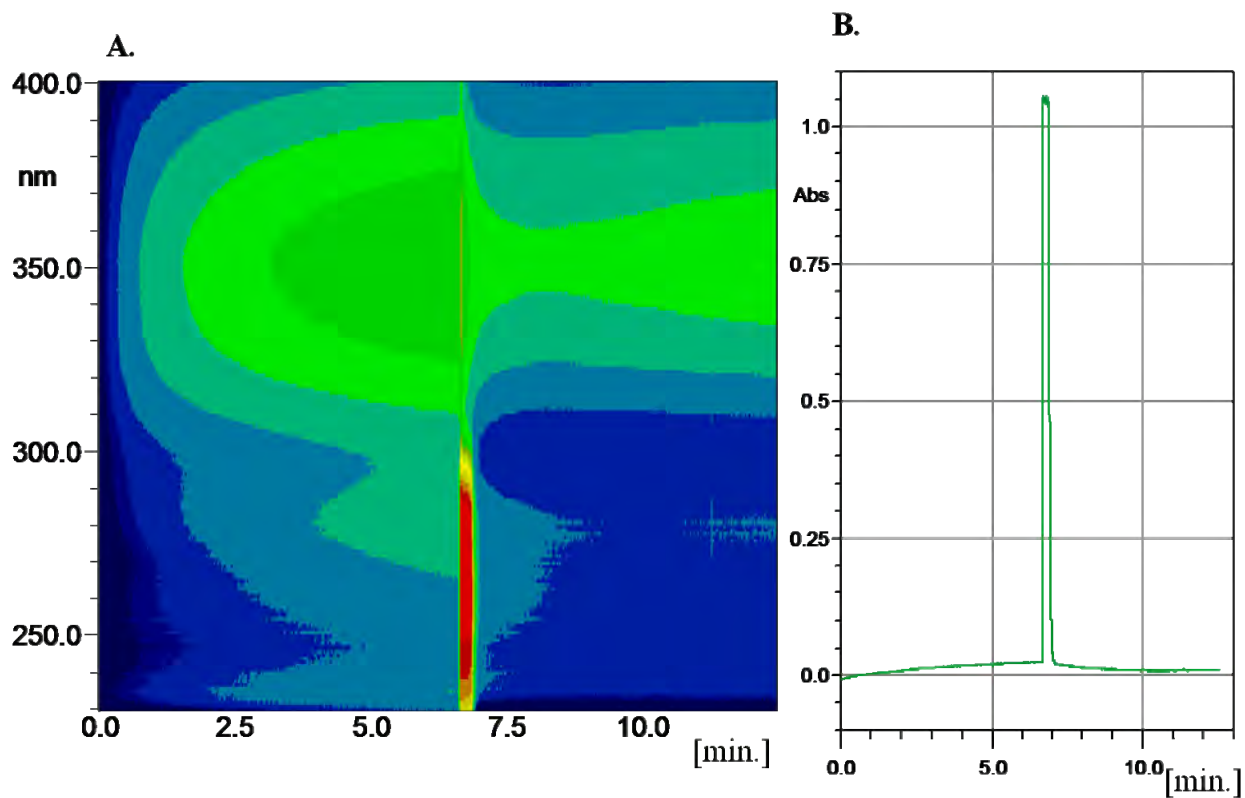
Obr. 2 Fluorescenčné emisné spektrum chemosenzora MG6 ($1\mu\text{M}$) s cDNA (62 nt) ($10.3\mu\text{g/ml}$) a 5' biotinylovanej cDNA ($8\mu\text{g/ml}$) v 50mM tlmivom roztoku HEPES (pH= 7,32), excitácia pri 380nm

Pripravená cDNA bola analyzovaná fluorescenčnou metódou. Koncentrácia pripravenej 5' biotinylovanej cDNA po prezrážaní bola nižšia oproti pôvodnej cDNA pred modifikáciou.

Kapilárna izotachoforéza je rýchla a účinná technika vhodná na zakoncentrovanie a separáciu malých fragmentov nukleových kyselín z reálnych vzoriek. Z našich výsledkov je zrejмый vplyv PVP na separáciu jednotlivých fragmentov RNA.

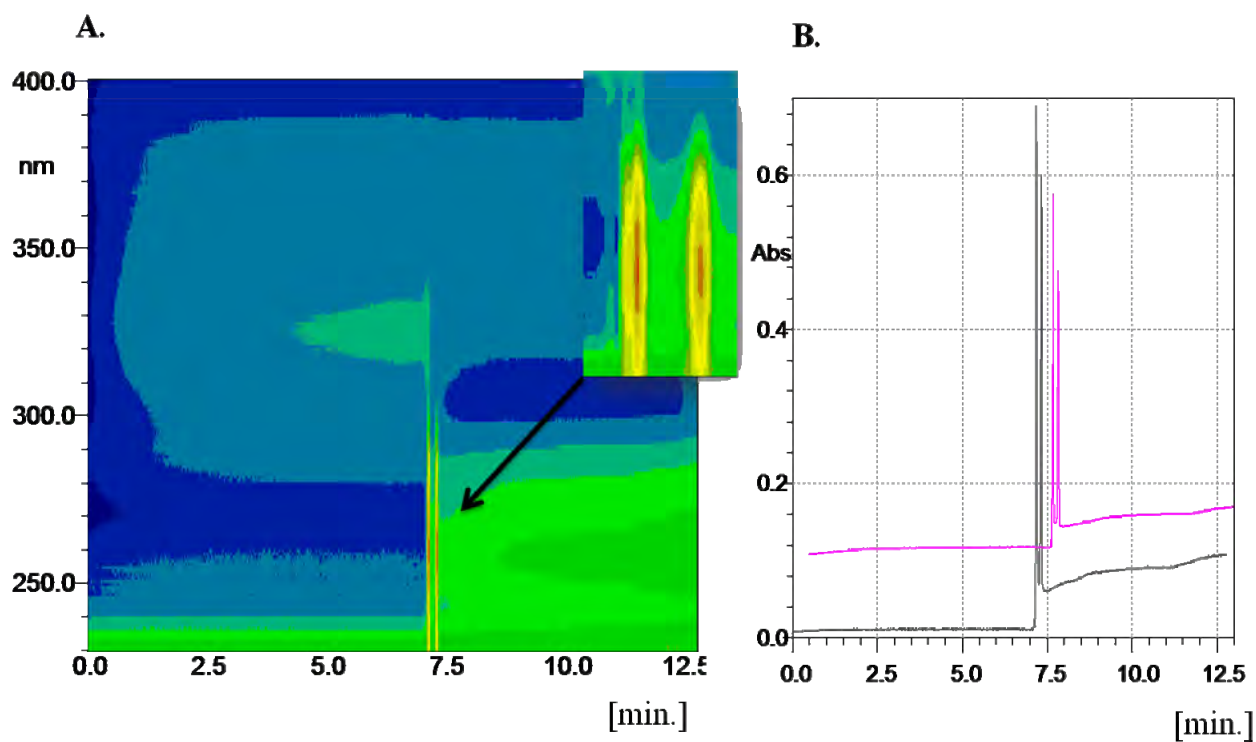


Obr. 3 Elektroforeogram z ITP cDNA pri $\lambda = 260\text{ nm}$



Obr. 4 A. Elektroforeogram z ITP separácie totálnej RNA (bez prídavku PVP v LE)

B. Elektroforeogram z ITP pri $\lambda = 260$ nm



Obr. 5 A. Elektroforeogram z ITP separácie totálnej RNA (s prídavkom 2% PVP v LE)

B. Elektroforeogram z ITP pri $\lambda = 260$ a 280 nm, posun v osi X aj Y

Z porovnania obr. 4 a obr. 5 je viditeľná separácia vzorky totálnej RNA metódou ITP v LE s prídavkom 2% PVP podľa veľkosti fragmentov. Pre jemnejšiu separáciu fragmentov RNA je nutné optimalizovať podmienky ITP, hlavne pH a koncentráciu PVP v LE.

Záver

Z HeLa buniek sme izolovali totálnu RNA obsahujúcu miR-21, z ktorej sme technikou gén špecifického stem-loop primera pripravili príslušnú cDNA. Kvantitu a kvalitu cDNA sme potvrdili pomocou PCR s gén špecifickými primermi. Pripravenú cDNA sme klonovali v bunkách *E.coli* TG1 s konštruktom pJET1.2/cDNA. Úspešnosť klonovania sme potvrdili izoláciou cDNA z buniek *E.coli* TG1 s konštruktom obsahujúcim cDNA a následnou PCR. Chemickým postupom sme pripravili 5'-biotinylovanú cDNA pre ďalšiu imobilizáciu na magnetické mikročastice pokryté streptavidínom. Optimalizovali sme podmienky stanovenia malých nukleových kyselín kapilárnou izotachoforézou použitím vzoriek cDNA a totálnej RNA.

Pod'akovanie

Práca bola realizovaná vďaka podpore grantovej agentúry VEGA z grantov 1/0962/12 (zodp. riešiteľ P. Koiš) a 1/1305/12 (zodp. riešiteľ J. Marák).

Za diskusiu a pomoc pri izotachoforetických analýzach ďakujem doc. Marákovi z katedry analytickej chémie Prif UK.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Wang Z., Yang, B. (2010) *MicroRNA Expression Detection Methods*. Springer Heidelberg Dordrecht London, New York, USA, p. 3
- [2] Kisko E. M., Barton J. K. (2002) *Meth Enzymol.* 353(506), p. 268
- [3] Wachter L., Jablonski J.-A., Ramachandra K. L. (1986) *Nucl. Acid Res.* 14(20), p. 7985
- [4] Gallee M. (2012) *Príprava a použitie chemosenzorov pre fluorescenčné testy glykozylntransferáz*. (Diplomová práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, s. 68

Expresia hodinových génov *per2*, *clock* a *npas2* a glukózových transportérov v tkanivách chránených a nechránených hematoencefalickou bariérou u kontrolných a diabetických potkanov

Dorota Šoltésová¹, Lucia Koyšová¹, Anna Veselá¹, Boris Mravec^{2,3}, Iveta Herichová¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; soltesova@fns.uniba.sk

² Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Ústav patologickej fyziológie, Sasinkova 4, 811 08, Bratislava, Slovenská republika

³ Slovenská akadémia vied, Ústav experimentálnej endokrinológie, Vlárská 3, 833 06 Bratislava, Slovenská republika

Abstrakt

Circadian system allows organisms to remain synchronized with rhythmic environmental changes during a 24h period. Molecular mechanism of circadian oscillation is based on rhythmic expression of clock genes organized in feedback loops. Synchronization of physiological processes with external changes is beneficial for wellbeing and health. Diabetes is associated with disturbed daily rhythms. We used model of streptozotocin-induced diabetes to study the influence of diabetes-dependent metabolic changes on clock gene (*clock*, *npas2*, *per2*) expression in tissues localized inside (cerebellum, frontal cortex) and outside (heart, kidney) the blood-brain barrier. We focused also on *glut1* and *glut4* expression. Sampling was performed 17 days after diabetes induction. Gene expression was analyzed by real-time PCR. We observed a phase advance in clock gene expression and down-regulated *glut1* and *glut4* expression in the heart of diabetic rats. The most profound changes were observed in frontal cortex of diabetic rats, showing up-regulated *npas2* expression.

Kľúčové slová: cirkadiány; rytmus; srdce; oblička; frontálny kortex; cerebellum; glut; npas2.

Úvod a formulácia cieľa

Všetky živé organizmy disponujú cirkadiánnym systémom, ktorý im umožňuje zosúladiť fyziologické procesy s environmentálnymi cyklami s periódou 24h [1]. Nesúlad medzi cyklickými zmenami prostredia a fyziologickými dejmi môže viesť k zvýšenej náchylnosti na ochorenia a celkovej únave organizmu [2].

Cirkadiánný systém cicavcov má hierarchickú štruktúru. Centrálny oscilátor prítomný v suprachiazmatických jadrách (SCN) hypotalamu synchronizuje periférne oscilátory v ostatných tkanivách [2]. Cirkadiánne oscilátory na podklade rytmickej expresie hodinových génov modulujú mnohé fyziologické deje. Expresia hodinových génov je generovaná a regulovaná sieťou poprepájaných transkripčno-translačných spätnoväzobných slučiek [3]. V týchto slučkách zohrávajú kľúčovú úlohu transkripčné faktory *clock* a *bmal1*. Vzniknutý proteínový heterodimér CLOCK/BMAL1 väzbou na promótorovú sekvenciu E-box spúšťa transkripciu hodinových génov, medzi ktoré u cicavcov patria *per* a *cry* gény. Novovytvorený heterodimér PER/CRY interaguje s heterodimérom CLOCK/BMAL1 tak, že zabraňuje ním

sprostredkovanvej aktivácii transkripcie génov *per* a *cry* [4].

Pomocou experimentov využívajúcich geneticky modifikované myši s knock-out mutáciou génu *clock* bola odhalená existencia funkčného homológu *clock*, transkripčného faktoru *npas2* [5]. *Npas2* má dominantnú úlohou v periférnych oscilátoroch frontálneho kortexu, ktorý je zodpovedný za nastavovanie a riadenie rytmickosti pohybovej aktivity generovanej centrálnym oscilátorom v SCN [6, 7]. Myši s deléciou *npas2* sú charakteristické zmeneným správaním. Sú schopné rýchlejšie sa prispôsobiť zmenenému svetelnému režimu v porovnaní s kontrolnými zvieratami, ale majú obmedzenú schopnosť synchronizácie na nový potravný režim [8], čo je sprevádzané rapídnyim úbytkom hmotnosti [9].

Je známe, že niektoré patofyziologické stavy (diabetes, artritída, niektoré neurobehaviorálne ochorenia) sú funkčne prepojené so zmenami v cirkadiánnom systéme [10, 11, 12]. Vzájomný vzťah je zvyčajne obojstranný: choroba mení funkciu cirkadiánného systému, a zmeny v činnosti cirkadiánného systému zhoršujú priebeh ochorenia. Dôvody narušenia činnosti cirkadiánného systému počas ochorenia čiastočne spočívajú v hierarchickej organizácii systému. Zatiaľ čo centrálny oscilátor je synchronizovaný predovšetkým svetelným režimom, periférne oscilátory sú ovplyvnené najmä humorálnymi signálmi [2, 13, 14]. Ochorením narušená signalizácia môže spôsobiť odpojenie periférnych oscilátorov od centrálného oscilátora. Počas diabetu dochádza k masívnym zmenám hladín glukózy, ketolátok a mastných kyselín v plazme, ktoré môžu ovplyvňovať expresiu génov v periférnych oscilátoroch [15, 16]. Už v minulosti bolo dokázané, že glukóza je schopná ovplyvniť svetelnú synchronizáciu cirkadiánných oscilátorov ako aj expresiu hodinových génov [17, 18, 19].

V našej práci sme si preto vybrali model streptozotocínom (STZ)-indukovaného diabetu, v ktorom dochádza k deštrukcii beta-buniek pankreasu a zníženej až eliminovanej tvorbe inzulínu [20]. Zamerali sme na štúdium vplyvu STZ-indukovaného diabetu na expresiu hodinových génov v periférnych oscilátoroch tkanív chránených (frontálny kortex, mozoček) ako aj nechránených (srdce, oblička) hematoencefalickou bariérou. Ďalším cieľom bolo zistenie úlohy glukózových transportérov *glut1* a *glut4* v zmenách expresie hodinových génov v periférnych oscilátoroch diabetických jedincov.

Materiál a metódy

V pokuse bolo použitých 52 samcov potkanov kmeňa Wistar. Potkany vo veku 15-17 týždňov boli umiestnené v skupinových chovných klietkach po 2-6 jedincoch s prístupom k vode a potrave *ad libitum*. Pred začiatkom experimentu boli zvieratá 3 týždne

synchronizované na stabilný svetelný režim 12h svetla a 12h tmy. Začiatok svetlej fázy dňa je definovaný ako Zeitgeber time (ZT) 0, začiatok tmavej fázy dňa je označovaný ZT 12. Po uplynutí doby aklimatizácie boli zvieratá rozdelené na kontrolnú a experimentálnu skupinu. Potkanom v experimentálnej skupine bol injekčne aplikovaný STZ (CALB57201-1GM, Calbiochem, Merck) v dávke 65mg/kg telesnej hmotnosti, rozpustený v 0,1M citrátovom pufri. Kontrolnej skupine zvierat bol injekčne podaný zodpovedajúci objem 0,1M citrátového pufri. Vývin diabetu bol monitorovaný diagnostickými prúžkami PHAN[®] pre analýzu moču (Pliva Lachema, Česká Republika).

Odbery tkanív prebiehali na 17.-18. deň po STZ injekcii, počas celého 24-h cyklu v šiestich časových bodoch : ZT 14, ZT 17, ZT 20, ZT 23, ZT 4 a ZT 8. Zo vzoriek srdca, obličiek, mozochku a frontálneho kortexu bola vyizolovaná celková RNA pomocou Tri-reagentu (MRC, USA) [21]. Izolovaná RNA zo vzoriek srdca, obličiek a mozochka bola prepísaná na cDNA použitím kitu the ImProm-II[™] Reverse Transcription System (Promega, USA). Syntéza komplementárnej cDNA zo vzoriek frontálneho kortexu prebehla pomocou kitu High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, USA).

Obsah cDNA hodinových génov *clock*, *npas2*, *per2* a housekeeping génu *rplp1* vo vzorkách bol kvantifikovaný metódou real-time polymerázovej reakcie (real-time PCR) (QuantiTect SYBR Green PCR Kit; QUIAGEN, Nemecko) v cykleri StepOne[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). V PCR reakcii boli použité primery: *per2* (AB016532) sense 5'-GCT CAC TGC CAG AAC TAT CTC C-3', antisense 5'-GGT GCA GAG GGA CAG CTA GA-3'; *clock* (NM_021856) sense 5'-CCA ACT CCT TCT GCC TCC TC-3'antisense 5'-ACC TCC GCT GTG TCA TCT TC-3'; *npas2* (NM_001108214) sense 5'-CGG GAC CAG TTC AAT GTT CT-3'antisense 5'-CCA TCT AAC GCC TCC AAC AT-3'; *rplp1* (NM_001007604.1) sense 5'-TCC ACA ACA ZGG CTT CTG TC-3'antisense 5'-GTG GTT CAC ACC CAT CAC CAA-3'. Kvantifikácia obsahu cDNA *glut1* a *glut4* vo vzorkách prebehla pomocou reagensí: TaqMan[®] Fast Advanced Master Mix a TaqMan[®] Gene Expression Assays Rn01417099_m1 (*glut4*), 4331182 TaqMan[®] Gene Expression Assays Rn01752377_m1 (*glut1*) podľa inštrukcií výrobcu (Applied Biosystems, USA).

Namerané hodnoty expresie hodinových génov a glukózových transportérov sme normalizovali vzhľadom k expresii housekeeping génu pre ribozomálny proteín, *rplp1*. Výsledky sme štatisticky vyhodnotili kosínorovou analýzou, významnosť rozdielov medzi dvomi skupinami bola hodnotená pomocou nepárového t-testu.

Výsledky a diskusia

Zaznamenali sme zmeny v expresii hodinových génov *clock*, *npas2* a *per2* potkanov so STZ-indukovaným diabetom. Expresia hodinových génov bola zmenená tak v mozgových tkanivách chránených hematoencefalickou bariérou ako aj na periférii, avšak zmeny mali odlišný charakter.

Naše výsledky naznačujú, že STZ-indukovaný diabetes môže ovplyvňovať periférne oscilátory v mozgu chránené hematoencefalickou bariérou. Najvýraznejšie zmeny sme zaznamenali na úrovni up-regulovanej expresie *npas2* vo frontálnom kortexe (t-test, $P < 0,01$). Ďalej sme vo frontálnom kortexe pozorovali vymiznutie rytmickej expresie *per2* (kosínorová analýza, $P < 0,01$) a pôvodne arytmiická expresia *clock* a *npas2* nadobudla u diabetických zvierat rytmický priebeh (kosínorová analýza, $P < 0,05$). Pozorovaný denný profil *per2* a *clock* vo frontálnom kortexe kontrolných potkanov sa zhodoval s výsledkami iných autorov [22, 23]. V mozočku sme pozorovali elimináciu rytmickej expresie *clock* a fázový posun v rytmickej expresii *per2* u diabetických potkanov (kosínorová analýza, $P < 0,001$).

Je známe, že zvýšená koncentrácia plazmatickej glukózy počas diabetu je sprevádzaná nárastom hladín extracelulárnej glukózy v mozgu [24, 25]. Niektorí autori zaznamenali, že zvýšená dostupnosť glukózy pre mozgové tkanivo môže byť kompenzovaná na úrovni expresie glukózových transportérov [26, 27]. V našej práci sme nezaznamenali rozdiely v expresii glukózových transportérov *glut1* a *glut4* vo frontálnom kortexe. Vo frontálnom kortexe aj mozočku hodnoty expresie glukózových transportérov diabetických jedincov zostali na úrovni expresie kontrolnej skupiny. V mozočku sme zaznamenali denný rytmus v expresii glukózových transportérov a u diabetických jedincov fázové predbiehanie rytmu expresie *glut1* (kosínorová analýza, $P < 0,05$). V súlade so známymi poznatkami sme zistili, že glukózový transportér *glut1* je v porovnaní s *glut4* signifikantne viac exprimovaný v mozgovom tkanive ako na periférii, zatiaľ čo na periférii je pomer expresie *glut1* a *glut4* obrátený.

V periférnych tkanivách sme pozorovali signifikantné zmeny v expresii všetkých meraných hodinových génov. Povaha týchto zmien sa líšila od zmien pozorovaných v mozgových tkanivách. V srdci a obličke potkanov so STZ-indukovaným diabetom sme zaznamenali fázové predbiehanie expresie *npas2* a *per2* (kosínorová analýza, $P < 0,001$). Fázové predbiehanie sme sledovali aj v expresii *clock* v diabetickom srdci (kosínorová analýza, $P < 0,01$). Pozorovanie fázového predbiehania rytmu expresie hodinových génov

v periférnych tkanivách zvierat so STZ-indukovaným diabetom je konzistentné s výsledkami iných autorov [28, 29, 30].

Na rozdiel od mozgových oblastí sme v srdci STZ-diabetických potkanov zaznamenali významnú down-reguláciu expresie glukózových transportérov *glut1* a *glut4* (t-test, $P < 0,0001$).

Záver

Pozorovali sme odlišný vplyv STZ-indukovaného diabetu na tkanivá chránené hematoencefalickou bariérou a na extracerebrálne tkanivá. V periférnych tkanivách, ako sú srdce a obličky, je odpoveď expresie hodinových génov podobná (fázové predbiehanie rytmu expresie) a expresia *glut1* a *glut4* je znížená. Expresia hodinových génov vo frontálnom kortexe je pozmenená inak ako expresia v mozochku, s najvýraznejším rozdielom pozorovaným v expresii *npas2*. V mozgových tkanivách diabetických potkanov nedochádza k zníženiu expresie *glut1* a *glut4*.

Nazdávame sa, že metabolické zmeny spôsobené STZ-indukovaným diabetom ovplyvňujú aj tie periférne orgány, u ktorých sa predpokladá, že ich činnosť je nezávislá od inzulínu. Naše výsledky ukazujú, že inzulín-dependentný typ diabetu je sprevádzaný zmenami génovej expresie v mozgových štruktúrach regulujúcich pohybovú aktivitu. Tieto zmeny, na rozdiel od periférnych tkanív, nie sú kompenzované zmenenou expresiou glukózových transportérov. Preto bude v budúcnosti pravdepodobne vhodné prehodnotiť úlohu jednotlivých glukózových transportérov a vplyv zvýšenej hladiny glukózy v diabete na nervovú činnosť.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporená grantom VEGA 1/1262/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Aschoff J. (1981) Handbook of behavioral neurobiology: IV. Biological rhythms. Plenum Press, New York:, 1981, pp. 25
- [2] Challet E. (2010) J. Comp. Physiol. B 180(5): p. 631
- [3] Shearman L. P., Sriram S., Weaver D. R., et al. (2000) Science 288(5468), p. 1013
- [4] Ko C. H., Takahashi J. S. (2006) Hum. Mol. Genet. 15(2), p. R271
- [5] DeBruyne J. P., Noton E., Lambert C. M., et al. (2006) Neuron 50(3) p.465
- [6] Reick M., Garcia J.A., Dudley C., et al. (2001) Science 293, p.506

- [7] Phillips C. I., Smith V. M., Antle M. C., et al. (2009) *Dev. Neurosci.* 31(5) p.412
- [8] Dudley C. A., Erbel-Sieler C., Estill S. J., et al. (2003) *Science*, 301 p.379
- [9] Wu X., Wiater M. F., Ritter S. (2010) *Physiol. Behav.* 99(4) p.466
- [10] Barnard A. R., Nolan P. M. (2008) *PLoS Genet.* 4, e1000040
- [11] Laposky A. D., Bass J., Kohsaka A., et al. (2008) *FEBS Lett.* 582(1) p.142
- [12] Hashiramoto A., Yamane T., Tsumiyama K., et al. (2010) *J. Immunol.* 184(3) p.1560
- [13] Sumová A., Trávníčková Z., Peters R., et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92(17) p.7754
- [14] Damiola F., Minh N. L., Preitner N., et al. (2000) *Genes Dev.* 14, p.2950
- [15] Kohsaka A., Laposky A. D., Ramsey K. M., et al. (2007) *Cell Metab.* 6(5) p.414
- [16] Oishi K., Uchida D., Ohkura N., et al. (2009) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29(10) p.1571
- [17] Challet E., Losee-Olson S., Turek F.W. (1999) *Am. J. Physiol.* 276(4 Pt 2) p.1063
- [18] Hirota T., Okano T., Kokame K., et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277(46) p.44244
- [19] Iwanaga H., Yano M., Miki H., et al. (2005) *JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.* 29(3) p.157
- [20] Szkudelski T. (2001) *Physiol. Res.*, 50(6) p.536
- [21] Chomczynski P., Sacchi N. (1987) *Anal. Biochem.* 162, p. 156
- [22] Warnecke M., Oster H., Revelli J.P., et al. (2005) *Genes. Dev.* 19 p.614
- [23] Silver I.A., Erecińska M. (1994) *J. Neurosci.* 14 p.5068
- [24] Jacob R. J., Fan X., Evans M. L., et al. (2002) *Metabolism* 51 p.1522
- [25] Puchowicz M. A., Xu K., Magness D., et al. (2004) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 24 p.449
- [26] Vannucci S. J., Koehler-Stec E. M., Li K., et al. (1998) *Brain Res.* 797 p.1
- [27] Lutz A. J., Pardridge W. M. (1993) 42 p.939
- [28] Young M. E., Wilson C., Razeghi P., et al. (2002) *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, p. 223
- [29] Oishi K., Kasamatsu M., Ishida N. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317 p.330
- [30] Herichová I., Zeman M., Stebelová K., et al. (2005) *Mol. Cell. Biochem.* 270, p. 223

Vizualizácia kremičitanových depozitov v *Sorghum bicolor* L. prostredníctvom fluorescenčnej mikroskopie

Milan Soukup, Michal Martinka

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyziológie rastlín, Mlynská dolina B2, 842 15 Bratislava, Slovenská Republika, soukup.em@gmail.com

Abstrakt

Endodermal cells of *Sorghum bicolor* L. develop remarkable aggregates of biogenic silica within the inner tangential cell wall. It is a suitable object for testing methods of visualisation of plant silica deposition by fluorescence microscopy. This study tested application of fluorescent dyes, used for staining of diatom silica thecae, for detection of silica in higher plants. Plants were cultivated in hydroponics containing silicon in the form of sodium silicate and one of three fluorescent dyes (rhodamine B, rhodamine 123, and neutral red). None of these dyes provided satisfying fluorescence of endodermal silica aggregates. Rhodamine B did not show any specific signal within the root tissues. Neutral red and rhodamine 123 stained cell walls of secondary thickened tissues with enhanced affinity to silicon deposition, but needs more detailed examination. Among these variants staining with neutral red did not display remarkable toxic effects on rooting system and thus seems to be eligible dye for further experiments on silica fluorescent staining protocols.

KLúčové slová: *Biomínerezácia, fluorescenčná mikroskopia, oxid kremičitý, Sorghum bicolor L.*

Úvod a formulácia cieľa

Kremík je po kyslíku najviac zastúpeným prvkom v zemskej kôre. Napriek tomu, že sa neradí medzi esenciálne prvky pre rastliny, poskytuje im množstvo benefitov. Zvyšuje napríklad mechanickú pevnosť pletív, čím tiež posilňuje odolnosť voči rôznym biotickým stresorom ako sú huby a plesne. Napomáha tiež vysporiadavať sa s abiotickými stresmi ako chlad, zasolenie, UV žiarenie a vodný deficit [1, 2]. Popri tom sa doposiaľ nepotvrdil žiaden negatívny vplyv kremíka na rastliny, ani v prípade jeho nadbytku v substráte. Priama interakcia kremíka s rastlinným metabolizmom zatiaľ nie je známa, a teda mechanizmus jeho benefičných vplyvov na rastliny je nejasný [1, 3].

Množstvo jednoklíčolistových druhov rastlín, najmä tráv, vytvára v niektorých svojich bunkách a mimobunkových priestoroch druhovo špecifické agregáty oxidu kremičitého (biogénny opál). Predpokladá sa, že slúžia na ochranu rastliny pred požerom, poškodením a patogénmi. Mechanizmus ich tvorby však nie je známy, a teda ich fyziologické funkcie môžu byť oveľa komplexnejšie. Oxid kremičitý popri tom tiež nachádza široké spektrum využitia v elektronike a technológiách [4, 5]. Jeho umelá príprava však vyžaduje extrémne hodnoty tlaku, teploty a pH, a teda teoretická možnosť riadenej biomínerezácie oxidu kremičitého v rastlinách môže poskytovať perspektívne riešenie tejto problematiky [6].

Dlhodobým výskumným zámerom je sledovanie vplyvu rôznych abiotických faktorov na morfológiu a lokalizáciu agregátov oxidu kremičitého v rastlinnom organizme so zámerom identifikovať metabolické procesy podieľajúce na biomineralizácii. Identifikácia a lokalizácia týchto agregátov v neporušených pletivách a orgánoch je však problematická pre ich priehľadnosť, mikroskopické rozmery, prípadne časovú a finančnú náročnosť momentálne využívaných techník (napr. energiovo-disperznej röntgenovej analýzy – EDAX). Naším prvým čiastkovým cieľom je vizualizácia agregátov oxidu kremičitého v rastlinných bunkách pomocou fluorescenčnej mikroskopie.

Materiál a metódy

V pokusoch sme využívali druh *Sorghum bicolor* L., charakteristický vytváraním výrazných agregátov oxidu kremičitého v endodermálnych bunkách koreňa [7]. Semená rovnakej morfológie sme sterilizovali a nechali 24 hodín napučiať v destilovanej vode. Napučané semená sme ďalej nakličovali v rastovej komore po dobu 3 dní v konštantných podmienkach, v tme, pri teplote 25,5 °C a 70 % vzdušnej vlhkosti. Klíčence sme následne umiestnili do polystyrénových držiakov a vložili do hydroponických médií charakterizovaných nižšie.

Kontrolné hydroponické médium pozostávalo z destilovanej vody a roztoku Na_2SiO_3 vo výslednej koncentrácii 2,5 mmol/dm³. V pokusoch sme testovali farbivá využívané na vizualizáciu kremičitanových schránok rozsievok (rodamín B a rodamín 123) [8] a neutrálnu červen, využívanú k vitálnemu farbeniu kyslých bunkových kompartmentov [9]. Neutrálna červen sa teda používa v aplikáciách podobných ako rodamíny pri rozsievkach. Farbivá sme pridávali ku kontrolnému hydroponickému médiu vo výslednej koncentrácii 1 $\mu\text{mol/dm}^3$ pri rodamínoch a 2,5 $\mu\text{mol/dm}^3$ pri neutrálnej červeni. Výsledné pH hydroponických médií sme následne upravili na hodnotu 5,8.

Rastliny sme kultivovali v rastovej komore so svetelným režimom 16 h svetlo/8 h tma, s intenzitou osvetlenia 150 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ a 75 % vzdušnej vlhkosti po dobu troch dní.

Po kultivácii sme vyhotovili ručné priečne rezy primárnych seminálnych koreňov z oblasti 2 – 3 cm od bázy koreňa a vzorky sme pozorovali vo fluorescenčnom mikroskope (Axioskop 2 plus, Carl Zeiss) pri excitačnom filtri TBP 400 + 495 + 570, chromatickom deliči lúča TFT 410 + 505 + 585 a bariérovom filtri TBP 460 + 530 + 610 (vlnové dĺžky sú uvedené v nm). Obrazovú dokumentáciu sme zhotovili digitálnou kamerou DP72 (Olympus) a softvérom Quick Photo Micro (Olympus).

Pre zistenie vplyvu použitých médií na rastliny sme merali produkčné parametre rastlín (dĺžky, priemery a početnosť primárnych a bočných koreňov).

Výsledky a diskusia

Cieľom tejto práce bolo vyvinúť metodiku, ktorá by umožnila rýchlu a nenáročnú vizualizáciu kremičitanových agregátov v rastlinách, za účelom sledovania vplyvu vonkajších faktorov na ich lokalizáciu a morfológiu a tiež identifikácie metabolických procesov počas biomineralizácie kremíka v rastlinách.

Predklíčené rastliny *Sorghum bicolor* L. sme kultivovali v hydroponických médiách obohatených o rodamín 123, rodamín B alebo neutrálnu červen. Tieto farbivá sa využívajú pri značení kremičitanových schránok rozsievok, pričom sa predpokladá, že počas biomineralizácie kremíka dochádza k inkorporácii farbiva do štruktúr kremičitanových schránok, ktoré je následne možné vizualizovať pomocou fluorescenčnej mikroskopie [3, 8].

Autofluorescenčná emisia bunkových stien *S. bicolor* kontrolnej vzorky je v modrej oblasti elektromagnetického spektra a je pravdepodobne spôsobená prítomnosťou kyseliny ferulovej v bunkových stenách [10]. Intenzita fluorescencie bunkových stien sa depozíciou lignínu zvyšuje [11]. Najvýraznejšiu autofluorescenciu vykazovali centrifugálne časti bunkových stien protoxylému a zvýraznená bola tiež vnútorná tangenciálna stena buniek endodermu. Veľmi slabá modrá fluorescencia agregátov oxidu kremičitého v endodermálnych bunkách bola pravdepodobne iba odrazom autofluorescencie endodermálnej bunkovej steny.

Priečne rezy primárnych koreňov rastlín z variantu s prídavkom rodamínu B emitovali intenzívne červené žiarenie. Nedošlo však k špecifickému odlíšeniu buniek, prípadne ich častí. Fluorescenčná emisia kremičitanových schránok rozsievok vizualizovaných pomocou rodamínu B bola v oranžovej až červenej oblasti svetelného spektra [8].

Použitie rodamínu 123 vyvolalo zelenú fluorescenciu bunkových stien a obsahu buniek primárnej kôry. Rovnako ako v kontrolnom variante, došlo k zvýšeniu intenzity fluorescencie lignifikovaných bunkových stien. Výraznejšie boli bunkové steny protoxylémových ciev, niekoľkých centrálnych buniek, a vnútorných tangenciálnych stien buniek endodermu. Vonkajšia tangenciálna stena endodermu emitovala tmavočervené svetlo. Veľmi slabá zelená fluorescencia agregátov oxidu kremičitého bola pravdepodobne ako v kontrole iba odrazom fluorescencie endodermálnych bunkových stien. Pri rozsievkach rodamín 123 spôsobil emisiu zelenej fluorescencie ich kremičitanových schránok [8].

Prídavok neutrálnej červene v hydroponickom médiu vyvolal žltú fluorescenciu

vnútornej tangenciálnej steny buniek endodermu a bunkových stien protoxylému, podobne ako pri rodamíne 123. Taktiež aj vonkajšie tangenciálne steny buniek endodermu emitovali intenzívne červenú fluorescenciu. Na periférii centrálného valca bunkové steny pericyklu a k nemu priľahlých buniek z vnútornej strany produkovali slabú fluorescenciu. Agregáty oxidu kremičitého, ako aj zvyšné bunky centrálného valca, emitovali veľmi slabú modrú fluorescenciu.

Veľká časť druhov jednoklíčnolistových rastlín inkorporuje kremík do bunkových stien, čím zvyšuje ich odolnosť voči mechanickému poškodeniu a prenikaniu patogénov. Najväčšie množstvá kremíka sú lokalizované vo vnútorných tangenciálnych stenách endodermu a v bunkových stenách sekundárne hrubnúcich buniek [12], čo je v súlade s pozorovaniami po farbení rodamínom 123 a neutrálnou červenou. Chemická forma a spôsob väzby kremíka v bunkových stenách a kremičitanových agregátoch môžu byť odlišné, a teda ich súčasné farbenie môže vyžadovať buď viaceré, alebo iné metodické postupy. Prítomnosť kremíka v bunkových stenách protoxylému a vo vnútornej tangenciálnej stene endodermu v pozorovanom ontogenetickom štádiu rastlín však treba ešte potvrdiť prvkovou analýzou (napr. EDAX). Lokalizáciu kremíka v bunkových stenách sa pokúsime ešte špecifikovať doplnkovými farbeniami vzoriek.

Rozdielne vplyvy testovaných farbív sme pozorovali aj v reakcii koreňovej sústavy. Najvýraznejší vplyv na morfológiu koreňov mal rodamín 123, ktorý značne inhiboval predlžovací rast primárneho seminálneho koreňa a inhiboval tiež vytvorenie bočných koreňov. Rodamín B mierne inhiboval predlžovanie primárneho seminálneho koreňa, došlo však k redukcii počtu a dĺžky bočných koreňov a zväčšeniu ich priemeru v porovnaní s kontrolným variantom. Vplyvom neutrálnej červene došlo taktiež k inhibícii predlžovacieho rastu primárneho seminálneho koreňa v porovnaní s kontrolou, ale tiež rhodamínom B. Ovplyvnenie počtu a morfológie bočných koreňov sme však nepozorovali. Pri nadzemných častiach rastlín neboli preukazné rozdiely medzi variantmi.

Záver

Cieľom práce bolo zistiť možnosť použitia farbív indikujúcich prítomnosť kremičitanových depozitov v rozsievkach aj pri vyšších rastlinách (konkrétne pri druhu *Sorghum bicolor* L.). Z testovaných farbív sa javí najperspektívnejšia neutrálna červená pre jej relatívne nízku mieru toxicity a najvyššiu špecifickosť farbenia. Vizualizácia depozitov oxidu kremičitého v rastlinách pomocou fluorescenčnej mikroskopie môže zefektívniť pozorovanie

vplyvov abiotických faktorov na ich lokalizáciu a morfológiu. Skúmaním zmien v tvare a umiestnení v rámci buniek, respektíve orgánov môže následne napomôcť identifikácii metabolických procesov pri biomineralizácii kremíka v rastlinách.

Pod'akovanie

Práca bola vypracovaná na Katedre fyziológie rastlín Prírodovedeckej fakulty UK v Bratislave a bola podporená grantmi: 1/0817/12 zo Slovenskej grantovej agentúry VEGA, z Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVV na základe Zmluvy č. APVV-0140-10, ktorým by som chcel touto cestou poďakovať.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Balakhnina T. I., Matichenkov V. V., Wlodarczyk T., et al. (2012) *Plant Growth Regul.* 67(1), p. 35
- [2] Ma J. F. (2004) *Soil Sci. Plant Nutr.* 50(1), p. 11
- [3] Law C., Exley C. (2011) *Plant Biology* 11(1), p. 112
- [4] Ball T. B., Ehlers R., Standing M. D. (2009) *Breeding Sci.* 59(5), p. 505
- [5] Chauhan D. K., Tripathi D. K., Rai N. K., Rai A. K. (2011) *Food Biophys.* 6(3) p. 416
- [6] Gröger C., Lutz K., Brunner E. (2008) *Cell Biochem. Biophys.* 50(1), p. 23
- [7] Lux A., Luxová M., Abe J., et al. (2003) *New Phytol.* 158(1), p. 437
- [8] Kucki M. (2009) *Biological Photonic Crystals: Diatoms Dye functionalization of biological silica nanostructures.* (Dizertačná práca) Department of Natural Sciences, University of Kassel, Kassel, p. 166
- [9] Probes for Lysosomes, Peroxisomes and Yeast Vacuoles [Citované 8. marca 2013]
<<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Probes-for-Organelles/Probes-for-Lysosomes-Peroxisomes-and-Yeast-Vacuoles.html#datatable>>
- [10] Rost F.W.D. (1995) *Fluorescence microscopy (Volume II).* Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, Veľká Británia, p. 28
- [11] Albinsson B., Li S., Lundquist K., et al. (1999) *J. Mol. Struct.* 58(1-3), p. 19
- [12] Sangster A.G., Parry D.W. (1976) *Ann. Bot.* 40(2), p. 373

Pôsobenie nízkych dávok ionizujúceho žiarenia, azoxystrobinu a vybraných ťažkých kovov na modelový organizmus druhu *Artemia franciscana*

Michaela Špalková¹, Marcel Falis², Andrej Renčko¹, Michal Žďárský³, Denisa Daňová¹

¹Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie Košice, Katedra biológie a genetiky, Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovensko;
spalkova@uvm.sk

²Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Katedra farmakológie a toxikológie, Ústav toxikológie, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovensko

³Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Ústav biochemie, chemie a biofyziky, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Česká republika

Abstrakt

The aim of our study was to observe the effect of low doses of ionizing radiation, azoxystrobin, zinc and chrome on the lethality of *Artemia franciscana*. Significant increase of the lethality was observed after 72 and 96 hours of exposure to azoxystrobin and chrome as well as to azoxystrobin, chrome and irradiation. On the other hand, we observed significant decrease of the lethality in the groups exposed to pesticide and chrome or pesticide and zinc in combination with ionizing radiation with the dose of 50 Gy at time interval of 96 hours in comparison to non-irradiated groups.

Kľúčové slová: *Artemia franciscana*; azoxystrobin; ionizujúce žiarenie; letalita; radiačná hormézia

Úvod a formulácia cieľa

Súčasným trendom je znižovanie počtu pokusov na zvieratách na minimum. V zmysle Smernice Rady Európy [1] sa za zviera považujú všetky živé stavovce okrem človeka, vrátane voľne žijúcich, ich rozmnožovania schopné larvy, nie však plody alebo embrya. Preto sme v tejto práci využili alternatívny biotest II. Generácie na *Artemia franciscana* [2].

Zintenzívňovanie poľnohospodárskej výroby má za následok zvýšené využívanie pesticídov, a tým zvýšené zaťaženie ekosystému a značné hospodárske problémy [3]. Jedným z najpoužívanejších pesticídov je azoxystrobin, ktorý má fungicídne účinky [4].

Výrazný priemyselný rozvoj a zanedbávanie environmentálnej politiky na podnikovej, štátnej i medzinárodnej úrovni v minulom storočí spôsobili kontamináciu životného prostredia ťažkými kovmi.

Účinky vyšších dávok gama žiarenia popísali mnohí autori, ako na stavovcoch [5, 6, 7], tak aj na bezstavovcoch *Artemia salina* [8]. Naproti tomu, nízke dávky ionizujúceho žiarenia môžu mať aj pozitívne účinky (tzv. radiačná hormézia).

Naším cieľom bolo v experimente zohľadniť všetky vyššie spomenuté atribúty.

Materiál a metódy

V experimente boli použité *Artemia franciscana* vyliahnuté v morskej vode [9]. 10 ks čerstvo vyliahnutých naupliových štádií sme umiestnili do polystyrénových Petriho misiek o priemere 60 mm pri celkovom objeme morskej vody 10 ml (vrátane vzorky). V pokuse bol použitý roztok azoxystrobinu, síranu zinočnatého a dichromanu draselného v koncentráciách uvedených v tab. 1. Skúmaný roztok bol riedený v morskej vode. Naupliové štádiá boli ožiarené gama lúčmi a absorbovali dávku 20, 30, 40 a 50 Gy (^{60}Co , Chisostat, Chirana) pri dávkovom príkone $11,36 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$. Experiment bol rozdelený do jednej kontrolnej a 10 pokusných skupín (tab. 1).

V každej skupine bolo 50 jedincov, ktorí boli rozdelení do 5 samostatných skupín (misiiek) po 10 jedincoch. V experimente bolo celkovo použitých 550 jedincov. Petriho misky boli po predchádzajúcej dezinfekcii termostatu [10] umiestnené pri teplote $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tab. 1 Pokusné objekty boli rozdelené do 11 skupín nasledovne

Rozdelenie pokusných skupín	Koncentrácia azoxystrobinu ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Koncentrácia $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Koncentrácia $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Dávka ionizujúceho žiarenia (Gy)
K	0	0	0	0
AZn	0,1	100	10	0
AZn20Gy	0,1	100	10	20
AZn30Gy	0,1	100	10	30
AZn40Gy	0,1	100	10	40
AZn50Gy	0,1	100	10	50
ACr	0,1	100	10	0
ACr20Gy	0,1	100	10	20
ACr30Gy	0,1	100	10	30
ACr40Gy	0,1	100	10	40
ACr50Gy	0,1	100	10	50

V časovom intervale 24, 48, 72 a 96 hod. sme vykonali odčítanie živých artémií. Výsledky sme porovnali oproti kontrolnej skupine a štatisticky vyhodnotili. Na vylúčenie odľahlých hodnôt sme použili Deanov-Dixonov test [11]. Rozdiely medzi jednotlivými skupinami sme testovali pomocou signifikantných rozdielov preukázateľnosti [12].

Výsledky a diskusia

Tab. 2 Letalita (%) *Artemia franciscana*

Skupina experimentu	24 hod.			48 hod.			72 hod.			96 hod.		
	x	N	s	\bar{X}	n	s	\bar{X}	N	S	\bar{X}	N	S
K	0	5	0	0	5	0	0	5	0	6	5	4,3
AZn	0	5	0	0	5	0	6	5	8,6	48*	5	12,9

AZn20Gy	10	5	8,6	16*	5	8,6	26*	5	12,9	36*	5	4,3
AZn30Gy	14*	5	12,9	16*	5	12,9	18*	5	8,6	18*	5	8,6
AZn40Gy	32*	5	12,9	34*	5	17,2	34*	5	17,2	40*	5	8,6
AZn50Gy	2	5	4,3	4	5	4,3	4	5	4,3	20*	5	8,6
ACr	14*	5	8,6	22*	5	8,6	84*	5	4,3	100*	5	0
ACr20Gy	32*	5	21,5	40*	5	21,5	66*	5	12,9	98*	5	4,3
ACr30Gy	10	5	8,6	22*	5	4,3	74*	5	4,3	100*	5	0
ACr40Gy	16*	5	8,6	32*	5	8,6	88*	5	8,6	100*	5	0
ACr50Gy	4	5	4,3	24*	5	8,6	68*	5	17,2	100*	5	0

$\alpha = 0,05$

x - priemerná letalita v %

n - počet testovaných skupín

s - smerodajná odchýlka

* - štatistická významnosť preukázaná v porovnaní s kontrolnou skupinou

V kontrolnej skupine sme pozorovali maximálnu letalitu *Artemia franciscana* na úrovni 6%, a to po 96 hodinách. Po 24 hodinách expozície sme pozorovali štatisticky významné zvýšenie letality v skupinách vystavených účinkom azoxystrobinu, zinku a ionizujúceho žiarenia s dávkou 30 (AZn30Gy) a 40 (AZn40Gy) Gy, a ďalej v skupinách vystavených azoxystrobinu a chrómu bez žiarenia (ACr), a tiež v skupinách s azoxystrobinom, chrómom a žiarením s dávkou 20 (ACr20Gy) a 40 (ACr40Gy) Gy v porovnaní s kontrolnou skupinou (K). Po 48 a 72 hodinách expozície sme pozorovali štatisticky významné zvýšenie letality oproti kontrole (K) v skupinách s azoxystrobinom, zinkom a žiarením s dávkou 20 (AZn20Gy), 30 (AZn30Gy) a 40 (AZn40Gy) Gy, tiež v skupine s azoxystrobinom a chrómom (ACr) a v skupinách s azoxystrobinom, chrómom a žiarením so všetkými dávkami (ACr20Gy, ACr30Gy), ACr30Gy, ACr40Gy, ACr50Gy). Po 96 hodinách bola letalita signifikantne zvýšená vo všetkých pokusných skupinách oproti skupine kontrolnej.

Azoxystrobin funguje na princípe inhibície respirácie blokovaním elektrónového transféru medzi cytochrómom a cytochrómom c_1 , a to na oboch stranách oxidačnej plochy. Má široké spektrum účinku proti hlavným druhom patogénnych plesní, hlavne z rodov *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes* a *Oomycetes*. Inhibuje klíčenie spór a rast mycélia [4]. Je to jeden z najpoužívanejších fungicídov v celosvetovom meradle. Podľa Pesticídneho manuálu [4] je tiež azoxystrobin charakterizovaný ako nebezpečný pre ryby, a aj ostatné vodné živočíchy, o čom svedčí aj jeho toxicita v prezentovanom experimente v 72. a 96. hodine. Obdobné výsledky toxického účinku na *Artemia franciscana* zaznamenali aj Falis a kol. [13]. V prvých dvoch časových intervaloch mohla byť letalita nižšia oproti spomínanému experimentu spolupôsobením zinku.

Zinok má značnú afinitu k ligandom obsahujúcim dusík a síru. V biologických systémoch sa nachádza vo väzbe s mnohými organickými látkami, napríklad bielkovinami,

aminokyselinami, nukleovými kyselinami. Zinok ako významný biogénny prvok je súčasťou mnohých metaloenzýmov. Antioxidanty vytvárajú prirodzený ochranný systém organizmu pred vznikom nežiaducich zmien, ktorými sú najčastejšie ataky na nenasýtené mastné kyseliny, niektoré aminokyseliny, zvlášť na tryptofan a methionín, pôsobenie na integritu a následne permeabilitu biomembrán a množstvo štrukturálnych dezintegračných zmien s funkčnými prejavmi. Svoj význam majú ako antioxidantné látky enzýmového pôvodu, tak i enzýmové systémy antioxidantnej ochrany buniek [14].

Chróm je biogénny prvok ktorý ovplyvňuje metabolizmus cukrov a lipidov. Jeho zlúčeniny zrážajú bielkoviny a majú leptavý účinok [15].

Pri porovnaní letality v skupinách vystavených pôsobeniu pesticídu, zinku a žiareniu môžeme v 72. a 96. hodine pozorovať v skupinách vystavených ionizujúcejmu žiareniu prejavy radiačnej hormézie, resp. došlo k spochybneniu lineárnej bezprahovej teórie biologických účinkov ionizujúceho žiarenia pri dávke 30 (AZn30Gy) a 50 (AZn50Gy) Gy, kedy sme zaznamenali štatisticky významné zníženie letality oproti skupinám s dávkami 20 a 40 Gy. V 96. hodine sme zaznamenali dokonca i štatisticky významné zníženie letality v spomínaných skupinách oproti skupine bez ionizujúceho žiarenia (AZn). Tieto výsledky mohli byť dosiahnuté tým, že pri 20, 30 a 40 Gy dochádzalo k sumácii negatívnych účinkov faktorov, ktorým boli pokusné organizmy vystavené. Naproti tomu v prípade žiarenia na úrovni 50 Gy sa prejavil účinok radiačnej hormézie, ako uvádzajú mnohí autori v epidemiologických štúdiách, ktoré podporujú predstavu, že nízke dávky prospievajú zdraviu [16, 17, 18]. Obdobné výsledky sme zaznamenali v skupinách vystavených spolupôsobeniu pesticídu, chrómu a ionizujúceho žiarenia. V tomto prípade sme pozorovali významné zníženie letality v 72. a 96. hodine u skupiny s dávkou 50 Gy (ACr50Gy) oproti skupine bez žiarenia (ACr). Porovnateľné výsledky potvrdzujúce radiačnú horméziu boli zaznamenané v štúdiu Beňovej a kol. [19] na úrovni dávky 10 Gy, kde sa však zisťovali účinky interakcií ťažkých kovov (Cd, Cr) a žiarenia. Veľkosť dávok v desiatkach Gy je nutné dať do súvislosti s fylogenetickým zaradením bezstavovcov, kôrovcov rodu *Artemia*. Najčastejšie je ako podstata hormézie uvádzaná aktivácia a stimulácia adaptívnych a reparačných dejov a imunitných mechanizmov nízkymi dávkami ionizujúceho žiarenia, čo potom vedie ku zvýšenej obranyschopnosti organizmu [20].

Záver

Záverom možno uviesť, že nami dosiahnuté výsledky podporujú teóriu radiačnej hormézie.

Pod'akovanie

Prezentovaná práca vznikla za podpory Národného referenčného laboratória pre pesticídy UVLF-KE a projektu Ministerstva školstva, mládeže a telovýchovy ČR IGA VFU Brno 92/2011/FVHE, (IG212112).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Smernica Rady Európy (86/609/EWG) z 24. novembra 1986 ku priblíženiu právnych a správnych predpisov členských štátov pre ochranu zvierat používaných na pokusy a iné vedecké účely
- [2] Dvořák P., Beňová K. (2002) Folia Veterinaria, 46(4), p. 195
- [3] Hostovský M., Bláhová J., Kopřiva V., et al. (2012) Interdisciplinary Toxicology 5(1), p. 35
- [4] The e-Pesticide manual (2000 – 2001) Twelfth edition. Version 2,0
- [5] Beňová K., Toropila M., Falis M., et al. (2003) Acta Vet. Brno 72, p. 201
- [6] Falis M., Beňová K., Toropila M., et al.. (2004) Bull. Vet. Inst. Pulawy 48, p. 503
- [7] Beňová K., Cigánková V., Falis M., et al. (2006) Acta Vet. Brno, 75, p. 557
- [8] Dvořák P., Beňová K. (2002). Folia Veterinaria, 46(4), p. 195
- [9] Dvořák P., Šucman E., Beňová K. (2005) Biologia 60(5), p. 593
- [10] Kočišová A. (2005) Dezinfekce, Dezinsekce, Deratizace 14(4), p. 149
- [11] Dvořák P. (1995) Modifikovaný test s *A. salina* pro sledování vlivu interakcí cizorodých látek. Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí (sborník). Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický a Aqachemie, Milenovice 1995, p. 25
- [12] Wayland J., Hayes Jr. (1991) Dosage and Other Factors Influencing Toxicity. In Handbook of Pesticide Toxicology. Volum 1. General Principles. Academic Press, p. 39
- [13] Falis M., Špalek M., Legáth J., et al. (2010) Hodnotenie vzájomného pôsobenia vybraných pesticídov a ťažkých kovov na letalitu *Artemia franciscana*, X. Risk factors of food chain. SPU, Nitra, p. 68
- [14] Kopřiva V., Smutná M., Malota L. (2007) Antioxidanty a biochemické aspekty – pilotní

- studie. In Sborník konference a hygieně a technologii potravin XXXVII. Lenfeldlovy a Höklovy dny, VFU Brno, 17. 10. 2007, p. 100
- [15] Bencko V. (1995) Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka. Grada Praha, p. 282
- [16] Cohen B. L. (1995) Health Phys. 68, p. 157
- [17] Luckey T. D. (1997) Ionizing radiation decreases human cancer mortality rates. Proceedings of International Conference on Low Doses of Ionizing Radiation, Seville, Spain, 17-21 November 1997, p. 227
- [18] Pollycove M. (1997) Nuclear News 40(7), p. 34
- [19] Beňová K., Dvořák P., Falis M., et al. (2007) Acta Vet. Brno 76, p. 35
- [20] Luckey T. D. (1991) Radiation Hormesis. CRC Press, Boca Raton, p. 306

P-glycoprotein expression patterns in L1210 cells after all-*trans* retinoic acid and 9-*cis* retinoic acid treatment suggest involvement of post-transcriptional regulation

Ján Štetka, Viera Boháčová, Zdena Sulová, Albert Breier

Slovak Academy of Sciences, Institute of Molecular Physiology and Genetics, Vlarska 5, 833 34 Bratislava, Slovak Republic; stetka.j@gmail.com

Abstract

The ability of neoplastic cells to resist wide variety of chemotherapeutics, a phenotype known as multidrug resistance (MDR), is a major cause of chemotherapeutic treatment failure. P-glycoprotein (P-gp) mediated efflux of drugs plays a vital role in the mechanism of MDR. We have decided to investigate effects of all-*trans* retinoic acid (ATRA) and 9-*cis* retinoic acid (9-*cis*RA) on P-gp expression with possible implications for understanding of associated regulatory networks. Examination of P-gp expression in resistant cell line (R) and cell line expressing human version of P-gp (T) revealed significant overexpression after treatment with ATRA alone, but haven't showed substantial change after 9-*cis*RA treatment in R and T cells. The presence of changes in P-gp expression levels in T cells were particularly surprising, considering the fact that P-gp is transcribed under viral promoter. Together these results indicate interconnection between ATRA induced retinoic acid signalling pathway and P-gp regulatory network and suggest involvement of post-transcriptional regulation.

Key words: *P-glycoprotein; MDR; All-trans retinoic acid; 9-cis retinoic acid*

Introduction

Dietary vitamin A is metabolised to its biologically active form of retinoic acids, which exert diverse range of functions that are essential for the development, growth, fertility, immunity and vision. Both, all-*trans* retinoic acid (ATRA) and 9-*cis* retinoic acid (9-*cis*RA) mediate their functions through retinoic receptors, which are related to super-family of nuclear receptors in terms of their structural organisation. They are ligand-dependent transcription factors that bind to retinoic acid response elements (RAREs) in the promoter sequence of their primary regulatory network [1].

Receptors for retinoic acids involve retinoic acid receptors (RAR α , RAR β , RAR γ), that are activated by ATRA and 9-*cis*RA and retinoid X receptors (RXR α , RXR β , RXR γ) activated predominantly by 9-*cis*RA. Upon binding of their agonists RARs interacts with RXRs and create heterodimers that acts on RAREs. RXRs are more promiscuous partners that can form heterodimeric complexes with wide range of other nuclear receptors, including receptors involved in xenobiotic metabolism like pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), vitamin D receptor (VDR) and thyroid hormone receptor (TR) [2].

Each of these receptors are involved in regulation of P-glycoprotein (P-gp), a membrane-associated protein, which utilizes energy from the ATP hydrolysis to transport wide range of substrates across membrane. By creating efflux of drugs before they reach nucleus, P-gp eliminates their cytotoxic effects and maintains intrinsic resistance to toxic substances. At the same time, overexpression of P-glycoprotein in targeted tissues leads to failure of AIDS and cancer chemotherapy and significantly contributes to multidrug resistance phenotype (MDR) [3].

As mentioned before, nuclear receptors that play important role in the regulation of P-gp expression form a communication bridge that connects retinoic acid signalling pathway with P-gp regulatory elements. There may be different connections and functional gateways that connect these pathways at different levels. Therefore we have decided to further investigate P-gp expression patterns after treatment with retinoic acids at different expression levels to learn more about major information flows between these two pathways.

Materials and methods

Cell lines and cultivation conditions

We have used mouse lymphocytic leukaemia cell line L1210. Parental sensitive (S) cell line [4] was used together with two vincristine (VCR) resistant cell lines, one obtained after gradual adaptation to VCR (R) [5] and second transfected with with Addgene plasmid pHaMDRwt, expressing human version of P-gp under LTR viral promoter and plasmid pSV2neo (T) [6].

All cell lines were cultivated in 1640 RPMI medium supplemented with L-glutamine (PAA Laboratories GmbH), 4 % fetal bovine serum (Gibco, Life Technologies) and 20 µg/ml of gentamicin (Life Technologies) at 37 °C in 5% CO₂ humidified atmosphere. VCR (1 µg/ml, Gedeon Richter Co.) was added to both resistant cell lines and T cells were additionally supplemented by 2,8 mg/ml of selection agent G418 (Geneticin, Life Technologies).

Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Total RNA from two-day old culture (5×10^6 cells) was obtained by TRI REAGENT (Molecular Research Center, Inc.) according to manufactures instructions. QuantiTect® Reverse Transcription kit (QIAGEN) was used for synthesis of cDNA. Reaction for PCR was set-up with QuantiFast SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) with 2-step reaction according to protocol with primers outlined in tab. 1 on ABI PRISM® 7900HT Fast (Applied Biosystems).

Tab. 1 Primers used for detection of mRNA levels

Genes	Sequence	T _A (°C)	Product size (bp)
<i>Mus musculus</i> Abcb1b	R: 5'-GGCTGTTAAAGGTA ACTCC-3'	57	152
	L: 5'-TGTTCTCTTATGAATCACGTA-3'		
<i>Homo sapiens</i> Abcb1b	R: 5'-AGACATGACCAGGTATGC-3'	57	151
	L: 5'-CTCCTGTCGCATTATAGC-3'		
<i>Mus musculus</i> Gapdh	R: 5'-AACTTTGTCAAGCTCATTTCTG-3'	57	291
	L: 5'-GCAGCGAACTTTATGATGGTATT-3'		

Western blot

Membrane crude fraction was isolated as described by Hamada and Tsuruo [6]. SDS-PAGE was conducted in Amersham ECL Gel Box on 4-12% and 8-16% gradient ECL Gels (GE Healthcare Life Sciences). Samples (15 µg per lane) in 10 µl of deionized water and supplemented with 10 µl of sample buffer were incubated 10 min at 95 °C before loading. Voltage of 135 V and 40 mA current (PowerPac™ HC, Bio-Rad, USA) was applied across the gel in 1x running buffer for approximately 1.5 hour. Proteins were transferred on Amersham Hybond ECL nitrocellulose membrane with voltage 10 V for 30 minutes with subsequent detection by P-gp, mAb (C219) primary monoclonal antibody (1 mg/ml, Enzo Life Sciences) and goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). The ECL detection system was used for band visualization on Image Station 4000R (KODAK).

Immunofluorescence confocal microscopy

Cells were fixed on Poly-L-Lysine Slides (Thermo Fisher Scientific, Inc.) and incubated with P-gp, mAb (C219) primary monoclonal antibody (1 mg/ml, Enzo Life Sciences) and with Goat anti-mouse IgG-FITC: sc-2010 (400 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Final incubation was performed with DAPI, Dihydrochloride (10mg/ml, Merck Millipore, USA). Fluorescent signals were detected by LSM 510 META (Carl Zeiss, Germany) with an argon/2 laser and blue diode turned on. Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27 oil objective was used for image acquiring.

Results and discussion

Effect of ATRA, 9cisRA and verapamil on P-gp mRNA levels

Levels of P-gp mRNA in S, R and T cells were measured by quantitative real time

polymerase chain reaction. Cells were cultivated as described in previous section for 24 hours and then verapamil (10 $\mu\text{mol/l}$), ATRA (3.3 $\mu\text{mol/l}$), 9-cisRA (3.3 $\mu\text{mol/l}$), ATRA together with verapamil or 9-cisRA together with verapamil were added directly to the cultivation medium and incubated for additional 24 hours.

As can be seen in fig. 1, reduced expression of P-gp was detected after treatment of R cells with ATRA and verapamil together, compared to untreated control. Slightly elevated expression levels were observed in case of ATRA alone, but also in case of 9cisRA alone and together with verapamil, which was not seen at protein level (Fig. 2 and 3) and can be explained by mean deviation. T cells showed more pronounced changes in expression patterns of P-gp mRNA with 1.5 fold up-regulation after treatment with ATRA alone and the same level of down-regulation with verapamil alone. We have not detected significant expression levels of P-gp in S cells.

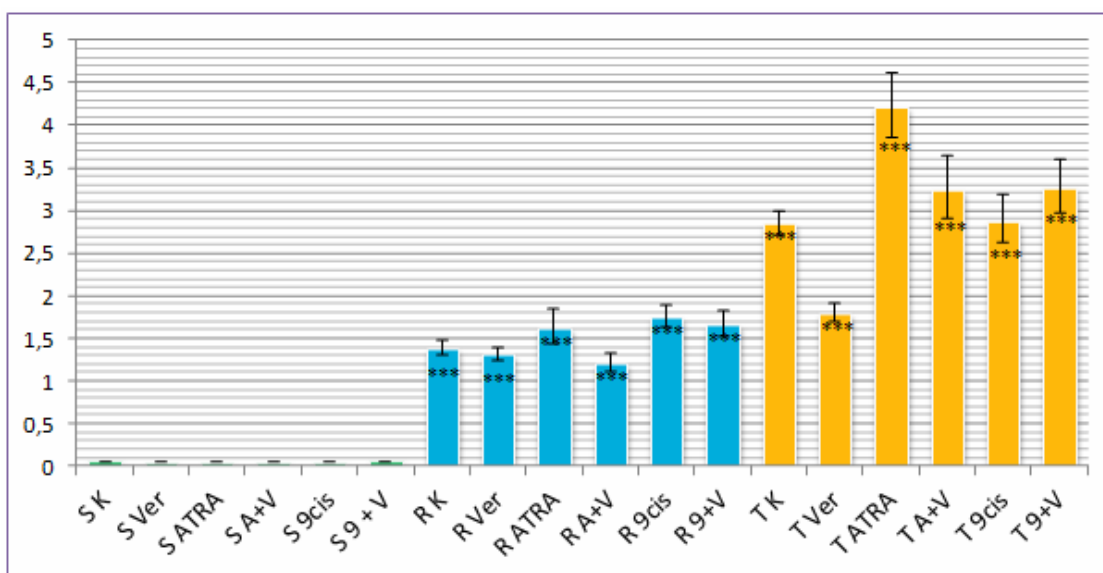


Fig. Levels of P-glycoprotein mRNA expression

These results indicate involvement of ATRA mediated regulation of P-gp expression at RNA level with more pronounced effect in T cells. The fact that such significant regulation takes place in T cells hints on involvement of post-transcriptional regulator, considering the fact that P-gp is transcribed under viral promoter in long terminal repeats of plasmid pHaMDRwt.

Effect of ATRA, 9cisRA and verapamil on P-gp protein levels in membrane crude fraction

Cells were incubated as for quantitative real time polymerase chain reaction. After an

incubation period, crude membrane fractions were isolated and used for immunodetection by western blot (Fig. 3) and confocal microscopy (Fig.no 4).

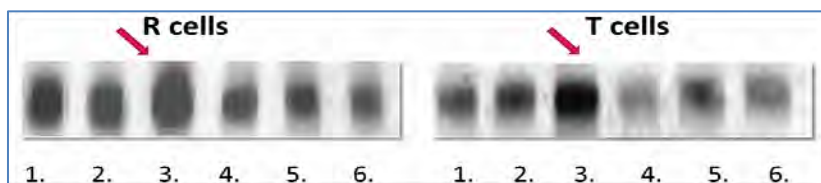


Fig. 2 Levels of P-gp expression in crude membrane fraction detected by western blotting using anti-P-gp antibody c219. Figure shows R and T cells without any treatment (1), with verapamil (2) and ATRA alone (3), combined treatment of ATRA + verapamil (4), 9cisRA (5) and 9cisRA in combination with verapamil (6)

As published in our previous study, combined treatment of R cells by verapamil and ATRA induced down-regulation of Pgp expression [7]. In addition, further examination revealed elevated levels of P-gp expression after treatment by ATRA alone in R and T cells. Relatively similar levels of P-gp expression were observed in R and T cells with 9-cisRA and in combination with verapamil as compared to control.

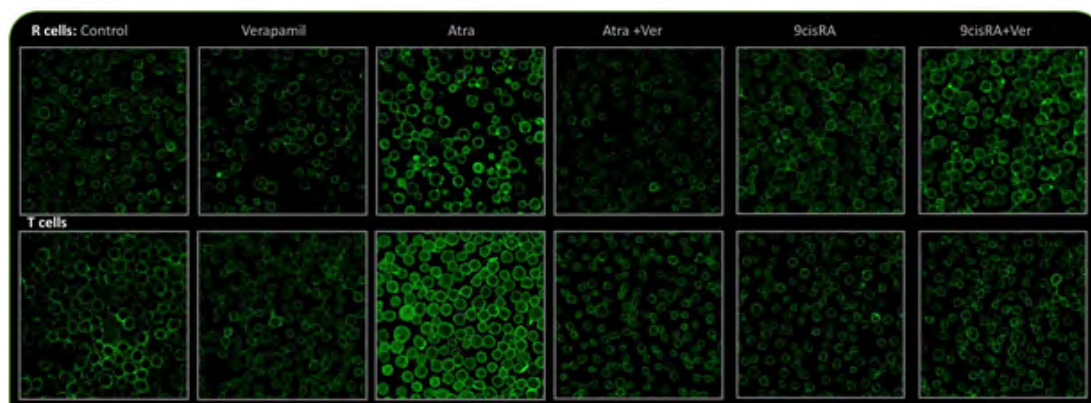


Fig. 3: Immunofluorescence confocal microscopy

The most important finding on protein level is that ATRA alone cause substantial P-gp overexpression in R and T cells as documented by results from western blot and immunofluorescence confocal microscopy.

Conclusion

Detailed examination of P-gp expression levels at RNA and protein level after treatment with retinoic acids uncovered distinct, recurrent patterns, which may be considered

as a result of P-gp regulation. Most significant change in expression occurred after treatment with ATRA alone in R and T cells. Elevated expression levels were tracked down from protein level to RNA level and revealed overexpression of ATRA at RNA level in R, but also in T cells. T cells express human version of P-gp from pHaMDRwt plasmid under viral LTR promoter derived from Harvey sarcoma virus. Taken together, these results suggest involvement of post-transcriptional regulation in the presence of ATRA. It is clear that P-gp is subjected to extensive post-transcriptional regulation by microRNA's, according to miRWalk database [8], more than 30 validated microRNA's and at least 20 predicted act in its regulation. Finding a connection between these microRNA's and retinoic acid signalling pathway could bring new interconnections with P-gp regulatory pathway.

Acknowledgement

This work was supported by Slovak Research and Development Agency (APVV-0290-10, APVV-0160-11) Scientific Grant Agency of Ministry of Education SR and Slovak Academy of Sciences (VEGA 2/0123/10, 2/0100/12).

References

- [1] Tang X., Gudas L. J. (2010) *Annual Review of Pathology*. 6, p. 345
- [2] Mongan N. P, Gudas L. J. (2007) *Differentiation*. 75(9), p. 853
- [3] Grandjean-Forestier F., Stenger C., Robert J., et al. (2009) The P-Glycoprotein 170: Just a Multidrug Resistance Protein or a Protean Molecule? In: A. Boumendjel, J. Boutonnat, J. Robert (eds.) *ABC Transporters and Multidrug Resistance*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, p.17
- [4] Moore G. E., Sandberg A. A., Ulrich, K. (1966) *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 36(3), p. 405
- [5] Poleková L., Barancík M., Mrázová T., et al. (1992) *Neoplasma*. 39(2), p. 73
- [6] Sulová Z., Ditte P., Kurucová T., et al. (2010) *Anticancer Research*. 30(9), p. 3661
- [7] Sulová Z., Macejová D., Seres M., et al. *Toxicol. In Vitro*. 22(1), p. 96
- [8] Dweep H., Sticht C., Pandey P., et al. (2011) *Journal of Biomedical Informatics*. 44(5), p. 839

Vplyv nízko-teplotnej plazmy na vybrané biologické parametre hrachu siateho (*Pisum sativum* L.)

Tibor Stolarik¹, Mária Henselová¹, Miroslava Bugajová², Anna Zahoranová³

¹Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyziológie rastlín, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; tibor.stolarik@gmail.com

²Slovenská technická univerzita, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Radlinského 39, 812 37 Bratislava, Slovenská republika

³Univerzita Komenského, Fakulta matematiky, fyziky a informatiky, Katedra experimentálnej fyziky, Mlynská dolina F-2, 842 48 Bratislava, Slovenská republika

Abstrakt

The objective of this study was to determine the effect of a low-temperature plasma (LTP) on pea (*Pisum sativum* L., var. Prophet) seed surface modifications observed by scanning electron microscopy (SEM). There was also analyzed the antifungal activity of LTP on *Fusarium culmorum* colonizing the surfaces of pea seeds. The pea seeds for SEM studies were exposed to LTP for 120 and 600 seconds and for microbiological studies in duration time from 60 to 240 seconds. We used Diffuse Coplanar Surface Barrier Discharge (DCSBD) as the source of the LTP. Our results indicate that LTP treatment causes the significant and visible modifications on surface of pea seeds and this effect depends on the duration of LTP treatment. We also reached the similar results on elimination of the *Fusarium culmorum* surface population.

Kľúčové slová: Hrach siaty; nízko-teplotná plazma; skenovací elektrónová mikroskopia.

Úvod a formulácia cieľa

Elektrická nízko-teplotná plazma (NTP) je dostatočne ionizovaný plyn, ktorý sa generuje elektrickými výbojmi v plyne [1]. V posledných rokoch sa výskumu plazmy venuje značná pozornosť v rôznych technologických oblastiach [2]. Jednou z možných perspektívnych oblastí uplatnenia NTP sa ukazuje aj jej využitie na predsejbovú úpravu rastlinných semien za účelom vylepšenia ich klíčivosti a následného ovplyvnenia rastu a vývinu rastlín [3], ako aj zvýšenia úrody [4, 5]. Okrem toho sa uvádzajú aj významné sterilizačné účinky plazmy [6], najmä z hľadiska eliminácie, resp. redukcie mikroflóry, ktorá produkuje mykotoxíny [7, 8] a kolonizuje na povrchu semien významných úžitkových plodín.

Pri generovaní plazmy sa účinkom silného elektrického poľa ionizujú molekuly plynu, a tak vznikajú elektróny, kladné ióny a ďalšie excitované molekuly a chemicky aktívne častice [1], ktoré podľa [9] vytvárajú vysoko reaktívne prostredie, čo môže viesť k modifikácii povrchov semien a ich prípadnému rozrušovaniu. V dôsledku tohto javu môžu prenikať aktívne častice z prostredia NTP do semena a zapájať sa do biochemických reakcií, ktoré v ňom prebiehajú najmä v procese klíčenia [10].

Cieľom našej práce bolo zmapovať potenciálne účinky vplyvu NTP na modifikáciu

povrchu semien hrachu, ako aj jej sterilizačný účinok na povrchovú epifytnú a fytopatogénnu mikroflóru týchto semien, zastúpenú vláknitou hubou *Fusarium culmorum*, ktorá patrí medzi významné druhy mikromycét prenášaných osivom [11].

Materiál a metódy

V pokusoch sme použili semená hrachu siateho (*Pisum sativum* L.), odroda Prophet. Ako zdroj NTP pre ošetrenie semien sme použili výbojku s využitím difúzneho koplanárneho povrchového bariérového výboja (DCSBD) s vysokou plošnou a objemovou hustotou energie ($100 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-3}$) s rôznymi expozičnými časmi. Semená sa ošetrovali na Katedre experimentálnej fyziky FMFI UK v Bratislave.

Skenovacia elektrónová mikroskopia (SEM):

Semená hrachu sme ošetrili NTP po dobu 120 a 600 sekúnd. 24 h po ošetrení sme ošetrené i neošetrené (kontrolné) semená prerezali na dve polovice a polovicu s embryom sme zafixovali pomocou obojstrannej elektricky vodivej lepiacej pásky na hliníkový statív. Semená sme následne vysušili vo vákuovej sušiarňi (JEOL EM-DSC 10) a povrstvili uhlíkom vo vákuovej naparovačke. Pozorovali sme ich na skenovacom elektrónovom mikroskope (JEOL JXA-840 A) pri urýchľovacom napätí 15 kV pri 2000-násobnom zväčšení (u všetkých vzoriek semien sme pozorovali vždy oblasť osemenia nad apexom a v blízkosti napojenia funikulu). Pre sledovanie špecifických štruktúr povrchu semien sme zvolili 70 a 1000-násobné zväčšenia.

Mikrobiologické štúdie:

Pre stanovenie účinku NTP na fungálnu mikroflóru semien hrachu sme tieto usmrtili a sterilizovali v autokláve (20 min., 120 °C, 120 kPa). Umŕtvené semená (125 g) sme infikovali suspenziou spór *Fusarium culmorum* (7 ml; $c=5,7\cdot 10^5 \text{ spór}\cdot\text{ml}^{-1}$) a následne intenzívne pretrepávali na rotačnej trepačke pri laboratórnej teplote v sterilnej Erlenmayerovej banke 10 minút. Po následnom vysušení sme ich ošetrili NTP v expozičných časoch 60, 120, 180 a 240 sekúnd. Časť semien sme použili na stanovenie inhibície rastu konídií huby v Petriho miskách (PM - priemer 185 mm) na pevnom sladínovom agare (SLA – zloženie: sladínový extrakt: 60g, agar: 20g, dH₂O 1000 ml; sterilizované v autokláve; 20 min., 120 °C, 120 kPa), na ktorý sme semená rovnomerne vysiali (42 ks/PM). Rovnako sme vysiali aj kontrolné, NTP neošetrené semená. Po 3- a 4-dňovej inkubácii pri laboratórnej teplote sme jednotlivé vzorky semien zaradili do tried 0 - 5, podľa intenzity napadnutia plochy jednotlivých semien, pričom trieda 0 = 0 % napadnutej plochy semena, 1 = 5 %, 2 = 10 %, 3

= 20 %, 4 = 30 %, 5 ≥ 60 % napadnutej plochy semena. Zo získaných hodnôt sme následne vypočítali index napadnutia semien podľa Townsend – Heubergera vzorca (P) [12];

$$P = \frac{\sum(n \cdot v)}{5N} \cdot 100 (\%) \quad [I.]$$

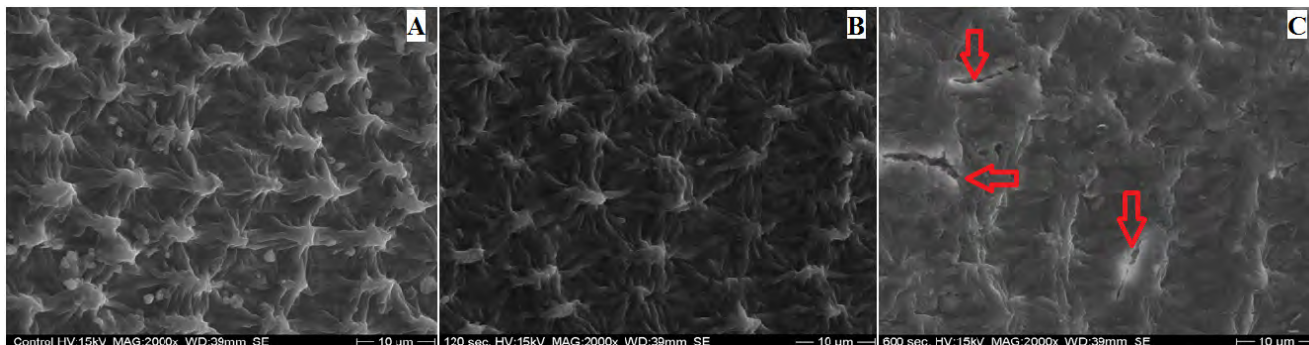
kde **P** - index napadnutia, **n** - počet zŕn v príslušnej triede, **v** - trieda napadnutia, **N** - celkový počet zŕn, **5** - najvyššia možná trieda napadnutia (*metóda I.*).

Zvyšnú časť semien sme použili pre platňovú zriedovaciu metódu stanovenia počtu kolóniotvorných jednotiek (KTJ) [13]. Ku nainfikovaným semenám hrachu ošetrených NTP, ako aj kontrolným, sme asepticky pridali sterilnú dH₂O (na 1 g semien 9 ml dH₂O), čo predstavuje riedenie 10⁻¹ a trepali na rotačnej trepačke 30 min. Zo získanej suspenzie spór sme pripravili následné desiatkové riedenia 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵. Z každého riedenia sme odobrali 0,2 ml inokula, ktoré sme preniesli a rozotreli na povrch SLA média v PM priemeru 9 cm. Po 3-dňovej inkubácii pri laboratórnej teplote sme vyhodnotili vyrastené KTJ a prepočítali sme ich na 1 g semena hrachu. Redukciu *Fusarium culmorum* na povrchu umelo infikovaného semena sme vyhodnotili v porovnaní s kontrolným neošetreným osivom (*metóda II.*). Výsledky sme spracovali a vyhodnotili pomocou ANOVA LSD testu v štatistickom programe Statgraphics Plus 5.1 a Microsoft Excel.

Výsledky a diskusia

Naše výsledky poukazujú na zmeny v povrchovej štruktúre semien hrachu po aplikácií NTP. Okrem toho sme pozorovali tiež heteromorfiu osemenia hrachu v závislosti od pozorovanej oblasti na povrchu semena. V oblasti napojenia funikulu na semeno (Obr. 1) v porovnaní s oblasťou osemenia nad apexom radikuly (Obr. 2) sme pozorovali značné odlišnosti v morfológii povrchu. Avšak v oboch prípadoch bol povrch semien ošetrených NTP značne rozrušený, prípadne až vyhladený, so stratou pôvodných štruktúr. Čiastočne sme takéto prejavy sledovali už pri 120 s expozícii NTP v porovnaní s kontrolou, avšak najmarkantnejšie zmeny sme zaznamenali pri dávke 600 s v oboch pozorovaných oblastiach povrchu semena (Obr. 1 C; Obr. 2 C), kde sú zreteľné aj trhliny v osemení, rovnako ako na (Obr. 3 B) - označené šípkami. Naše zistenia korešpondujú s výsledkami autorov [10], ktorí podobné účinky plazmy pozorovali na semenách pšenice, pričom uvádzajú, že zmeny štruktúry osemenia môžu byť zároveň vstupnou bránou chemicky reaktívnych častíc produkovaných plazmou. V našich pokusoch sme ďalej zistili, že NTP účinne zasahuje iba do istej vzdialenosti od výbojky, pričom modifikuje najmä tie časti semena, ktoré vyčnievajú do priestoru [v SEM sa javia ako tmavšie (Obr. 3 A), označené zelenou šípkou], pričom oblasti

v preliačinách sú menej morfológicky pozmenené vplyvom NTP, [javia sa ako svetlejšie (Obr. 3 A) označené červenou šípkou]. Na (Obr. 3 B) sme pozorovali prechod medzi menej porušenou oblasťou v priehlbine osemenia a oblasťou zasiahnutou vplyvom NTP.

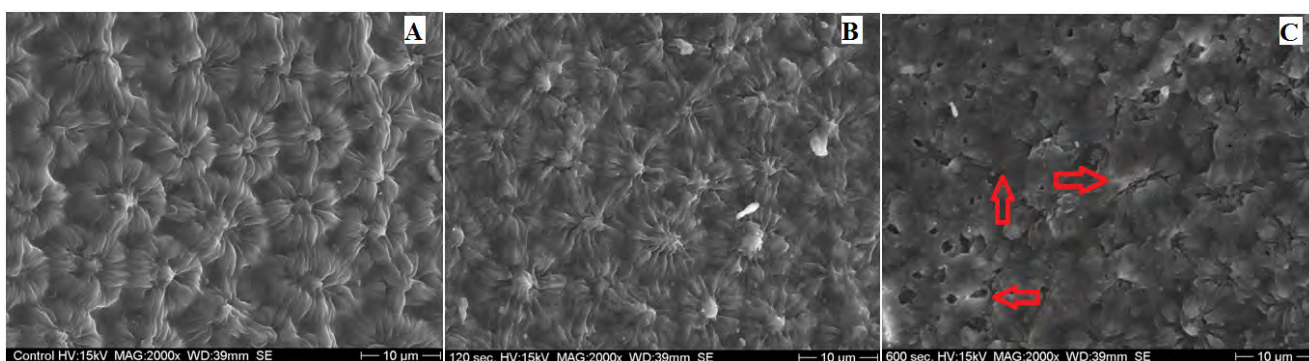


Obr. 1: Snímky povrchu semena hrachu v oblasti napojenia funikulu (snímané na SEM, zv. 2000x)

A – semeno kontrolné, bez ošetrenia NTP

B – semeno ošetrené NTP v dávke 120 s

C – semeno ošetrené NTP v dávke 600 s (šípky označujú trhliny v osemeni)

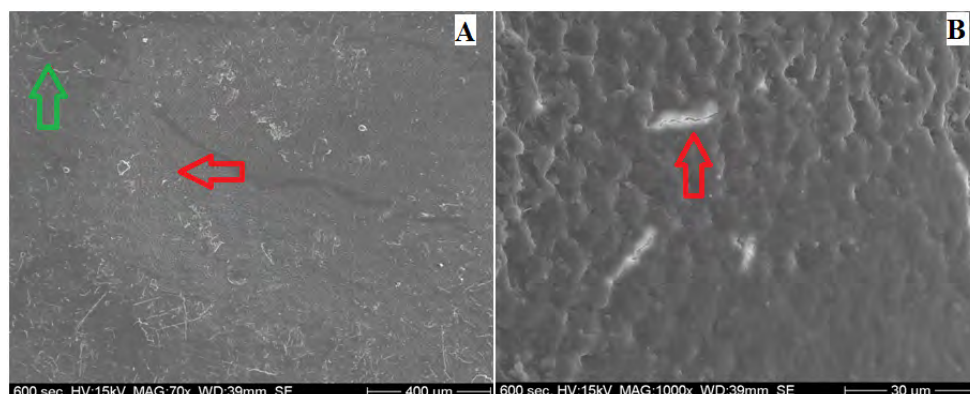


Obr. 2: Snímky povrchu semena hrachu v oblasti nad apexom radikuly (snímané na SEM, zv. 2000x)

A – semeno kontrolné, bez ošetrenia NTP

B – semeno ošetrené NTP v dávke 120 s

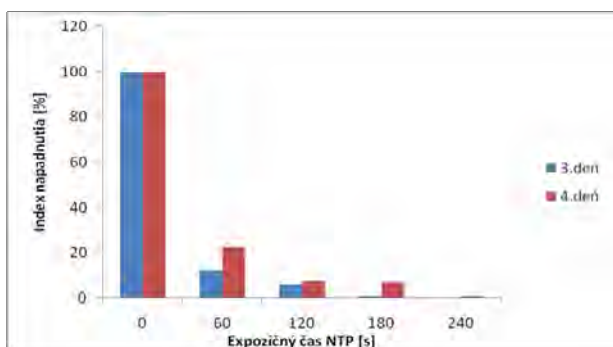
C – semeno ošetrené NTP v dávke 600 s (šípky označujú trhliny v osemeni a silne modifikovaný povrch)



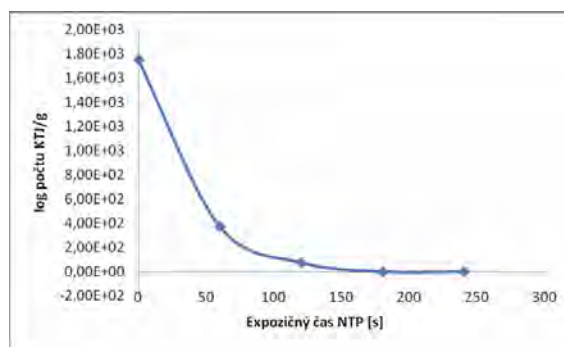
Obr. 3: Snímky povrchu zvráskaveného semena hrachu: A – červená šípka označuje preliačinu menej zasiahnutú vplyvom NTP; zelená šípka smeruje do vyvýšenej oblasti semena, ktorá bola modifikovaná vplyvom NTP; B – prechod medzi preliačenou časťou semena (vľavo) a vyvýšenou časťou (vpravo). Šípka označuje trhlinu v osemeni

Zistená modifikácia povrchov semien pod vplyvom NTP má preukazný vplyv jednak na stratu hmotnosti semien, ako aj na zvýšený príjem vody semenami (dynamiku imbibície), čo potvrdzujú aj naše ďalšie doterajšie výsledky výskumu NTP.

Mikrobiologickými experimentmi s využitím metódy I. sme preukázali, že plazma významne znižuje index napadnutia semien hubou *Fusarium culmorum*, pričom na 3. deň od výsevu sa už pri 60 s expozícii NTP znížil o 87,7 % a pri dávke 240 s poklesol na 0 % (Graf 1). Pri použití metódy II. sme zaznamenali redukciu východiskového počtu kolóniotvorných jednotiek (KTJ) *Fusarium culmorum* na povrchu umelo infikovaného semena hrachu o 1 log poriadok už pri 60 s expozícii NTP, čo predstavuje cca 90 % redukciu východiskového počtu spór (Graf 2). Podobné účinky NTP dosiahli aj [14, 15] na epifytnej a fytopatogénnej mikroflóre pšenice a kukurice.



Graf 1: Vplyv NTP na index napadnutia mikromycétou *Fusarium culmorum* na 3. a 4. deň od výsevu semien na sladínovo-agarové médium



Graf 2: Vplyv NTP na redukciu počtu KTJ *Fusarium culmorum*

Záver

Na základe dosiahnutých výsledkov môžeme konštatovať, že nízkoteplotná plazma spôsobuje preukazné modifikácie povrchov semien hrachu siateho, ktoré môžu mať vplyv na ďalší ontogenetický vývin tejto plodiny. Okrem toho sa potvrdilo, že NTP významným spôsobom redukuje fytopatogénnu mikroflóru kolonizujúcu na povrchu semien hrachu, vrátane druhu *Fusarium culmorum*.

PodĎakovanie

Uvedená práca bola finančne podporená grantovými projektmi VEGA č. 1/0755/10 a TA č. 02010412. Zároveň naša vďaka patrí aj Mgr. M. Martinkovi, PhD. a Ing. M. Čaplovičovej, CSc. za pomoc pri spracovaní vzoriek pre SEM.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Martišovits V. (2004) Základy fyziky plazmy. Vydavateľstvo UK, Bratislava, SR, p. 216
- [2] Černák M., Černáková L., Hudec I., et al. (2009) Eur. Phys. J. Appl. Phys. 47, p. 22 806 (p1-p6)
- [3] Šerá B., Straňák V., Šerý M., et al. (2008) Plasma Sci. Technol. 10, p. 506
- [4] Yin M., Huang M., Ma B., et al. (2005) Plasma Sci. Technol. 7, p. 3143
- [5] Stolárik T., Henselová M., Slováková L., et al. (2013) Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2013, Proceedings, Praha, ČR, p. 226
- [6] Moisan M., Barbeau J., Moreau S., et al. (2001) Int. J. Pharm. 226, p. 1
- [7] Dangl J.L., Jones J. D. G. (2001) Nature. 132, p. 826
- [8] Rajčáková L. (2006) Naše Pole. 10, p. 21
- [9] Laroussi M. (2005) Plasma Process. Polym. 2, p. 391
- [10] Šerá B., Špatenka P., Šerý M., et al. (2010) IEEE Trans. Plasma Sci. 38, p. 2963
- [11] Fasatiová O. (1979) Plísňe a vláknité houby v technické mikrobiologii. SNTL, Praha, ČR, p. 209
- [12] Rekanovic E., Milijasevic S., Todorovic B., et al. (2007) Phytoparasitica 35, p. 436
- [13] Houghtby G.A., Maturin L.J., Koenig E.K. (1992) Standard methods for the examination of dairy products. Port City Press, Baltimore - Washington, USA, p. 10
- [14] Hudedová D., Zahoranová A., Kaliňáková B., et al. (2012) Priemyselná toxikológia 2012, Zborník prednášok, Svit, SR, p. 176
- [15] Zahoranová A., Kováčik D., Henselová M., et al. (2013) 19th Symposium on Application of Plasma Processes. Book of Contributed Papers, Vrátna, SR, p. 209

Analýza kandidátneho génu *SCN1A* u slovenských pacientov s Dravetovým syndrómom

Milan Surový¹, Martina Pečimonová¹, Andrea Šoltýsová^{1,2}, Andrej Ficek¹, Denisa Ilenčíková³, Miriam Kolníková⁴, Pavol Sýkora⁴, Ľudevít Kádaši^{1,2}

¹Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská Republika; surovy@fns.uniba.sk

²Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, Vlárská 5, 833 34 Bratislava, Slovenská Republika

³2. detská klinika LF UK a DFNSP, Limbová 1, 833 40 Bratislava, Slovenská Republika,

⁴Klinika detskej neurológie LF UK a DFNSP, Limbová 1, 833 40 Bratislava, Slovenská Republika

Abstrakt

Dravet syndrome (DS), described in 1978, is a rare form of epilepsy which manifests in the first year of life by febrile or afebrile clonic and tonic-clonic, generalized, and unilateral seizures, often prolonged, in an apparently normal infant. *SCN1A*, encoding the sodium channel alpha 1 subunit, has been considered as the most important of the epilepsy genes currently known. Increasing severity of mutations leads to progressively more severe epilepsy syndromes. To identify the disorder-causing gene variants, the most widely used technique features polymerase chain reaction-based amplification of the 26 exons of *SCN1A* followed by direct DNA sequencing. After examination of 16 suspected DS patients we have found causative *SCN1A* mutations in 4 of them, representing 25%.

Kľúčové slová: Dravet syndrome; SMEI; *SCN1A*; epilepsy

Úvod a formulácia cieľa

Dravetovej syndróm (DS; SMEI; SME; OMIM 607208) je pomenovaný po Charlotte Dravetovej, ktorá ho prvý krát popísala v roku 1978 ako ťažkú myoklonickú epilepsiu. Je to zriedkavé ochorenie s incidenciou 1/40000 v bežnej populácii USA [1] a 1/20000 alebo 1/30000 vo Francúzsku [2]. Zo všetkých pacientov s príznakmi epilepsie sa DS vyvinie u 3-5% v prvom roku života a u 7% do 3. roka života [3].

K prvým symptómom patria pretrvávajúce záchvaty klonického, tonicko-klonického, či už generalizovaného alebo unilaterálneho charakteru. Neskôr sa rozvíjajú myoklonické, atypické absencie a atonické záchvaty, alternujúce parciálne záchvaty a konvulzné štádium epilepsie. Často sa objavuje konečné, život ohrozujúce štádium, ktoré je označované ako epilepticus. Ochorenie navyše často vykazuje rezistenciu voči antikonvulzívnej (protikrčovej) liečbe [4].

V géne *SCN1A* ako prvý identifikoval mutácie asociované s DS Claes v roku 2001 [5]. Gén je lokalizovaný na chromozóme 2q24 a kóduje alfa podjednotku sodíkového kanála [6]. Aj na základe toho je DS zaradený do skupiny kanálopatí s autozomálne dominantným

typom dedičnosti, pričom väčšina mutácií v géne *SCN1A* má charakter *de novo* (88%) [7]. Gén pozostáva z 26 exónov a jeho celková dĺžka na chromozóme predstavuje približne 100 kb [8]. Organizácia intrónov a exónov je identická s génom *SCN8A*, ktorý sa nachádza na chromozóme 12q13. Táto skutočnosť pravdepodobne súvisí so spoločným ancestrálnym génom [9]. Oblasť 2q24 je charakteristická tým, že zahŕňa jeden z klastrov génov pre sodíkové kanály (*SCN3A*, *SCN2A*, *SCN1A*, *SCN9A* a *SCN7A*) s veľkosťou 1,4 Mb [10].

U 40 – 100% DS pacientov bola identifikovaná mutácia v géne *SCN1A* [11], pričom rozdielna miera záchyty nie je etnicky špecifická [12]. Z molekulárneho hľadiska je viac ako polovica mutácií v *SCN1A* u DS pacientov charakteru „loss of function“ a v prevažnej väčšine sú lokalizované v transmembránovom segmente proteínu [13].

V predloženej práci sme sa zamerali na štúdium mutačného spektra a frekvencie prípadných identifikovaných mutácií v géne kódujúceho alfa-podjednotku sodíkového kanála $Na_v1.1$ u suspektných pacientov s DS na Slovensku. K tomuto cieľu sme sa rozhodli dopracovať pomocou amplifikácie kódujúcich sekvencií génu *SCN1A* a ich následným sekvenovaním a analýzou sekvenačných dát.

Materiál a metódy

Analýzu sme uskutočnili na súbore 16 vzoriek DNA pacientov so suspektným DS. Vzorky boli poskytnuté Klinikou detskej neurológie LF UK a DFNSP v Bratislave a DNA bola izolovaná v laboratóriu klinickej genetiky 2. detskej kliniky LF UK a DFNSP v Bratislave. Pokiaľ vieme, žiadny z pacientov nie je v príbuzenskom pomere. Použité DNA vzorky boli izolované počas obdobia od roku 2011 až po rok 2013.

Na amplifikáciu exónov 1 až 26 génu *SCN1A* sme použili nami navrhnuté oligonukleotidové primery, navrhnuté pomocou internetového softvéru Primer3. Ako referenčnú sekvenciu sme použili genomickú sekvenciu (ENST00000303395) z internetovej databázy Ensembl. Analýzu produktov sekvenačnej reakcie sme uskutočnili kapilárnou elektroforézou, ktorá prebehla na automatickom genetickom analyzátore ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem, USA) s využitím 80 cm dlhých kapilár a lineárneho polyméru POP7 (Applied Biosystems). Elektroforetické dáta boli spracované softvérom Sequencing Analysis Software v5.2. Následná analýza sekvencií bola uskutočnená softvérom Chromas Pro ver 3.1 (Technelysium, Australia).

Výsledky a diskusia

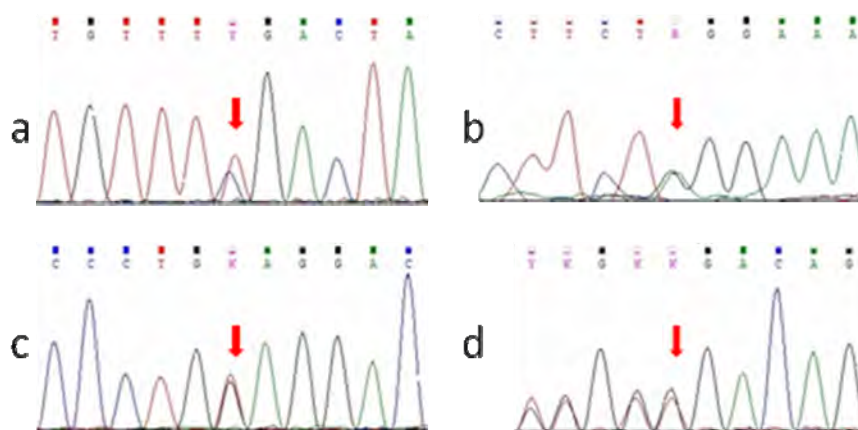
Po sekvenčnej analýze všetkých exónov génu *SCN1A* sme identifikovali množstvo polymorfizmov, ktoré však podľa dostupnej literatúry nie sú asociované s DS. Identifikované boli štyri mutácie, z čoho tri sú nové (Trp384X, Glu78X, Asp1383Glyfs*4) a jedna je už popísaná (Arg377X).

Mutácia Arg377X bola popísaná Mancardim v roku 2006 [14]. Spôsobuje vytvorenie predčasného STOP kodónu na základe čoho dochádza ku skráteniu proteínu.

Nová mutácia c.1151G>A (Trp384X) je zaujímavá z toho hľadiska, že je síce lokalizovaná v inom mieste ako mutácia c.1152G>A, popísaná v práci Harkina z roku 2007 [15], no jej dôsledok je v konečnom dôsledku rovnaký. V oboch prípadoch dochádza k tvorbe predčasného STOP kodónu (UAG respektíve UGA), čím sa do značnej miery skraca je pôvodný 2009 aminokyselín dlhý proteín. Jeho funkcia je tým výrazne narušená.

Tretia mutácia Glu78X je tiež nová a taktiež spôsobuje skrátenie proteínu tým, že vytvára predčasný terminačný kodón. Skrátenie je o to závažnejšie, že k ukončeniu translácie dochádza už po 78 aminokyselinách. Možno teda predpokladať veľmi závažný dopad na proteínovej úrovni.

Štvrtou mutáciou (Asp1383Glyfs*4) je jednonukleotidová duplikácia v polohe 1383, čoho následkom je posun čítacieho rámca a vytvorenie predčasného terminačného kodónu o tri triplety smerom ku 3' koncu. Následkom je znova produkcia kratšieho proteínu. Obrázok č. 1 predstavuje elektroforetogramy s vyznačenými identifikovanými mutáciami.



Obr. 1 Elektroforetogramy identifikovaných mutácií: (a) Arg377X, (b) Trp384X, (c) Glu78X, (d) Asp1383Glyfs*4

Teda po analýze génu *SCN1A* u suspektných pacientov s DS sa nám podarilo u 4/16 teda u 25% zistiť príčinu ochorenia. Skrining zdravej populácie nebol vykonaný, pretože je

zjavné, že sa skutočne jedná o mutácie s vážnym dopadom na štruktúru a funkciu proteínu kódovaného génom *SCN1A*.

Záver

Skorá diagnostika je u pacientov s DS kľúčovým faktorom, nakoľko je možné zvoliť vhodnejší spôsob liečby ochorenia. V neposlednom rade je na základe molekulárno – genetického vyšetrenia možné definitívne stanoviť, či potvrdiť klinicky stanovenú diagnózu. Takáto informácia môže prispieť k oboznámeniu rodičov s príčinami záchvatov ich detí a v rámci genetického poradenstva ich informuje o pravdepodobnosti výskytu ochorenia u ďalších potomkov.

Doposiaľ bolo celosvetovo identifikovaných viac ako 870 mutácií. Náš výskum potvrdil túto obrovskú variabilitu, nakoľko boli v géne *SCN1A* identifikované tri nové mutácie. Pomocou zvolených metód sa nám podarilo v tomto géne odhaliť štyri mutácie (Trp384X, Glu78X, Asp1383Glyfs*4, Arg377X) a množstvo polymorfizmov. Teda u štyroch pacientov z nášho súboru bola diagnostikovaná príčina ochorenia. Na nižšom percente (25%) pacientov s diagnostikovanou mutáciou môže mať určitý podiel aj nepresná diferenciálna diagnostika zo strany klinických pracovísk, ktorú nemožno nikdy úplne vylúčiť. Na porovnanie, v štúdií Claesa z roku 2003 [16] predstavovala záchytnosť 100% (9/9), v štúdií Fujiwaru z roku 2003 [17] 85,7% (30/35) a v štúdií Wallaca z roku 2003 [18] 33,3% (8/24). Pacienti, u ktorých nebola zistená mutácia v géne *SCN1A* budú podrobení analýze na ďalšie gény asociované s DS (*SCN1B*, *SCN2A*, *GABRD* a *GABRG2*).

PodĎakovanie

Touto cestou by sme sa chceli poďakovať všetkým pracovníkom nášho pracoviska za ich cenné rady, pomoc a trpezlivosť. Tento projekt je financovaný z grantu VEGA 1/1288/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Hurst D. L. (1990) *Epilepsia* 31, p. 397
- [2] Yakoub M., Dulac O., Jambaque I., et al. (1992) *Brain Dev* 14, p. 299
- [3] Wolff M., Casse-Perrot C., Dravet C. (2006) *Epilepsia* 47 Suppl 2, p. 45
- [4] Dravet C. (2011) *Epilepsia* 52 Suppl 2, p. 3
- [5] Claes L., Del-Favro J., Ceulemans B., et al. (2001) *Am J Hum Genet* 68, p. 1327
- [6] Westenbroek R. E., Merrick D. K., Catterall W. A. (1989) *Neuron* 3, p. 695

- [7] Mulley J. C., Scheffer I. E., Petrou S., et al. (2005) *Hum Mutat* 25, p. 535
- [8] Escayg A., Goldin A. L. (2010) *Epilepsia* 51, p. 1650
- [9] Escayg A., Macdonald B. T., Meisler M. H., et al. (2000) *Nat Genet* 24, p. 343
- [10] Meisler M. H., O'Brien J. E., Sharkey L. M. (2010) *J Physiol* 588, p. 1841
- [11] Ceulemans B. P., Claes L. R., Lagae L. G. (2004) *Pediatr Neurol* 30, p. 236
- [12] Meisler M. H., Kearney J. A. (2005) *J Clin Invest* 115, p. 2010
- [13] Catterall W. A., Kalume F., Oakley J. C. (2010) *J Physiol* 588, p. 1849
- [14] Mancardi M. M., Striano P., Gennaro E., et al. (2006) *Epilepsia* 47, p. 1629
- [15] Harkin L. A., McMahon J. M., Iona X., et al. (2007) *Brain* 130, p. 843
- [16] Claes L., Ceulemans B., Audenaert D., et al. (2003) *Hum Mutat* 21, p. 615
- [17] Fujiwara T., Sugawara T., Mazaki-Miyazaki E., et al. (2003) *Brain* 126, p. 531
- [18] Wallace R. H., Hodgson B. L., Crinton B. E., et al. (2003) *Neurology* 61, p. 765

Inhibícia replikácie vírusu chrípky v BALB/c myšiach pomocou siRNA namierených voči NS génu

Petra Švančarová¹, Darina Svetlíková¹, Lucia Škorvanová¹, Tatiana Betáková¹

¹*Slovenská akadémia vied, Virologický ústav, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika, petra.borovska@savba.sk*

Abstrakt

Posttranscriptional gene silencing mediated by small interfering RNAs (siRNAs) is called RNA interference (RNAi). RNAi represents a promising novel therapeutic option for treating influenza disease. This study shows that 19 nt duplexes of siRNAs of the influenza NS gene can cause inhibition of influenza virus A/PR/8/34 replication in MDCK cells and protect BALB/c mice from lethal challenge.

KLúčové slová: *vírus chrípky typu A; siRNA; NS gén; NS1 proteín*

Úvod a formulácia cieľa

Vírusy chrípky typu A spôsobujú u ľudí vysoko infekčné ochorenie respiračného traktu. Vzhľadom na neustálu variabilitu vo vírusových povrchových antigénoch majú súčasne dostupné vakcíny a antivirotiká proti chrípke obmedzenú účinnosť, a preto je potrebné vyvinúť novú stratégiu, ktorá bude účinne a špecificky interferovať s replikáciou chrípkových vírusov.

Jedným z prístupov, ktorý zabezpečuje ochranný mechanizmus bunky a zároveň umožňuje inhibovať replikáciu vírusu chrípky je RNA interferencia. Mechanizmus RNA interferencie je iniciovaný RNázou III nazývanou Dicer, ktorá rozpoznáva dlhé dsRNA molekuly a štiepi ich na malé interferujúce RNA (siRNA) s dĺžkou 19-26 nukleotidov. Duplexy siRNA sú následne rozpletené a jedno z vlákien je inkorporované do nukleázového komplexu nazývaného RISC. Vlákno siRNA, ktoré je zabudované do RISC nasadá na mRNA cieľových génov a pomocou proteázy nachádzajúcej v RISC ju štiepi [1].

Doposiaľ publikované laboratórne výsledky, v ktorých bola využitá RNA interferencia na inhibíciu replikácie viacerých subtypov vírusu chrípky, ukazujú sľubné výsledky, a preto sme pripravili niekoľko plazmidových siRNA konštruktov namierených voči rôznym oblastiam NS génu vírusu chrípky typu A. Ich účinok na replikáciu vírusu chrípky sme testovali v podmienkach *in vitro* a *in vivo*.

Materiál a metódy

Bunková línia a vírusy

- MDCK – stabilizovaná adherentná bunková línia pochádzajúca z obličiek psa *Canis Familiaris*
- A/PR/8/34 (H1N1) - kmeň vírusu chrípky typu A
- A/PR/8/34 (H1N1) – kmeň vírusu chrípky pytu A adaptovaný na BALB/c myši. LD₅₀ pre tento vírus je 10⁵.

Príprava plazmidov nesúcich siRNA voči NS génu vírusu chrípky A/PR/8/34

Pomocou softvéru siRNA Designer Tool sme v rámci NS génu vírusu chrípky typu A vybrali 19bp dlhé oligonukleotidy, z ktorých úseky označené ako NS106 (88-106 bp), NS149 (131-149 bp), NS239 (221-239 bp), NS375 (357-375 bp) patria do kódujúcej sekvencie pre NS1 proteín. Oligonukleotid NS593 (575-593bp) zodpovedá sekvencii spoločnej pre NS1 aj NEP proteín. Navrhnuté oligonukleotidy sme naklonovali do vektora GeneClip™ po U1 promótor podľa protokolu výrobcu (Promega). Pripravenými konštruktmi sme transformovali bunky *E. coli* DH5α a vysiali sme ich na miskú s LB médiom a prídavkom selekčného antibiotika Ampicilínu. Z vyrastených kolónií sme následne izolovali plazmidovú DNA (siRNA).

Infekcia MDCK buniek vírusom A/PR/8/34

MDCK bunky založené na 24 jamkovej platničke sme infikovali vírusom A/PR/8/34 v riedení 1:3500. Po hodinovej inkubácii v termostate pri 37°C a 5% CO₂ sme bunky premyli fyziologickým roztokom pH 7,2 a pridali bezsérové DMEM médium. Následne sme ich inkubovali 14 hod. pri 37°C a 5% CO₂.

Transfekcia MDCK buniek

Po infekcii sme MDCK bunky transfekovali jednotlivými siRNA konštruktami (2 μg, 4 μg a 8 μg) alebo súborom konštruktov (1. NS1 skupina obsahuje všetky siRNA konštrukty, 2. NS1 skupina bez NS593), pričom sme použili 1 μg alebo 2 μg z každého konštruktu. Na transfekciu sme použili HeLa Transfection reagent/DNA lipokomplex, ktorý sme zmiešali s OPTI-MEM^R I + Gluta MAX-I médiom v pomere doporučenom výrobcem. Po 15 minútovej inkubácii sme do zmesi pridali siRNA konštrukt a inkubovali sme ďalších 15 minút. Reakčnú zmes sme následne pridali k infikovaným MDCK bunkám a nechali 24 hod. pri 37°C a 5% CO₂.

Plaková titrácia

MDCK bunky založené na 24 jamkovej platničke sme infikovali odobratou suspenziou z predchádzajúceho pokusu, ktorú sme riedili 10-kovým riedením. Po hodinovej infekcii sme

bunky opláchli fyziologickým roztokom pH 7,2 a pridali médium s metylcelulózou. Po 72 hod. sme pod mikroskopom pozorovali vznik plakov, ktoré sme farbili Karbol-Fuchsínom.

Infekcia BALB/c myši

6-týždňové BALB/c myši, ktoré boli v slabej narkóze sme intranazálne (i.n.) infikovali vírusom A/PR/8/34 adaptovaného na myši, dávkou $4 \times LD_{50}$ v objeme 40 μ l.

In vivo transfekcia

Po 14 hod. infekcii sme pomocou TurboFect™ *in vivo* Transfection Reagentu zaviedli do BALB/c myši siRNA plazmidové konštrukty. Transfekčnú zmes sme pripravili podľa návodu výrobcu. 10 μ g (resp. 50 μ g) plazmidovej DNA sme zmiešali so 400 μ l sterilnej 5 % glukózy. Následne sme pridali 1,2 μ l (resp. 6 μ l) TurboFect™ *in vivo* Transfection Reagentu. Po 15-20 min. inkubácii pri laboratórnej teplote sme takto pripravenú zmes injektovali intravenózne cez vena caudalis do BALB/c myši. Myši sme rozdelili do skupín podľa typu podaného siRNA konštruktov resp. skupiny konštruktov a sledovali sme ich počas 14 dní, pričom sme zaznamenávali ich telesnú hmotnosť, prežívanie a celkový fyzický stav.

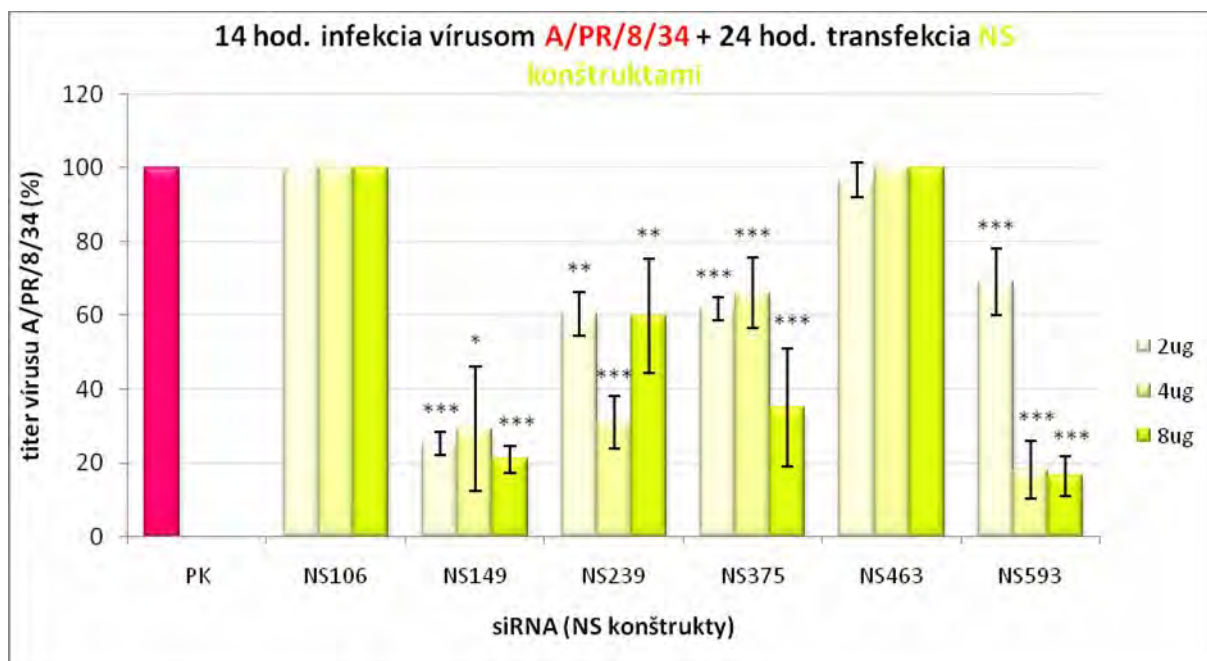
Výsledky a diskusia

Vplyv pripravených siRNA konštruktov na replikáciu vírusu chrípky typu A sme testovali v podmienkach *in vitro* aj *in vivo*.

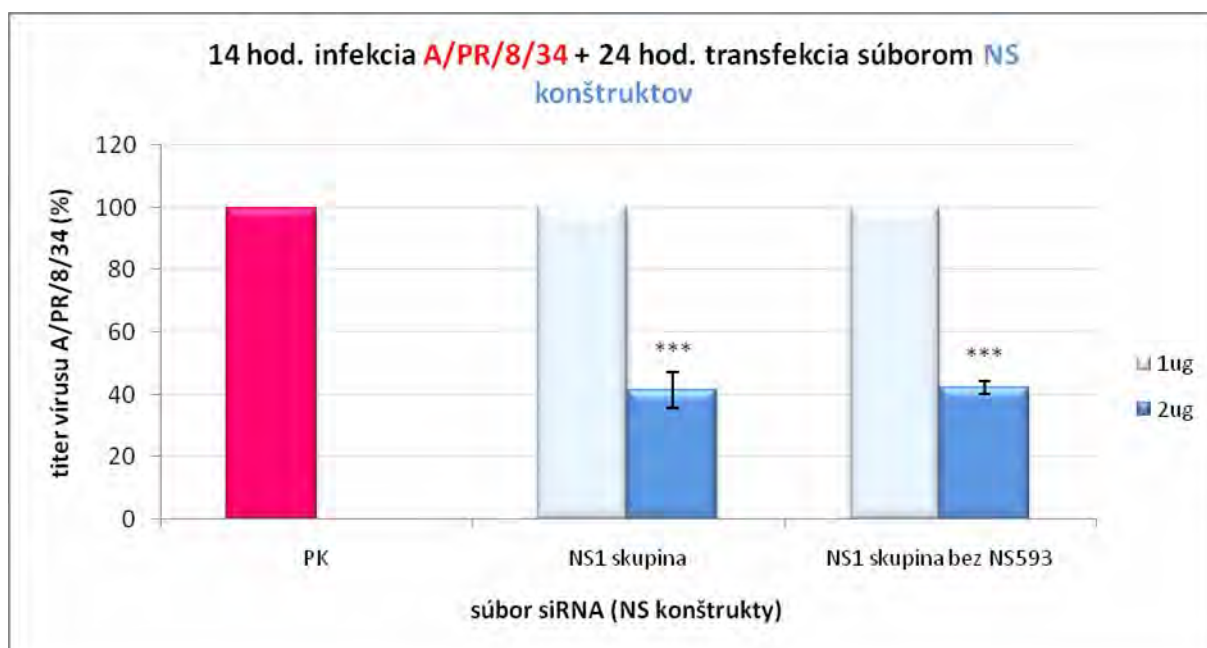
Z výsledkov uvedených na obrázku 1. môžeme vidieť, že *in vitro* na MDCK bunkách sme pri použití jednotlivých siRNA konštruktov dosiahli signifikantné zníženie titra vírusu A/PR/8/34 pomocou konštruktov NS149, NS239, NS375 a NS593. Najväčšiu a štatisticky veľmi signifikantnú inhibíciu replikácie vírusu chrípky, takmer 84%, sme zaznamenali po použití 8 μ g konštrukt NS593. Práve tento konštrukt patrí do kódujúcej sekvencie pre NS1 aj NEP proteín, čo malo pravdepodobne výrazný vplyv na redukciu vírusového titra.

V ďalších pokusoch sme sa zamerali na testovanie inhibičného účinku viacerých siRNA konštruktov súčasne. Zaujímalo nás, či pôsobením súboru všetkých konštruktov patriacich do sekvencie pre NS1 proteín resp. bez konštrukt NS593, ktorý je spoločný pre NS1 aj NEP proteín, dosiahneme výraznejšie zníženie titra vírusu A/PR/8/34 ako pri pôsobení jednotlivých siRNA konštruktov.

Na základe výsledkov z týchto pokusov (obr. 2.) môžeme konštatovať, že pôsobením súboru konštruktov, pri ktorom bola použitá koncentrácia 1 μ g z každého konštrukt bol titer vírusu porovnateľný s kontrolou vírusu. Účinok sa prejavil až pri zvýšení koncentrácie konštruktov na 2 μ g. V oboch prípadoch sme dosiahli štatisticky veľmi signifikantné zníženie titra vírusu A/PR/8/34 takmer o 60%.



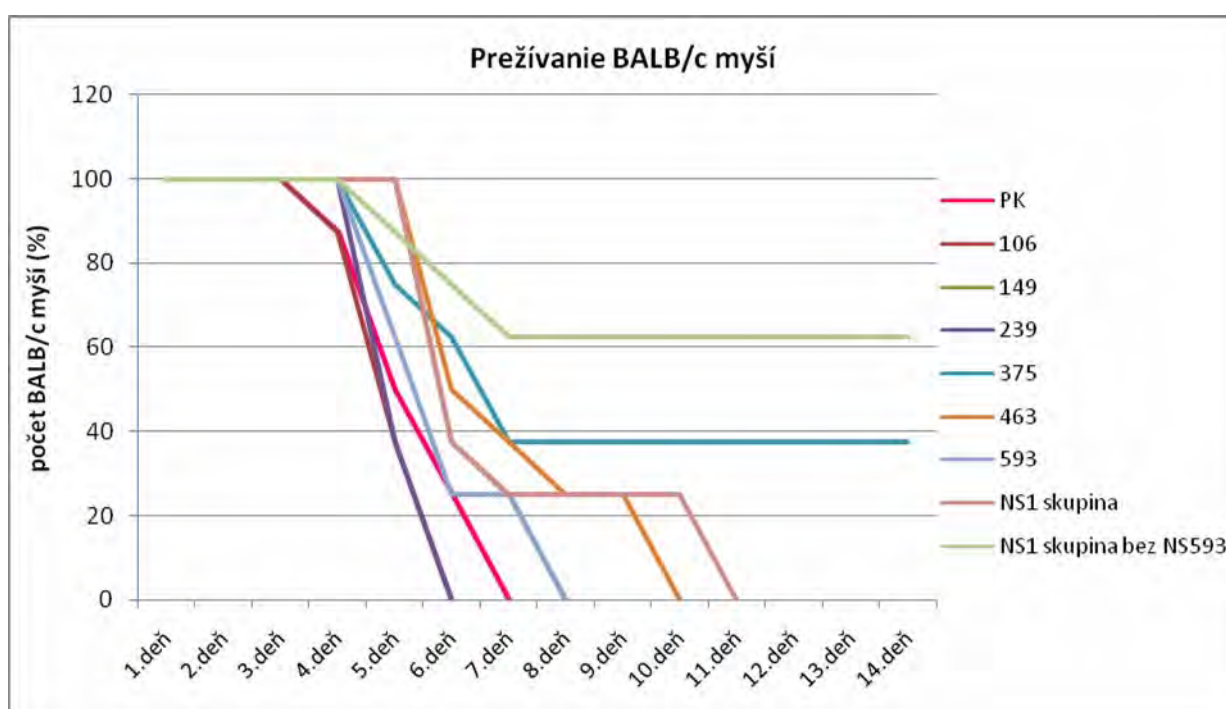
Obr. 1 RNA interferencia na MDCK bunkách infikovaných vírusom A/PR/8/34 a transfekovaných NS konštruktami v koncentráciách 2 µg, 4 µg a 8 µg. PK - pozitívna kontrola vírusu A/PR/8/34, * - štatistická signifikancia (* P < 0,05; ** P < 0,02; *** P < 0,01).



Obr. 2 RNA interferencia na MDCK bunkách infikovaných vírusom A/PR/8/34 a transfekovaných súborom konštruktov v koncentráciách 1 µg a 2 µg. Jednotlivé stĺpce predstavujú titer vírusu A/PR/8/34 uvádzaný v %. PK - pozitívna kontrola vírusu A/PR/8/34; NS1 skupina obsahuje konštrukty NS106, NS239, NS375, NS463, NS593; * - štatistická signifikancia (* P < 0,05; ** P < 0,02; *** P < 0,01).

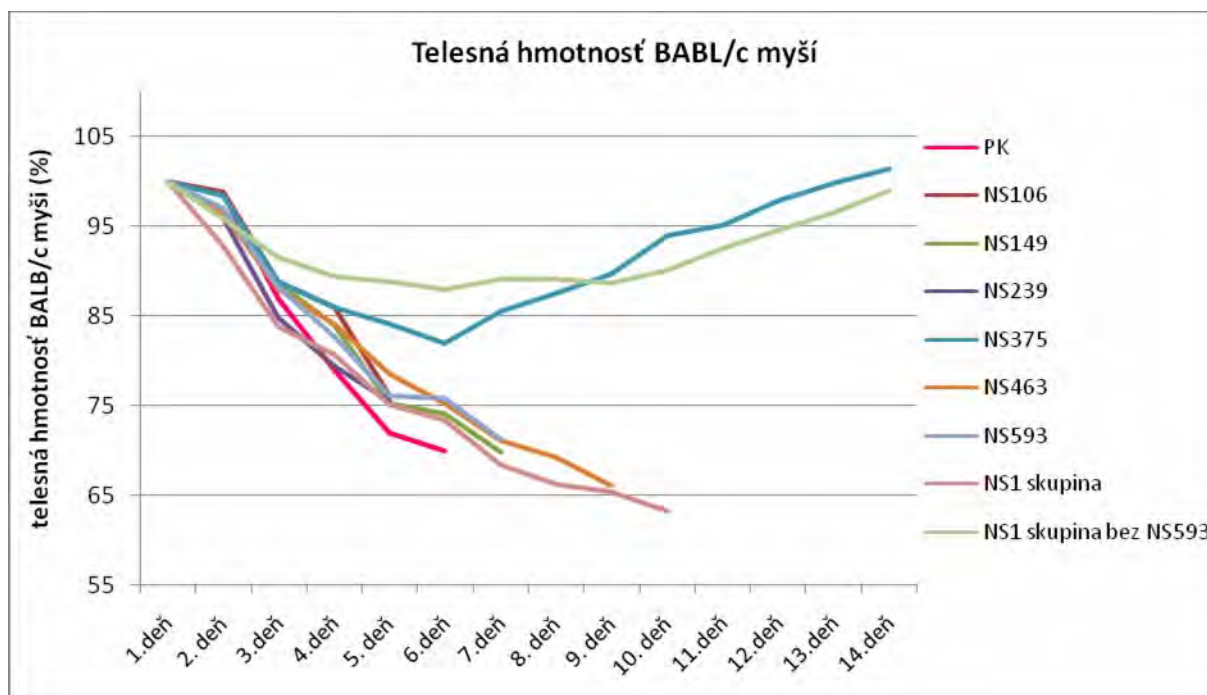
V druhej sérii pokusov sme sa zamerali na testovanie siRNA konštruktov v podmienkach *in vivo* na BALB/c myšiach.

Na obrázku 3 môžeme vidieť, že vplyvom konštruktov NS149, NS593 a NS463 sa predĺžilo prežívanie BALB/c myší o 1 resp. 3 dni. Výraznejší efekt sme zaznamenali pôsobením konštruktu NS375, ktorý ochránil pred úhynom 40% testovaných myší. Dobré výsledky sme zaznamenali aj pri transfekcii viacerých siRNA konštruktov súčasne. Použitím všetkých siRNA konštruktov naraz sme predĺžili prežívanie myší o 4 dni. Za najlepšie riešenie sa ukázalo použitie všetkých siRNA konštruktov bez konštruktu NS593, ktoré ochránilo pred letálnou infekciou vírusom A/PR/8/34 takmer 60% testovaných BALB/c myší.



Obr. 3 Prežívanie BALB/c myší infikovaných vírusom A/PR/8/34 a transfekovaných jednotlivými siRNA konštruktmi alebo ich súborom. PK - pozitívna kontrola vírusu A/PR/8/34 adaptovaného na myši.

Súčasne s prežívaním BALB/c myší sme zaznamenávali aj úbytok a nárast ich telesnej hmotnosti. Výsledky uvedené v obrázku 4. ukazujú, že pôsobením všetkých siRNA konštruktov došlo k poklesu ich telesnej hmotnosti. Avšak, u myší, ktorým bol podaný konštrukt NS375 alebo súbor konštruktov NS1 bez NS593 došlo k opätovnému nárastu telesnej hmotnosti a po 14 dňoch dosiahli 100% svojej pôvodnej hmotnosti, čo koreluje s ich prežívaním.



Obr. 4 Telesná hmotnosť BALB/c myši infikovaných vírusom A/PR/8/34 a transfekovaných jednotlivými siRNA konštruktmi alebo ich súborom. PK - pozitívna kontrola vírusu A/PR/8/34 adaptovaného na myši.

Záver

Pomocou siRNA konštruktov namierených voči NS génu vírusu chrípky typu A sme v podmienkach *in vitro* inhibovali replikáciu vírusu chrípky od 0 do 84%. V podmienkach *in vivo* sme ochránili pred letálnou infekciou vírusom A/PR/8/34 0 až 60% testovaných BALB/c myši.

Pod'akovanie

Táto štúdia/publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: TRANSMED 2, ITMS: 26240120030, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a projektu VEGA 2/0005/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Hammond S. M., Bernstein E., Beach D., Hammon G. (2000) Nature 404(6775), p. 293

Veľkosť kremičitanových fytolitov tvorených v rastlinách sa dá cielene ovplyvniť pomocou kadmia

Marianna Švancárová, Michal Martinka

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyziológie rastlín, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; marianna.svancarova@gmail.com

Abstrakt

Many plants accumulate silicon in a solid form – silica phytoliths – to alleviate the biotic and abiotic stresses. There are tendencies to use the silica phytoliths like components in construction and electrotechnical industry. The aim of this study was to influence by cadmium the size and morphology of silica phytoliths developing along the central longitudinal axis of tangential cell walls of endodermis in primary roots of *Sorghum bicolor*. Plants were grown in hydroponics with or without of silicon (5 mmol Si/dm^3), and without or with cadmium in a wide concentration range ($0.05\text{--}50 \text{ } \mu\text{mol Cd/dm}^3$). With increasing concentrations of Cd ($0.1\text{--}2.5 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$) the silica phytoliths become smaller (from $8,59$ to $6,73 \text{ } \mu\text{m}$) and develop ectopically closer to the radial cell walls. The phytoliths ceased to appear from $5 \text{ } \mu\text{mol Cd/dm}^3$. Based on the results Cd does not affect the shape of silica phytoliths, but it changes their size and localisation inside the cells. These facts can be used where small-sized silica components are more suitable in industrial applications.

KLúčové slová: *Cirok dvojfarebný; endoderma; kadmium; kremičitanové fytolity.*

Úvod a formulácia cieľa

Kremík je druhým najrozšírenejším prvkom v zemskej kôre po kyslíku. Rastliny prijímajú kremík vo forme kyseliny kremičitej pomocou proteínových transportérov [1] a akumulujú ho vo svojich telách [2]. Kremík sa v rastlinách podieľa na znižovaní biotických a abiotických stresov, napr. zo zasolenia, ťažkých kovov, sucha, radiačného poškodenia, nerovnováhy živín, chladu, mrazových a vysokých teplôt [3]. Kremík sa najčastejšie ukladá ako hydratovaný oxid kremičitý ($\text{SiO}_2, n\text{H}_2\text{O}$) – biogénny opál – do lumenu buniek a medzibunkových priestorov. Výrazne ohraničené depozity kompaktného tvaru sa nazývajú kremičitanové fytolity [4]. Fytolity sa formujú v rôznych veľkostiach a morfológicky pestrých tvaroch [5]. Napr. v listoch ryže sa tvoria lalokovité kremičitanové fytolity schopné kvôli špecifickému zakriveniu povrchu odrážať ultrafialové alebo infračervené elektromagnetické žiarenie, čím pomáhajú znižovať radiačné poškodenie, resp. teplotu rastliny vystavenej silnému svetelnému toku [6]. V koreňoch rastlín rodu cirok (*Sorghum*) sa v relatívne pravidelných vzdialenostiach a veľkostiach tvoria polgulovité kremičitanové fytolity vyrastajúce z vnútorných tangenciálnych stien endodermálnych buniek [7]. Je známe, že kadmium ako ťažký kov ovplyvňuje mnohé metabolické procesy v rastlinách a môže výrazne vplývať na vývin a morfológiu buniek [8].

Na základe vyššie spomenutého sme začali experimentálne overovať možnosť využitia kadmia pri ovplyvňovaní veľkosti, príp. morfológie kremičitanových fytolitov vyvíjajúcich sa v koreňoch ciroku dvojfarebného (*Sorghum bicolor*). Takto cielene zmenené kremičitanové fytolity by sa mohli následne využiť v elektrotechnickom alebo stavebnom priemysle [6].

Materiál a metódy

Experimenty sme uskutočnili s cirokom dvojfarebným (*Sorghum bicolor* Moench), kultivar Gadambalia. Sterilizované semená sme najprv inbibovali 24 hodín pri fotoperióde 14 h svetlo/10 h tma a následne nechali klíčiť v papierových roľkách 72 hodín v termostate pri teplote 25 °C v tme. Takto pripravené klíčence sme používali pre odbery materiálu alebo ďalšie experimenty.

Klíčence uchytené po 10 kusov v polystyrénových plávajúcich držiakoch, ktoré umožnili sledovanie klesajúcej hladiny hydroponického média (destilovaná voda) sme kultivovali 72 hodín v hydroponii v 800 ml kultivačných nádobách. Pri experimentoch sme použili hydroponické média bez pridania silikátu sodného (kontrolné médium bez prídavku kremíka – len destilovaná voda – Si0), a potom s prídavkom 5 mM Si kremíka (vo forme silikátu sodného) buď bez kadmia (kontrolné médium s prídavkom kremíka – Si5000Cd0) alebo s kadmiumom v rôznych koncentráciách (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ Cd – Si5000CdX, pričom X je vo výsledkoch nahradené koncentráciou kadmia v médiu v μM). Kadmium sa pridávalo vo forme zlúčeniny $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$. Pred kultiváciou sme upravili pH všetkých použitých hydroponických médií na hodnotu 5,8. Kultivácia prebiehala v kultivačnej komore za kontrolovaných podmienok: teplota 24 °C, dĺžka fotoperiódy 16 h/8 h svetlo/tma, intenzita osvetlenia $125 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Po kultivácii sme pre zistenie vplyvu kadmia na rastliny merali základné produkčné parametre (dĺžka koreňov, čerstvá a suchá hmotnosť nadzemnej a podzemnej časti rastlín). Pre sledovanie vývinu kremičitanových fytolitov v endodermálnych bunkách koreňov sme zo segmentov, odobratých z oblasti 20 – 30 mm od bázy primárnych seminálnych koreňov, strhli epidermu spolu s vonkajšou primárnou kôrou. Takto upravené vzorky obsahujúce stredný valec obklopený vnútornými tangenciálnymi stenami endodermu sme pozorovali v diferenčnom interferenčnom kontraste (mikroskop Axioskop 2 plus, Carl Zeiss, Nemecko). Digitálny obraz sme zhotovili digitálnou kamerou DP72 (Olympus). Morfológické charakteristiky endodermálnych buniek a kremičitanových fytolitov v kontrolných podmienkach a po vplyve kadmia sme stanovili softvérom pre analýzu digitálneho obrazu

(Lucia, v. 4.8, LIM, Česká republika).

Výsledky a diskusia

V tejto práci sme sledovali vývin kremičitanových fytolitov v endodermálnych bunkách primárnych seminálnych koreňov ciroku dvojfarebného (*Sorghum bicolor*) s cieľom ovplyvniť veľkosť, príp. morfológiu fytolitov pomocou kadmia.

Aby sme otestovali, či sa kremičitanové fytolity v rastlinách tvoria bez prídavku kremíka do média, kultivovali sme cirok v kontrolnom médiu Si-. V sledovanej vzdialenosti 20 – 30 mm od bázy primárneho koreňa sa nevyvíjali žiadne zreteľné kremičitanové fytolity v endodermálnych bunkách. Z toho vyplýva, že množstvo kremíka prítomného v kontrolnom médiu bez ďalšieho prídavku kremíka a ani kremík prítomný v semene nie sú dostatočné na vytvorenie evidentných kremičitanových teliesok v endodermálnych bunkách v sledovanej oblasti primárneho koreňa. Ich vývin sme však pozorovali vo vzorkách rastlín kultivovaných v kontrolnom médiu s prídavkom kremíka – Si5000Cd0. Podobne ako uvádzajú Lux a kol. [7] kremičitanové fytolity sa vyvíjali v endodermálnych bunkách od vnútornej tangenciálnej steny zväčša v jednom rade v približne uniformných vzájomných vzdialenostiach súbežne s pozdĺžnou osou buniek a dosahovali veľkosť $9,72 \pm 1,51 \mu\text{m}$. Následne sme zistili, že kadmium prítomné v médiu ovplyvňuje vývin a pri jeho vyšších koncentráciách aj lokalizáciu kremičitanových fytolitov. So stúpajúcou koncentráciou kadmia v hydroponických médiách sa v sledovanej oblasti síce nemení ich morfológický tvar, ale postupne sa mení ich veľkosť. Kým kadmium v nízkej koncentrácii (Si5000Cd0,05) neovplyvnilo vývin fytolitov v porovnaní s médiom Si5000Cd0, tak od vyššie použitých koncentrácií kadmia v médiách (Si5000Cd0,1 – Si5000Cd2,5) sa veľkosť vytvorených fytolitov zmenšovala ($8,59 \pm 1,89 \mu\text{m}$ – $6,73 \pm 1,04 \mu\text{m}$). Rastliny kultivované v médiách s koncentraciami kadmia $5 \mu\text{mol/dm}^3$ média a vyššími už netvorili pozorovateľné kremičitanové fytolity, pričom došlo aj k zastaveniu rastu koreňov. Toto poukazuje na toxický vplyv kadmia v daných koncentráciách [8]. Zmenu lokalizácie kremičitanových fytolitov sme zaznamenali v rastlinách kultivovaných v médiách Si5000Cd0,5 – Si5000Cd2,5. Vzájomné vzdialenosti kremičitanových fytolitov neboli uniformné, ich počet na bunku klesol a vytvárali sa aj mimo pozdĺžnej stredovej osi vnútornej tangenciálnej steny endodermálnych buniek, a síce bližšie k radiálnym stenám endodermálnych buniek. Vzhľadom k tomu, že doteraz nie sú známe genetické a metabolické procesy, príp. bunkové komponenty podieľajúce sa na vývine kremičitanových fytolitov v rámci rastlinných buniek, nevieme presne indikovať, ktoré

procesy sú kadmíom ovplyvnené a zároveň zodpovedné za konkrétnu lokalizáciu a riadenie veľkosti kremičitanových fytolitov. Predpokladáme však, že parciálny podiel na tom budú mať transportéry kremíka v membránach a ich zmenená aktivita a/alebo lokalizácia [1], príp. aktínový alebo mikrotubulový cytosket buniek [9]. Aspoň čiastočné objasnenie týchto procesov bude cieľom nášho ďalšieho výskumu.

Záver

Z výsledkov experimentov vyplýva, že kadmium prítomné v médiu síce neovplyvňuje tvar kremičitanových fytolitov, ale mení ich veľkosť a lokalizáciu v bunkách. Dané poznatky sa dajú využiť v praxi, ak by bolo vhodnejšie aplikovať v technológiách kremičitanové fytolity menších veľkostí.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-0140-10 a agentúrou VEGA 1/0817/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Ma J.F. (2010) Silicon Transporters in Higher Plants. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Kurashiki, p. 99
- [2] Hodson M.J., White P.J., Mead A., et al. (2005) *Ann. Bot.* 96(6), p. 1027
- [3] Ma J.F. (2003) *Soil Sci. Plant Nutr.* 50(1), p. 11
- [4] Prychid, C.J., Rudall, P.J., Gregory, M. (2004) *Bot. Rev.* 69, p. 377
- [5] Madella M., Alexandre A., Ball T. (2005) *Ann. Bot.* 96(2), p. 253
- [6] Neethirajan S., Gordon R., Wang L.J. (2009) *Trends Biotechnol.* 27(8), p. 461
- [7] Lux A., Luxova M., Abe J., et al. (2003) *New Phytol.* 158(3), p. 437
- [8] Lux A., Martinka M., Vaculik M., et al. (2011) *J. Exp. Bot.* 62(1), p. 21
- [9] Van de Meene A.M.L., Pickett-Heaps J.D. (2002) *J. Phycol.* 38(2), p. 351

Vplyv zvýšeného príjmu soli v skorých ontogenetických štádiach vývinu na kardiovaskulárne charakteristiky potkanov

Pavel Svitok, Luboš Molčan, Anna Veselá, Michal Zeman

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Mlynská dolina B2, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika; svitok@fns.uniba.sk

Abstrakt

Individual differences in salt sensitivity underlay individual differences in hypertension development when salt intake is high. Epigenetic factors acting during critical periods of development may contribute to these differences. The aim of our study was to analyze effects of increased salt intake on postnatal development and endocrine characteristics of Wistar rats. From day 2 after birth mothers were given a diet containing 2% NaCl. After weaning the pups were kept on the same diet until the end of the trial (week 15). Body weight and blood pressure (BP) were recorded weekly. Renin activity (PRA) and aldosterone were measured in plasma and density of AT₁ receptors in the kidney. We observed the BP increase in females, however relative heart and left ventricular weight increased only in males. PRA did not change between groups. Plasma aldosterone levels tended to decrease while AT₁ receptors in the kidney tended to increase in males. We conclude that a modest increase of dietary salt during critical periods may affect BP control and intersexual differences in this response exist.

Kľúčové slová: *hypertension, rat, perinatal development, salt diet.*

Úvod a formulácia cieľa

Hypertenziu definujeme ako stav, kedy je kardiovaskulárny systém pod abnormálnym fyziologickým tlakom a objavujú sa ochorenia spojené s týmto syndrómom [1]. Podľa WHO [2] sa u pacientov s hodnotami systolického tlaku ≥ 140 mmHg a hodnotami diastolického tlaku ≥ 90 mmHg vo väčšej miere prejavujú ochorenia spojené s vysokým krvným tlakom. Hypertenzia je silný nezávislý rizikový faktor pre vývin známych kardiovaskulárnych a cerebrovaskulárnych morbidít, ktoré zahrňujú infarkt myokardu, mŕtvicu, aterosklerózu a smrť [3]. Hypertenzia je teda dôležitý zdravotný problém, a preto je potrebných podstatne viac vedeckých výskumov a nových poznatkov [4].

V posledných desiatkach rokov sa v etiológii hypertenzie objavil koncept tzv. vývinového programovania. Podľa tohto konceptu environmentálne zásahy počas skorého obdobia vývinu, najmä počas kritických období, môžu mať za následok dlhodobé morfológické a fyziologické zmeny, ktoré môžu nakoniec vyústiť v ochorenie v dospelosti [5]. Je to prejavom všeobecného javu vývojovej plasticity [6]. Podstata vývojovej plasticity je v kritických obdobiach, kedy je systém plastický a citlivý na prostredie, čo sa neskôr nahrádza fixáciou funkčnej schopnosti [7]. Hypotéza „fetálneho pôvodu ochorenia“ predpokladá, že zmeny v nutričnom a endokrinnom stave plodu vyúsťujú do vývinových adaptácií, ktoré

permanentne menia štruktúru, fyziológiu a metabolizmus, v dôsledku čoho zvyšujú predispozíciu jednotlivcov na kardiovaskulárne, metabolické a endokrinné ochorenia v dospelosti [8]. Matka zabezpečuje výživu pre plod ale existuje aj mnoho ďalších faktorov kontrolujúcich prenos informácií z matky na plod, zahrňujúci matkin nutričný stav, jej cievne, endokrinné a metabolické odpovede na tehotenstvo a veľkosť a funkciu placenty [9].

Existujú výrazné interindividuálne rozdiely v citlivosti na príjem soli, ktoré môžu viesť k vývinu hypertenzie. U potkanov kmeňa Wistar zvýšený príjem soli (3,28%) v potrave od odstavu do dospelosti nevedol k nárastu krvného tlaku [10]. Vysoký, alebo nízky príjem soli počas gravidity a laktácie však vedie k zmenám vo vývine obličiek, pričom oba tieto zásahy vedú k nárastu krvného tlaku u takto ovplyvnených mláďat [11]. Niektoré experimentálne modely poukazujú na pohlavné rozdiely pozorované v reakcii na nepriaznivé podmienky počas vývinu plodu. Pravdepodobnú úlohu v tomto procese zohrávajú pohlavné hormóny a jedným z pravdepodobných mechanizmov je rozdielna regulácia renín-angiotenzín-aldosterónového systému [12].

Pretože príjem soli je vo vyspelých štátoch sveta nefyziologický vysoký [13], v našej práci sme sa zamerali na štúdium vplyvu zvýšenej konzumácie soli v diéte na postnatálny vývin a endokrinné regulácie s dôrazom na medzipohlavné rozdiely na animálnom modeli potkana.

Materiál a metódy

V pokuse sme použili potkany kmeňa WISTAR (Velaz, Praha, ČR) a ich potomstvo. Rodičovskú generáciu tvorili 4 samice a 4 samce vo veku 8 týždňov s hmotnosťou 230 ± 30 g. Po dovezení boli umiestené do karantény a pravidelne bol kontrolovaný ich zdravotný stav. Zvieratá boli synchronizované na svetelný režim 12L:12D (začiatok svetlej fázy o 7:00). Priemerná teplota vo zverinci bola 21 ± 2 °C a vlhkosť 55 ± 5 %. Vodu a potravu mali zvieratá k dispozícii *ad libitum*. Kontrolné samice a ich potomstvo (skupina „K“) dostávali počas celého trvania pokusu štandardné krmivo. Druhú skupinu tvorili samice, ktoré prímali počas gravidity štandardné krmivo, ale po pôrode dostávali krmivo obsahujúce 2% NaCl, Zvýšený obsah soli dostávali počas celej doby laktácie a táto potrava bola podávaná aj ich potomkom (skupina „SOL“) od odstavu až do ukončenia pokusu v 15. týždňoch veku. Po pôrode boli upravené počty mláďat na 4 samce a 4 samice na jednu samicu.

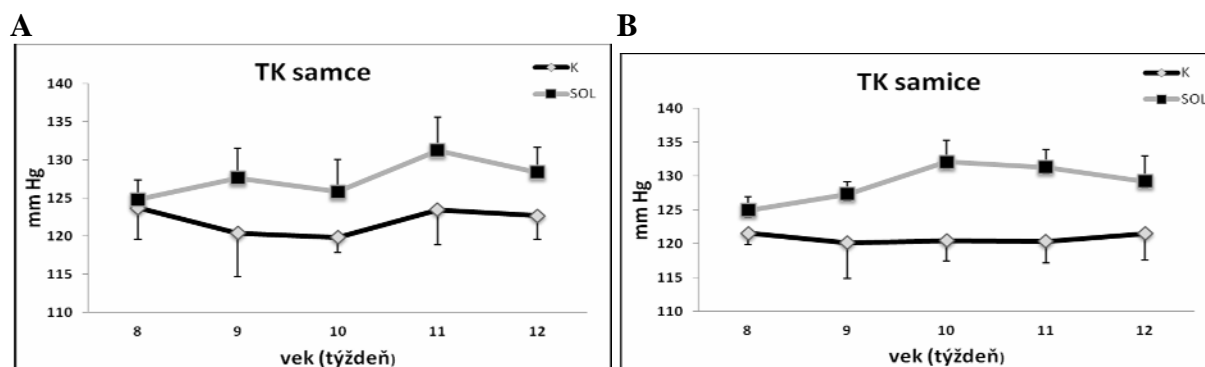
Vo veku 8 týždňov sme začali u mláďat s meraním tlaku krvi (TK) neinvazívnou metódou pomocou pletysmografickej metódy na chvoste zvieratá (PowerLab 4/30; AD Instruments, Nemecko). Merania prebiehali týždenne od dospelosti mláďat až do ukončenia

pokusu. Pokus bol ukončený usmrtením pokusných zvierat dekapitáciou po anestézii s CO₂. Po usmrtení boli odobraté vzorky krvi, srdca a obličiek. Hladiny hormónov v plazme boli stanovené pomocou rádioimunoanalýzy komerčne dostupnými kitmi a to Angiotensine I RIA KIT (Beckman Coulter, USA) pre plazmatickú renínovú aktivitu (PRA) a Aldoctk-2 (DiaSorin, USA) pre aldosterón. Pomocou metódy western blot boli v obličke stanovené AT₁ receptory použitím primárnej protilátky voči týmto receptorom (Cat. No. ab59018, Abcam, UK). Ich expresia bola porovnaná voči expresii proteínu glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy (GAPDH) použitím primárnej protilátky GAPDH (Cat. No. MAB374, Milipore, USA).

Všetky dáta sme vyhodnocovali pomocou softwaru STATISTICA 7 (Statsoft Inc., USA). Na porovnanie hmotností orgánov bol použitý t-test, alebo jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA). Výsledky meraní telesných hmotností a tlakov krvi boli spracované pomocou analýzy rozptylu pri opakovaných meraniach. Rozdiely medzi skupinami sme analyzovali pomocou LSD post hoc testov.

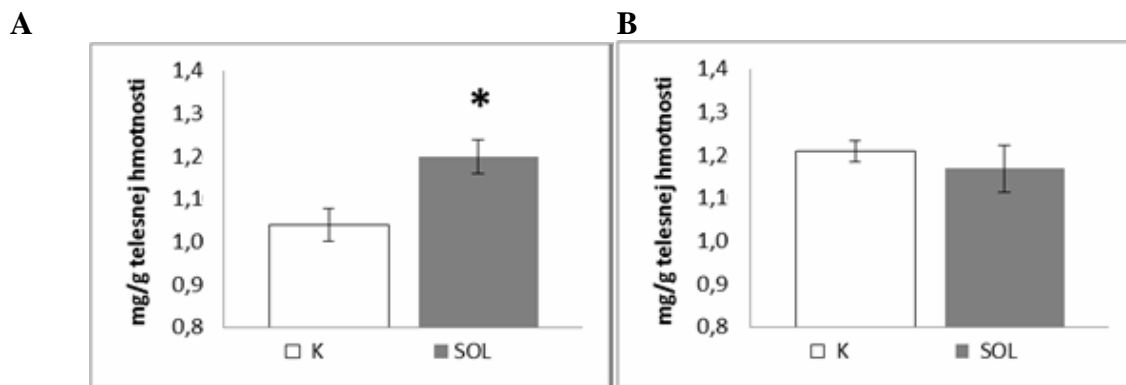
Výsledky a diskusia

Merania TK neinvazívnou manžetovou metódou na chvoste potkanov kŕmených kontrolnou potravou (K), ako aj kŕmených potravou obsahujúcou 2% NaCl (SOL) neodhalili signifikantné rozdiely medzi skupinami ($F_{(1,14)} = 1,916$; $p = 0,188$ (obr. 1A). U samíc (obr. 1B) malo skrmovanie soľnej diéty signifikantný vplyv na hodnoty TK ($F_{(1, 13)} = 9,127$; $p < 0,01$). Zistenia súhlasí s literárnymi údajmi [14], dokumentujúcimi nárastu TK u potomkov matiek potkanov vystavených zvýšenému príjmu soli počas laktácie.



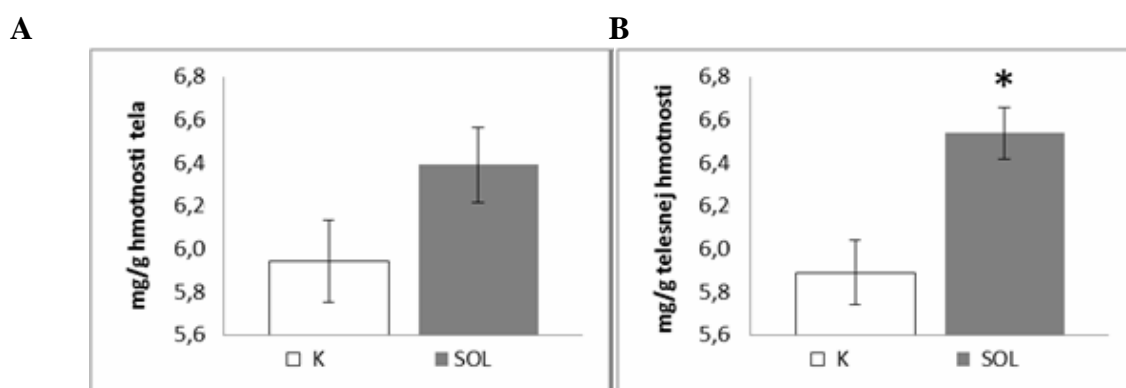
Obr. 1: Zmeny tlaku krvi (TK) samcov (A) potkanov kŕmených kontrolnou potravou (K; n=8) a potravou obsahujúcou 2% soli (SOL; n=8) a samíc (B) potkanov Wistar kŕmených kontrolnou potravou (K; n=8) a potravou obsahujúcou 2% soli (SOL; n=7). Hodnoty sú znázornené ako priemery \pm SEM

Po usmrtení zvierat sme vykonali anatomickú pitvu, odvážili jednotlivé orgány a porovnali ich relatívne hmotnosti (v pomere voči hmotnosti tela) medzi kontrolnou a SOL skupinou t-testom. Porovnanie relatívnej hmotnosti ľavej srdcovej komory preukázalo signifikantné rozdiely u samcov (obr. 2A) ($t = -2,852$; $df = 14$; $p < 0,05$), ale nie u samíc (obr. 2B) ($t = 0,676$; $df = 14$; $p = 0,510$).



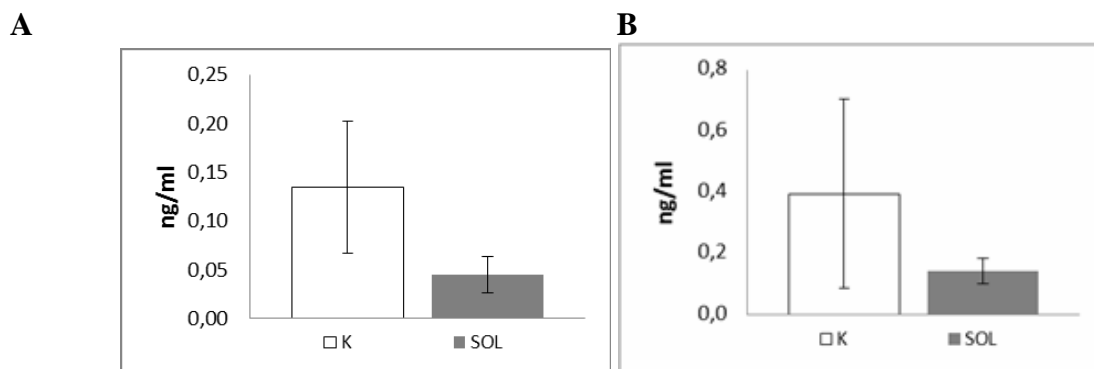
Obr. 2: Relatívna hmotnosť ľavej srdcovej komory samcov (A) a samíc (B) potkanov kŕmených kontrolnou potravou (K) a potravou obsahujúcou 2% soli (SOL). Hodnoty sú znázornené ako priemery \pm SEM pre $n = 8$

V prípade relatívnej hmotnosti obličiek (obr. 3) sme nepozorovali signifikantné rozdiely medzi skupinami samcov (obr. 3A), avšak hodnoty vykazujú tendenciu k vyšším hmotnostiam obličiek u samcov zo skupiny SOL ako u samcov zo skupiny K ($t = -1,727$; $df = 14$; $p = 0,106$). U samíc (obr. 3B) bola pozorovaná signifikantne vyššia relatívna hmotnosť obličiek u skupiny SOL ako u skupiny K ($t = -3,380$; $df = 14$; $p < 0,01$). Výsledky sú v súlade so zmenami TK, vyšší obsah soli mal v skorých štádiách vývinu negatívny vplyv, pričom horší vplyv mal na samice. Na vysvetlenie týchto abnormalít však treba vykonať ďalšie morfológické pozorovania.



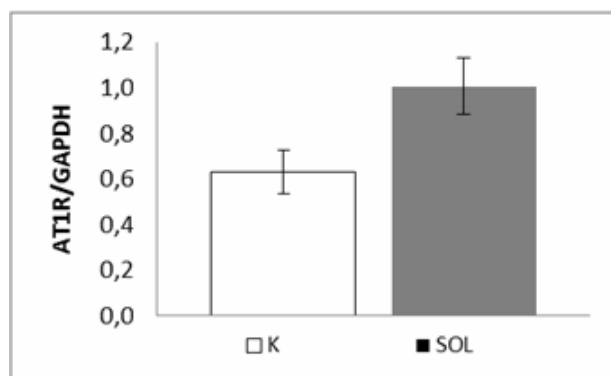
Obr. 3: Relatívna hmotnosť obličiek samcov (A) a samíc (B) potkanov kŕmených kontrolnou potravou (K) a potravou obsahujúcou 2% soli (SOL). Hodnoty sú udávané ako priemery \pm SEM pre $n = 8$.

Analýza rozptylu hladín plazmatického aldosterónu nepreukázala signifikantné rozdiely u samcov (obr. 5A) potkanov ($t = 1,288$; $df = 14$; $p = 0,219$). Rovnako ani u samíc (obr. 5B) neboli zistené signifikantné rozdiely vzhľadom na výrazný rozptyl v kontrolnej skupine ($t = 0,805$; $df = 14$; $p = 0,434$). Podobné výsledky sme pozorovali v plazmatickej renínovej aktivite, pričom rozdiely neboli signifikantné ani medzi samcami ($t = 0,989$; $df = 6$; $p = 0,361$), ani samicami ($t = 0,710$; $df = 6$; $p = 0,504$).



Obr. 5: Plazmatické hladiny aldosterónu samcov (A) a samíc (B) potkanov kŕmených kontrolnou potravou (K) a potravou obsahujúcou 2% soli (SOL). Hodnoty sú znázornené ako priemery \pm SEM pre $n = 8$.

Pomocou Western blot analýzy sme v kôre obličky detekovali AT1 receptory (AT1R) o veľkosti približne 41 kDa (obr. 6). Následne sme ich denzitu porovnali s denzitou glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázy a výsledky porovnali. Pomocou t-testu sme preukázali výraznú tendenciu ($t = -2,439$; $df = 4$; $p = 0,071$) k nárastu počtu AT1R u potkanov s potravou obsahujúcou 2% soli oproti kontrolnej skupine. Dôvod týchto zmien nie je úplne jasný, experimentálne práce [15] naznačujú, že niektoré manipulácie s potravou matky počas gravidity spojené so vznikom hypertenzie u jej potomkov môžu byť spojené so zvýšenou expresiou AT1R.



Obr. 6: Denzita receptorov pre angiotenzín2 (AT1R) v obličke samcov potkanov kŕmených kontrolnou potravou (K) a potravou obsahujúcou 2% soli (SOL). Výsledky sú normalizované na expresiu proteínu glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázy (GAPDH). Hodnoty sú znázornené ako priemery \pm SEM pre $n = 8$

Záver

Príjem soli v potrave viacnásobne prekračuje odporúčané dávky a môže participovať na vzniku hypertenzie, pričom kritické môžu byť najmä včasné vývinové etapy. V našich experimentoch zvýšený príjem NaCl v potrave mal u exponovaných mláďat za následok vzostup TK, pričom samice odpovedali významnejším vzostupom TK. Zvýšená odpoveď TK u samíc korelovala so zvýšenou relatívnou hmotnosťou obličiek, ale nie ľavej komory srdca. Tendenciu poklesu hladín aldosterónu v plazme sme zistili u oboch pohlaví potkanov vystavených zvýšenému príjmu NaCl a vzostup denzity AT₁ receptorov u samcov exponovaných soľnej diéte. Naše výsledky ukazujú, že expozícia mláďat zvýšenému obsahu soli počas ontogenézy môže mať dlhodobé dôsledky na reguláciu TK a hypertrofiu obličiek a srdca. Absencia hypertrofiu ľavej komory srdca u samíc potkanov exponovaných NaCl v porovnaní so samcami naznačuje prítomnosť endogénnych protektívnych mechanizmov, ktorých mechanizmy budú ďalej analyzované.

PodĎakovanie

Práca bola podporená grantom VEGA 1/0686/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Verdechia P., Angeli F. (2003) *Rev. Esp. Cardiol.* 56, p. 843
- [2] World Health Organisation (2003) *J. Hypertens.* 21, p. 1983
- [3] Staessen J. A., Kuznetsova T., Stolarz K. (2003) *JAMA* 289, p. 2420
- [4] Lee D. E., Cooper R. S. (2009) *Curr. Hypertens. Rep.* 11, p. 444
- [5] Zandi-Nejad K., Luyckx V. A., Brenner B. M. (2006) *Hypertension* 47: p. 502
- [6] Barker D. J. P. (2007) *J. Intern. Med.* 261, p. 412
- [7] West-Eberhard M. J. (1989) *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 20, p. 249
- [8] Godfrey K., Barker D. J. P. (2000) *Am. J. Clin. Nutr.* 71, p. 1344
- [9] Yajnik Ch. (2006) *Nutr. Rev.* 64, p. 50
- [10] Ufnal M., Drapala A., Sikora M., Zera T. (2011) *Br. J. Nutr.* 106, p. 292
- [11] Koleganova N., Piecha G., Ritz E., Becker L. E., et al. (2011) *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 301, p. 344
- [12] Grigore D., Ojeda N. B., Alexander B. T. (2008) *Gend. Med.* 5, p. 121
- [13] Dahl L. K. (2005) *Int. J. Epidemiol.* 34, p. 967
- [14] Contreras R. J. (1993) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 264, p. 296
- [15] Sahajapal V., Ashton N. (2003) *Clin. Sci.* 104, p. 607

Nezvyčajne vysoká plodnosť v bulharských populáciách hrúzovca sieťovaného *Pseudorasbora parva* (Temminck a Schlegel, 1846)

Kristína Švolíková

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra ekológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika; kika.svolikova@gmail.com

Abstract

Populations of topmouth gudgeon are very successful in invading novel environments. It's mainly due to its overall biological flexibility and phenotypic plasticity - the ability to create different phenotypes during ontogeny from the most generalized to the most specialized extreme. To examine phenotypic plasticity are required partial researches such as investigation of reproductive parameters. In this study were examined reproductive parameters of two invasive populations of topmouth gudgeon from Bulgaria. In comparison with Slovak populations was found unusually high fecundity of both studied populations. While in one population was the fecundity probably influenced by environment properties which are unknown for us, in the second population we can say, that the fecundity of females was influenced by the presence of higher number of bigger males.

Key words: *topmouth gudgeon, fecundity, sex ratio*

Úvod a formulácia cieľa

Hrúzovec sieťovaný je ryba s obrovským inváznym potenciálom, o čom svedčí aj fakt, že za menej ako 50 rokov sa dokázal rozšíriť zo svojej pôvodnej oblasti výskytu (východná Ázia) do 32 krajín, od strednej Ázie až po severnú Afriku [1]. Jeho úspech môžeme vysvetliť oportunistickou životnou stratégiou. Ide o omnivorný druh s krátkym generačným časom, počas neresovej sezóny opakovane kladie ikry na rôzne substráty a je u neho známa rodičovská starostlivosť a teda vysoké reprodukčné úsilie [2, 3]. Navyše sa vyznačuje širokou fyziologickou toleranciou rôznych vlastností prostredia, ako je nízka hladina kyslíka, organické znečistenie a dokonca je schopný znášať aj koncentrácie pesticídov, ktoré sú pre ostatné druhy rýb letálne [4, 5].

Invázne druhy rýb, ktoré sú schopné rýchlo a bez problémov kolonizovať nové biotopy, často aj s odlišnými podmienkami, sa vyznačujú najmä fenotypovou plasticitou a celkovou biologickou flexibilitou, ktoré pramenia nielen z genetických, ale aj z epigenetických mechanizmov. Vďaka tomu, že organizmus je schopný v každej generácii tvoriť rozdielne fenotypy, viac či menej špecializované, alebo generalizované, je schopný prispôbovať sa meniacim environmentálnym podmienkam [6]. Hrúzovec sieťovaný je jedným z najúspešnejších invázných organizmov nielen vďaka vyššie spomínaným biologickým vlastnostiam, ale najmä vďaka svojej vysokej fenotypovej plasticite a teda schopnosti vytvárať počas ontogenézy rôzne fenotypy v závislosti od environmentálnych

podmienok. Touto schopnosťou vytvárať odlišné fenotypy si hrúzovec sieťovaný dokáže zabezpečiť prežitie aj v extrémne nepriaznivých podmienkach [7].

Táto štúdia bola pôvodne zameraná na testovanie hypotézy o alternatívnych ontogenezách a inváznom potenciáli sladkovodných rýb, ktorá hovorí o tom, že čím je širšie rozpätie medzi najgeneralizovanejším a najšpecializovanejším fenotypom, ktorý je druh schopný vygenerovať, tým väčší je jeho invázny potenciál [8]. Avšak pri analyzovaní výsledkov sme zistili, že skúmané populácie nie sú na testovanie hypotézy vhodné. Zistili sme však pozoruhodne vysokú plodnosť v oboch skúmaných populáciách a cieľ tejto práce bol preto preformulovaný na analyzovanie reprodukčných parametrov dvoch populácií pochádzajúcich z Bulharska a porovnanie ich plodnosti s inváznymi populáciami hrúzovca sieťovaného z územia Slovenska.

Materiál a metódy

Skúmaný materiál pochádza z Bulharska z dvoch lokalít. Prvou je výpusť z rybníka pri Kolarove (populácia A) a druhou lokalitou je rybník v Zafirove (populácia B). Skúmanú populáciu A tvorilo 617 jedincov a populáciu B 778 jedincov. Materiál bol zbieraný elektrickým agregátom v mesačných intervaloch od apríla do októbra 2011. Ryby fixované v 4 % roztoku formaldehydu boli v laboratóriu podrobené pitve, pri ktorej sa zisťovali hmotnosť tela pred a po pitve, hmotnosť gonád a pohlavie jedincov. Plodnosť rýb bola určená gravimetrickou metódou ako absolútny a relatívny počet oocytov a vypočítaný bol tiež gonadosomatický index [9]. Keďže hrúzovec sieťovaný je ryba s dávkovitým neresom, nie všetky oocyty sú v danej sezóne vyneresené. Zvyšné oocyty môžu dozrieť a byť vyneresené až v ďalšom neresovom období. Počet oocytov v ováriách teda nemusí zodpovedať počtu oocytov, ktoré vstupujú do procesu reprodukcie. Preto bola plodnosť vyhodnotená aj ako reálna absolútna plodnosť (RAP), ktorá udáva počet ikier, ktoré boli reálne v danej sezóne vyneresené [10]. Dĺžka tela (SL) bola zisťovaná z digitálnych fotografií pomocou programu IMPOR 2.31E a bol zmeraný priemer 50 náhodne zvolených ikier. Pre štatistické vyhodnotenie bol použitý Mann-Whitney U test.

Výsledky a diskusia

V populácii A bolo 212 samíc, 156 samcov a 249 juvenilov. Pomer pohlaví v tejto populácii bol 1,36:1 v prospech samíc. Dĺžka tela (SL) samíc bola v rozmedzí 20,78 až 51,16 mm (priemer 28,12 mm). Hmotnosť dosahovala hodnoty 0,13 – 3,04 g (priemer 0,44 g) a hmotnosť po pitve 0,10 – 2,23 g (priemer 0,35 g). Gonadosomatický index sa pohyboval

medzi 3,58 – 37,91 % (priemer 11,44 %) a veľkosť ikier medzi 0,04 – 1,6 mm (priemer 0,22 mm). V populácii B bolo 184 samíc, 564 samcov a 30 juvenilov. Pomer pohlaví bol 3,07:1 v prospech samcov. SL samíc dosahovala hodnoty 25,42 – 63,39 mm (priemer 36,70 mm), hmotnosť 0,24 – 3,07 g (priemer 0,95 g) a hmotnosť po pitve dosahovala hodnoty 0,18 – 2,68 g (priemer 0,77 g). Gonadosomatický index bol v rozmedzí 0,44 – 27,62 % (priemer 5,85 %) a veľkosť ikier 0,04 – 1,43 mm (priemer 0,17 mm).

Priemerná dĺžka tela pri pohlavnom dozrievaní bola u jedincov z populácie A 27,02 mm a v populácii B 39,16 mm. Najmenšia zrelá samica v populácii A dosahovala dĺžku tela 19,88 mm a v populácii B 25,42 mm.

Tab. 1. Porovnanie absolútneho počtu oocytov (ANO), relatívneho počtu oocytov (RNO) a reálnej absolútnej plodnosti (RAP) medzi skúmanými populáciami (A, B) z Bulharska so slovenskými populáciami z predchádzajúceho výskumu [7].

Lokalita	ANO			RNO			RAP		
	min	max	priemer	min	max	priemer	min	max	priemer
Kolarovo (A)	798	17393	4319	4341	43632	13717	32	4522	490
Zafirovo (B)	1650	31850	10989	2892	52613	16540	137	4060	1128
Chľaba (Slovensko)	600	5677	3000	575	7684	4146	348	3941	1811
Jakubov (Slovensko)	785	8835	3620	576	19546	4602	34	5159	1665
Čičov (Slovensko)	1338	18532	6715	1995	22655	10389	42	4011	804

V porovnaní so slovenskými populáciami hrúzovca sieťovaného, majú bulharské populácie skutočne nápadne vysokú plodnosť. Rozdiel je hlavne pri hodnotách RNO, kde je plodnosť jedincov prepočítaná k hmotnosti tela po pitve a je teda odstránená odchýlka spôsobená rozdielnou veľkosťou porovnávaných jedincov. Hodnoty RNO bulharských populácií sú vyššie aj v porovnaní s populáciou z Čičova, kde extrémne podmienky biotopu zapríčinili omnoho vyššiu produkciu oocytov, pritom populácia A pochádza z mierne narušeného a populácia B zo stabilného biotopu.

Nápadná je najmä vysoká plodnosť populácie B, ktorá pochádza zo stabilného biotopu a je dlhodobo etablovaná, napriek tomu, že práve pri dlhodobo etablovaných populáciách (zo stabilného biotopu) očakávame nižšiu plodnosť, väčšie oocyty a neskoršie pohlavné dospievanie jedincov [8]. Vysvetlenia môžu byť rôzne, nás však zaujala koincidencia vysokej plodnosti a vysokého zastúpenia samcov v tejto populácii. Je totiž známe, že samice zvyšujú plodnosť v prítomnosti veľkých samcov, pretože párenie s veľkými samcami zvyšuje šance vajčiek na prežitie [11]. Samice z populácie B mali skutočne k dispozícii väčšie samce ako samice z populácie A ($p < 0,05$), ktorých bola v populácii B prevaha (3,07:1). Z toho vyplýva, že samice z populácie B mali k dispozícii veľa veľkých samcov, ktorý sú vďaka svojej

veľkosti schopní lepšie strážiť hniezdo [12]. To je možné vysvetlenie prečo samice vytvárali väčšie množstvo oocytov.

Plodnosť bulharských populácií je niekoľkonásobne vyššia aj v porovnaní s doteraz publikovanými literárnymi údajmi, kde sú najvyššie hodnoty ANO 121 – 7124 (priemer 1106) oocytov [13, 14].

Záver

Na plodnosť skúmaných populácií z Bulharska pravdepodobne pôsobili parametre a vlastnosti prostredia, ktoré nepoznáme. Avšak pri druhej skúmanej populácii (B) sa nám ako možné vysvetlenie vysokej plodnosti samíc núka prítomnosť veľkých samcov a vplyv pomeru pohlaví posunutého výrazne v prospech samcov.

Akokoľvek, u bulharských populácií hrúzovca sieťovaného bola zistená extrémne vysoká plodnosť, aká doteraz nebola publikovaná u nijakej inej populácie a tento fakt poukazuje na mimoriadnu mieru plasticity daného druhu aj v reprodukčných parametroch, čo zvyšuje jeho invázny potenciál.

Pod'akovanie

Pod'akovať by som sa chcela môjmu školiteľovi prof. RNDr. Vladimírovi Kováčovi, RNDr. Eve Záhorskej, PhD. a za poskytnutie materiálu Mgr. Tichomírovi Stefanovovi. Práca bola podporená projektmi UK/409/2012, APVV LPP-0154-09 a VEGA 1/0641/11.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Gozlan R. E., Pinder A. C., Shelley J. (2002) *J. Fish Biol.* 61, p. 298
- [2] Katano O., Maekawa K. (1997) *Environ. Biol. Fishes* 49, p. 197
- [3] Rosecchi E., Thomas F., Catsadorakis G. (2001) *Fresh. Biol.* 46, p. 845
- [4] Pollux B. J. A., Korosi A. (2006) *J. Fish Biol.* 69, p. 1575
- [5] Allen Y., Kirby S., Copp G. H., et al. (2006) *Fish. Manage. Ecol.* 13, p. 337
- [6] Kováč V., Copp G. H., Sousa R. P. (2009) *J. Appl. Ichthyol.* 25, p. 33
- [7] Záhorská E., Švolíková K., Kováč V. (2013) *Int. Rev. Hydrobiol.* in press
- [8] Kováč V. (2010) 17th International Conference on Aquatic Invasive Species, San Diego, California, USA, 29 August -2 September 2010, p. 160
- [9] Holčík J., Hensel K. (1972) *Ichtyologická príručka. Obzor*, Bratislava, p. 220

- [10] Hôrková K. (2010) Analýza reprodukčných parametrov býčka čieroušťa *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) zo slovenského úseku Dunaja. (Diplomová práca), Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p. 58
- [11] Katano O., Maekawa K. (1997) Environ. Biol. Fishes 49, p. 197
- [12] Maekawa K., Iguchi K., Katano O. (1996) Ichthyol. Res. 43, p. 257
- [13] Záhorská E., Kováč V. (2009) J. Appl. Ichthyol. 25, p. 466
- [14] Gozlan R. E., Andreou D., Asaeda T., et al. (2010) Fish Fish 11, p. 315

Analýza fyziologickej funkcie permeázy Knq1p kvasiniek *Kluyveromyces lactis*

Alexandra Svrbická, Zuzana Balážfyová, Yveta Gbelská

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie
a virológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika,
sasenska88@gmail.com*

Abstrakt

In the presented work we studied the physiological function of the *Kluyveromyces lactis* *KNQ1* gene. *KNQ1* gene encodes a transporter protein Knq1p belonging to MFS-DHA2 transporter family. Knq1p is the first identified permease in *K. lactis*, participating in the response of *K. lactis* cells to chemical stress. Previous studies showed that the transcription of *KNQ1* gene is under the control of transcriptional factor *KTYap1p*, the main transcriptional regulator of oxidative stress response in yeast. Phenotypic analysis of the deletion mutants *K. lactis knq1Δ* confirmed the involvement of the *KNQ1* gene in the multidrug resistance phenomenon of. Similarly to its *Saccharomyces cerevisiae* homologue *ATRI*, the product of the *KNQ1* gene is involved in the transport of boron and thereby contributes to boron homeostasis regulation in *K. lactis* cells.

KLúčové slová: *K. lactis*; multidrug resistance; boron; transport, regulation

Úvod a formulácia cieľa

Bór predstavuje významný nutričný mikroprvok nachádzajúci sa v bunkách rastlín aj živočíchov, ale jeho špecifická úloha v bunkových procesoch nie je celkom jasná [1, 2, 3, 4]. V rastlinách sa bór podieľa na vytváraní priečných väzieb medzi reťazcami polysacharidu ramnogalakturonanu II v primárnej bunkovej stene a je tiež štruktúrnym komponentom cytoskeletu [3, 2, 4, 5]. Nedostatok bóru v bunkách zabraňuje normálnemu rastu rastlín a spôsobuje viacero anatomických, fyziologických a biochemických defektov [6].

Presná úloha bóru v živočíšnych bunkách rovnako nie je známa, jeho nedostatok však spôsobuje abnormality vo vývoji čriev a očí počas larválneho vývoja u *Xenopus laevis* [7]. Doterajšie experimentálne zistenia potvrdzujú, že bór je esenciálnym prvkom pre človeka ako aj pre prokaryotické organizmy napr. cyanobaktérie [8,9]. Zaujímavým faktom je skutočnosť, že cyanobaktéria *Nostoc spongiaeforme* var. *tenua* a streptomycéta *Streptomyces griseus* produkujú antibiotiká obsahujúce bór v štruktúre molekuly [10]. Morské baktérie *Vibrio harvey* produkujú molekuly obsahujúce bór, ktoré sa uplatňujú v signalizačnom mechanizme *quorum sensing* [2].

Všetky tieto fakty poukazujú na široký výskyt bóru v bunkovej biológii. Ak je však bór prítomný v nadbytku, stáva sa pre bunku toxický. Toxicita bóru spočíva v poškodzovaní metabolizmu bunky jeho väzbou na *cis*-diol-obsahujúce molekuly napr.: ATP,

NADH/NADPH a RNA [11, 2]. Nedostatok a toxicita bóru sú veľkým poľnohospodárskym problémom v celosvetovom meradle, preto objasnenie molekulárneho mechanizmu transportu bóru medzi bunkou a jej prostredím by mohlo pomôcť zmierniť tieto problémy [12,2,5].

Prvým identifikovaným génom, ktorý hrá dôležitú úlohu v zabezpečovaní tolerancie eukaryotických buniek voči bóru, bol gén *BORI* izolovaný z *Arabidopsis thaliana* [2,4].

V kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* bol identifikovaný gén *ATRI*, ktorý je homológom génu *BORI* [13,4]. Okrem tohto génu sa na transporte bóru v *S. cerevisiae* podieľajú aj transportné proteíny Dur3p a Fps1p [3]. Produktom génu *ATRI* je transportný proteín Atr1p, patriaci z rodiny transportérov MFS-DHA2 (major facilitator superfamily, drug H⁺ antiporter). Nadexpresia génu *ATRI* udeľuje bunkám *S. cerevisiae* rezistenciu voči viacerým toxickým látkam [13].

Gén *KNQ1* kóduje prvú identifikovanú permeázu biotechnologicky významných kvasiniek *Kluyveromyces lactis*, podieľajúcu sa na procesoch spojených s odpoveďou bunky na chemický stres [14]. Na základe vysokej sekvenčnej homológie génu *KNQ1* s génom *ATRI* kvasiniek *S. cerevisiae*, ako aj analýzy promótoru génu *KNQ1*, v ktorom boli identifikované dva motívy rozpoznávané transkripčným faktorom *KIYap1p*, sa predpokladal podobný mechanizmus transkripčnej kontroly génu *KNQ1*, aký bol popísaný pre gén *ATRI* kvasiniek *S. cerevisiae*.

Cieľom prezentovanej práce bolo preskúmať ako ovplyvní delécia v géne *KNQ1* špecifikujúcom permeázu Knq1p resp. delécia v géne *KIYAPI* pre transkripčný faktor *KIYap1p* susceptibilitu kvasiniek *K. lactis* voči cytotoxicky pôsobiacim látkam. Za účelom zistiť, do akej miery ovplyvňuje prítomnosť resp. neprítomnosť génu *KNQ1* toleranciu buniek voči kyseline boritej, sa sledoval rast rôznych kmeňov kvasiniek *K. lactis* v prítomnosti kyseliny boritej. Vplyv kyseliny boritej na expresiu génu *KNQ1* sa sledoval na základe merania aktivity reportérového génu špecifikujúceho β -D-glukuronidázu v in frame fúzii s promótorom génu *KNQ1*.

Materiál a metódy

V práci sa použili štandardné kmene kvasiniek *K. lactis* PM4-4B a MW 179-1D, izogénny transformant štandardného kmeňa, PM4-4B/H-H, obsahujúci gén *KNQ1* na multikópiovom plazmide a príslušné delečné mutanty *K. lactis* PM4-4B/*knq1* Δ a MW 179-1D/*yap1* Δ .

Analýza fenotypu uvedených kmeňov sa sledovala kvapkovým testom na pevných

komplexných médiách, ktoré obsahovali rôzne koncentrácie cytotoxických látok vyvolávajúcich chemický alebo oxidačný stres (4-nitrochinolín-N-oxid, benomyl, mankozeb) a rôzne koncentrácie H_3BO_3 .

Rastové krivky kvasiniek *K. lactis* sa stanovili spektrofotometricky v prítomnosti rôznych koncentrácií kyseliny boritej (0; 7,5; 10 mM). Aktivita β -D-glukuronidázy sa stanovovala v bunkových extraktoch analyzovaných kmeňov kvasiniek *K. lactis* podľa protokolu Jefferson *et al.*, 1986 [15].

Výsledky a diskusia

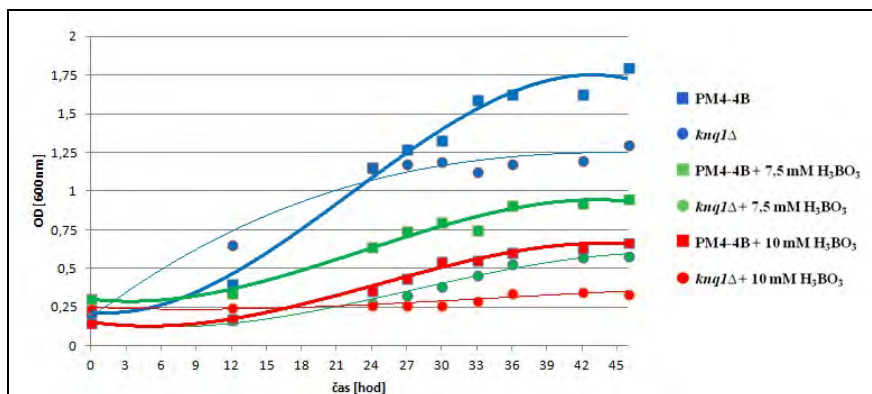
Fenotypová analýza študovaných kmeňov kvasiniek *K. lactis* ukázala, že prítomnosť génu *KNQ1* vo viacerých kópiách vedie k zvýšenej rezistencii buniek voči použitým cytotoxickým látkam (4-nitrochinolín-N-oxidu, benomylu, mankozebu, H_3BO_3), zatiaľ čo vyradenie génu *KNQ1* má za následok zvýšenie citlivosti buniek voči analyzovaným zlúčeninám. Rovnako aj delečný mutant *K. lactis yap1Δ* s prerušeným génom *KIYAPI*, kódujúci hlavný transkripčný faktor zahrnutý v odpovedi buniek na oxidačný stres, vykazuje v porovnaní so štandardným kmeňom zvýšenú citlivosť voči použitým látkam (Tab. 1). Na základe výsledkov kvapkových testov možno predpokladať, že gén *KNQ1* sa v kvasinkách *K. lactis* podieľa na kontrole chemického a zohráva úlohu v zabezpečovaní tolerancie buniek *K. lactis* voči H_3BO_3 , podobne ako jeho homológ, gén *ATRI* v kvasinkách *S. cerevisiae* a veľmi pravdepodobne je pod kontrolou transkripčného faktora *KIYap1p*.

Tab. 1 Minimálne inhibičné koncentrácie 4NQO, benomylu, mankozebu a H_3BO_3 pre analyzované kmene *K. lactis* na komplexné YPD médiách. Koncentrácie použitých testovaných látok: 4NQO (0,05; 0,075; 0,1; 0,15; 0,2; 0,3 μ g/ml), H_3BO_3 (8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15 μ g/ml), benomyl (0; 5; 10; 15; 20; 30; 50; 60; 70 μ g/ml), mankozeb (1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 10; 11; 12; 14; 15; 16; 17; 18; 20 μ g/ml)

	4NQO [μ g/ml]	H_3BO_3 [μ g/ml]	Benomyl [μ g/ml]	Mankozeb [μ g/ml]
PM4-4B	1	14	>50	12
PM4-4B/ <i>knq1Δ</i>	0,6	9	>50	>7
PM4-4B/H-H	>0,7	>13	>50	12
MW 179-1D/ <i>YAPI</i>	>0,4	>8	>40	12
MW 179-1D/ <i>yap1Δ</i>	>0,1	4	30	7

Predpokladaná účasť génu *KNQ1* v zabezpečovaní tolerancie buniek kvasiniek *K. lactis* voči H_3BO_3 sa potvrdila aj pri sledovaní rastu buniek v tekutých médiách, ktoré

obsahovali rôzne koncentrácie H_3BO_3 . S rastúcou koncentráciou H_3BO_3 bol rast kmeňov inhibovaný, pričom kmene *K. lactis*, ktoré mali prerušený gén *KNQ1* rástli výrazne pomalšie a dosahovali znížené rastové výťažky v porovnaní s izogénnym štandardným kmeňom (Obr. 1).

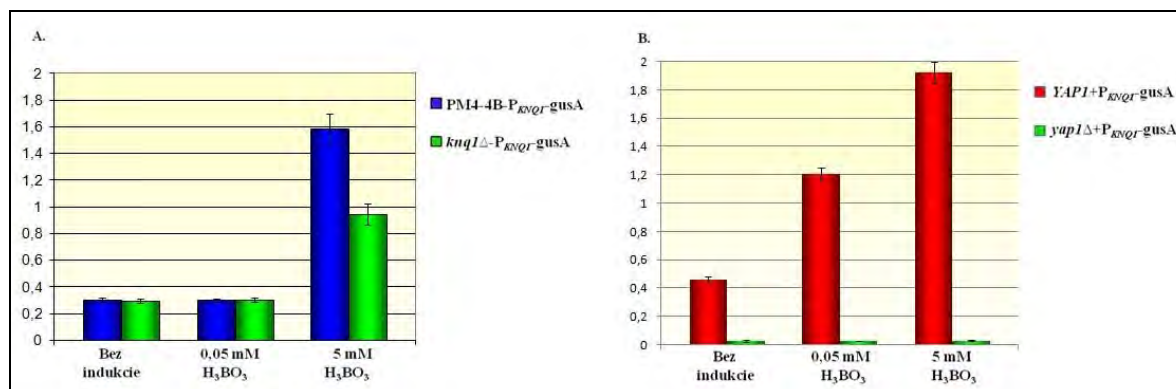


Obr. 1 Rastová krivka kvasiniek *K. lactis*. Rast buniek sa sledoval v komplexnom médiu s rôznou koncentráciou kyseliny boritej (7,5 mM; 10 mM).

Špecifickú aktivitu β -D-glukuronidázy v bunkových extraktoch pripravených z analyzovaných kmeňov kvasiniek *K. lactis* demonštruje Obr. 2. Zo získaných výsledkov vyplýva, že za neindukovaných podmienok je hladina β -D-glukuronidázy v štandardnom kmeni MW 179-1D/*YAPI*, ktorý obsahuje fúzny konštrukt P_{KNQ1} -gusA na multikópiovom plazmide, vyššia v porovnaní s delečným mutantom MW 179-1D/*yap1*Δ+ P_{KNQ1} -gusA. V prítomnosti kyseliny boritej dochádza k indukcii expresie génu *KNQ1* v bunkách štandardného kmeňa MW 179-1D/*YAPI*+ P_{KNQ1} -gusA na rozdiel od delečného mutantu MW 179-1D/*yap1*Δ+ P_{KNQ1} -gusA, čo sa prejaví dvojnásobným zvýšením aktivity produktu reportérového génu β -D-glukuronidázy (Obr. 2B). tieto zistenia jednoznačne demonštrujú transkripčnú kontrolu génu *KNQ1* transkripčným faktorom *KIYap1p*.

Aktivita β -D-glukuronidázy sa stanovila aj v štandardnom kmeni *K. lactis* PM4-4B a izogénnom delečnom mutantovi *K. lactis* PM4-4B/*knq1*Δ, ktoré niesli fúzny konštrukt P_{KNQ1} -gusA na multikópiovom plazmide. Z Obr. 2A vyplýva, že za neindukovaných podmienok sa medzi štandardným kmeňom *K. lactis* PM4-4B+ P_{KNQ1} -gusA a izogénnym delečným mutantom PM4-4B/*knq1*Δ+ P_{KNQ1} -gusA nepozorovali výraznejšie rozdiely v aktivite β -D-glukuronidázy. V indukovaných podmienkach, v prítomnosti kyseliny boritej, bola pozorovaná zvýšená aktivita β -D-glukuronidázy v štandardnom kmeni PM4-4B/*knq1*Δ+ P_{KNQ1} -gusA na rozdiel od mutantného kmeňa, čo naznačuje účasť produktu génu *KNQ1*

v transporte bóru v kvasinkách *K. lactis*.



Obr. 2 Špecifická aktivita β -D-glukuronidázy.

- A. kmene PM4-4B+P_{KNQI}+gusA a *knq1* Δ +P_{KNQI}+gusA kvasiniek *K. lactis*
 B. kmene *YAPI*+P_{KNQI}+gusA a *yap1* Δ +P_{KNQI}+gusA kvasiniek *K. lactis*

Záver

Zo získaných výsledkov vyplýva, že gén *KNQ1*, ktorý špecifikuje permeázu z rodiny MFS-DHA2 transportných proteínov, je zahrnutý v kontrole buniek kvasiniek *K. lactis* voči rôznym cytotoxicky pôsobiacim zlúčeninám. Zároveň sa produkt génu *KNQ1* podieľa na transporte bóru z buniek kvasiniek *K. lactis* a je pod transkripčnou kontrolou transkripčného faktora *KlYap1p*.

Pod'akovanie

Práca vznikla s finančnou podporou projektov APVV-0282-10, VEGA 1/0867/12, GUK/115/2.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Park M., Li Q., Scheynikov N. et al. (2005) *Cell cycle*. 4(1), p. 24
- [2] Takano J., Miwa K., Fujiwara T. (2008) *Trends in Plant Science*. 13(8), p. 451
- [3] Nozawa A., Takano J., Kobayashi M. et al. (2006) *FEMS Microbiology Letters*. 262(2), p. 216
- [4] Kaya A., Karakaya H.C., Fomenko D.E. et al. (2009) *Molecular and Cellular Biology*. 29(13), p. 3665
- [5] Miwa K., Fujiwara T. (2010) *Annals of Botany*. 105(7), p. 1103
- [6] Brown P.H., Bellaloui N., Wimmer M.A. et al. (2002) *Plant Biol*. 4, p. 205
- [7] Park M., Li Q., Scheynikov N. et al., (2004) *Molecular Cell*. 16(3), p. 331

- [8] Nielsen F.H. (2008) *Nutrition Reviews*. 66(4), p. 183
- [9] Dordas C., Brown P.H. (2000) *The Journal of Membrane Biology*. 175(2), p. 95
- [10] Dembitsky V., Rezanka T. (2005) *Folia Microbiologica*. 50(5), p. 363
- [11] Hayes J.E., Reid R.J. (2004) *Plant Physiology*. 136(2), p. 3376
- [12] Sutton T., Baumann U., Hayes J. et al. (2007) *Science*. 318(5855), p. 1446
- [13] Larochelle M., Drouin S., Robert F. et al. (2006) *Mol. Cell. Biol.* 26(17), p. 6690
- [14] Marchi E., Lodi T., Donniny C. (2007) *FEMS Yeast. Res.* 7(5), p. 715
- [15] Jefferson R.A., Burgess S.M., Hirsh D. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86(22), p.8447

Molekulárna evolúcia hantavírusov v strednej Európe

Róbert Szabó^{1,2}, Boris Klempa^{2,3}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;

robertszabo003@gmail.com

²Slovenská akadémia vied, Virologický ústav, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava, Slovensko

³Charité University Hospital, Institute of Virology, Helmut-Ruska-Haus, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany

Abstrakt

Hantaviruses belong to the family *Bunyaviridae*. They are zoonotic viruses hosted by small mammals and transmitted by their aerosolized excreta. Hantaviruses are causative agents of two diseases in humans, hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) and hantavirus cardiopulmonary syndrome (HCPS). Recent findings of the shrew-borne hantaviruses suggest that these hantaviruses may have the same importance as the rodent-borne hantaviruses. Our aim of the study was to detect and identify hantaviruses in Central Europe and analyze their molecular evolution. We have analyzed 122 tissue samples of various host species from Slovakia and Czech Republic by nested RT-PCR. We confirmed the presence of Seewis virus (SWSV) in *S. araneus* shrews captured in both countries and found SWSV also in additional hosts (*Crocidura suaveolens* and *Sorex minutus*). In addition, we determined complete S segment nucleotide sequences for two strains of Puumala virus (PUUV) previously detected in Czech Republic. Obtained data might be helpful in development of immunoprophylactic and diagnostic strategies.

KLúčové slová: *Hantavírus; Hantavírus Puumala, Hantavírus Tula, Hantavírus Seewis; HFRS; spillover*

Úvod a formulácia cieľa

Vírusy rodu *Hantavirus* patria do čeľade *Bunyaviridae*. Sú asociované so svojimi prirodzenými rezervoárovými hosťiteľmi z radu hlodavcov (*Rodentia*) a ako ukázali nedávne štúdie, tak aj z radu hmyzožravcov (*Insectivora*) [1]. Človeka infikujú cez aerosolizované exkrementy týchto drobných cicavcov. U prirodzených hosťiteľov je priebeh infekcie inaparentný. U človeka vyvolávajú hantavírusy dve základné klinické manifestácie, hemoragickú horúčku s renálnym syndrómom - HFRS (z anglického „Hemorrhagic fever with renal syndrome“) a hantavírusový kardiopulmonárny syndróm – HCPS (z anglického „Hantavirus cardiopulmonary syndrome“). HFRS dominuje v Európe a Ázii, pričom HCPS je viac charakteristický pre hantavírusy Nového sveta. V Európe je tiež hantavírusové ochorenie známe ako *Nephropathia epidemica*, ktoré je považované za miernu formu HFRS a je vyvolávané vírusom Puumala (PUUV) [2,3].

Hantavírusy sú RNA vírusy, ktorých virióny tvoria obalené, sférické/pleomorfné/ovoidné častice o veľkosti 80-120 nm. Nukleokapsid má helikálnu symetriu s filamentóznou štruktúrou. Glykoproteínové hroty (G1, G2) vyčnievajú z obalu

10nm. Jadro viriónu obsahuje vírusovú RNA (vRNA) negatívnej polarity, ktorá je rozdelená do troch segmentov: S, M a L. Každý z týchto segmentov je asociovaný s RNA-závislou RNA-polymerázou, ktorá je kódovaná L-segmentom a je kompletne enkapsidovaný pomocou proteínu N, kódovaným S-segmentom. M segment kóduje glykoproteínový prekursor (GPC) [3,4,5].

Hantavírusy v strednej Európe

Na území strednej Európy bolo doteraz izolovaných a diagnostikovaných 5 druhov hantavírusov: vírus Puumala (PUUV) izolovaný z prirodzeného hostiteľa, Hrdziaka lesného (*Myodes glareolus*), vírus Tula (TULV) z Hraboša poľného (*Microtus arvalis*), vírus Nova (NVAV) z Krta obyčajného (*Talpa europaea*), vírus Seewis (SWSV) z Piskora obyčajného (*Sorex araneus*) a dve línie vírusu Dobrava-Belgrade (DOBV-Af a DOBV-Aa) z prirodzených hostiteľov, Ryšavky žltohrdlej (*Apodemus flavicollis*) a Ryšavky tmavopásej (*Apodemus agrarius*). Ľudskými patogénmi sú PUUV a DOBV [6]. Ojedinelé prípady klinických TULV infekcií boli tiež zaznamenané [7]. U ostatných vírusov patogenita nebola doposiaľ preukázaná.

Základným cieľom našej práce bol skríning vzoriek tkanív živočíchov z radov *Rodentia* a *Insectivora* z oblastí strednej Európy na prítomnosť hantavírusov pomocou molekulárno-biologických metód, následné získanie nových nukleotidových sekvencií zo vzoriek pozitívnych na hantavírusy. Ďalej sme identifikovali detegované hantavírusy zo získaných sekvencií a verifikovali ich identitu metódami *in silico*. Jedným z dôležitých cieľov bolo aj získanie kompletnej sekvencie S segmentu genómu PUUV z dvoch pozitívnych vzoriek *Myodes glareolus* [8]. Posledným cieľom bola fylogenetická analýza nových kmeňov hantavírusov v strednej Európe.

Materiál a metódy

Extrakcia RNA, reverzná transkripcia RNA

RNA sme extrahovali z 15 – 30mg tkaniva (pečeň, obličky, pľúca,) prostredníctvom kitu QuickGene RNA tissue kit S II (FUJIFILM, Tokio, Japan) a extrakčného prístroja QuickGene-mini80 (FUJIFILM, Tokio, Japan). Reverznú transkripciu RNA sme uskutočnili prostredníctvom kitu M-MLV Reverse Transkriptase (INVITROGEN, Carlsbad, CA, USA).

RT-PCR a purifikácia DNA

Pomocou metódy nested PCR so sadou degenerovaných primerov určených pre amplifikáciu konzervatívnej časti L segmentu sme realizovali základný skríning vzoriek tkanív na prítomnosť hantavírusov [9]. Produktom prvej PCR je fragment o veľkosti 451bp

a produktom nested PCR je fragment o veľkosti 389bp. Pre získanie ďalších sekvencií, predovšetkým z S segmentu sme navrhli niekoľko ďalších nested PCR a semi-nested PCR. Výsledky PCR sme vyhodnotili pomocou horizontálnej elektroforézy. Získané produkty sme purifikovali buď priamo z PCR pomocou kitu GeneJET™ PCR Purification Kit (Fermentas, St. Leon Rot, Germany) alebo extrakciou z agarózového gélu pomocou kitu GeneJET™ Gel Extraction Kit (Fermentas, St. Leon Rot, Germany). Na sekvenovanie purifikovanej DNA sme využili služby komerčnej firmy Ecoli s.r.o.

Editácia sekvencií, komparácia a fylogenetická analýza

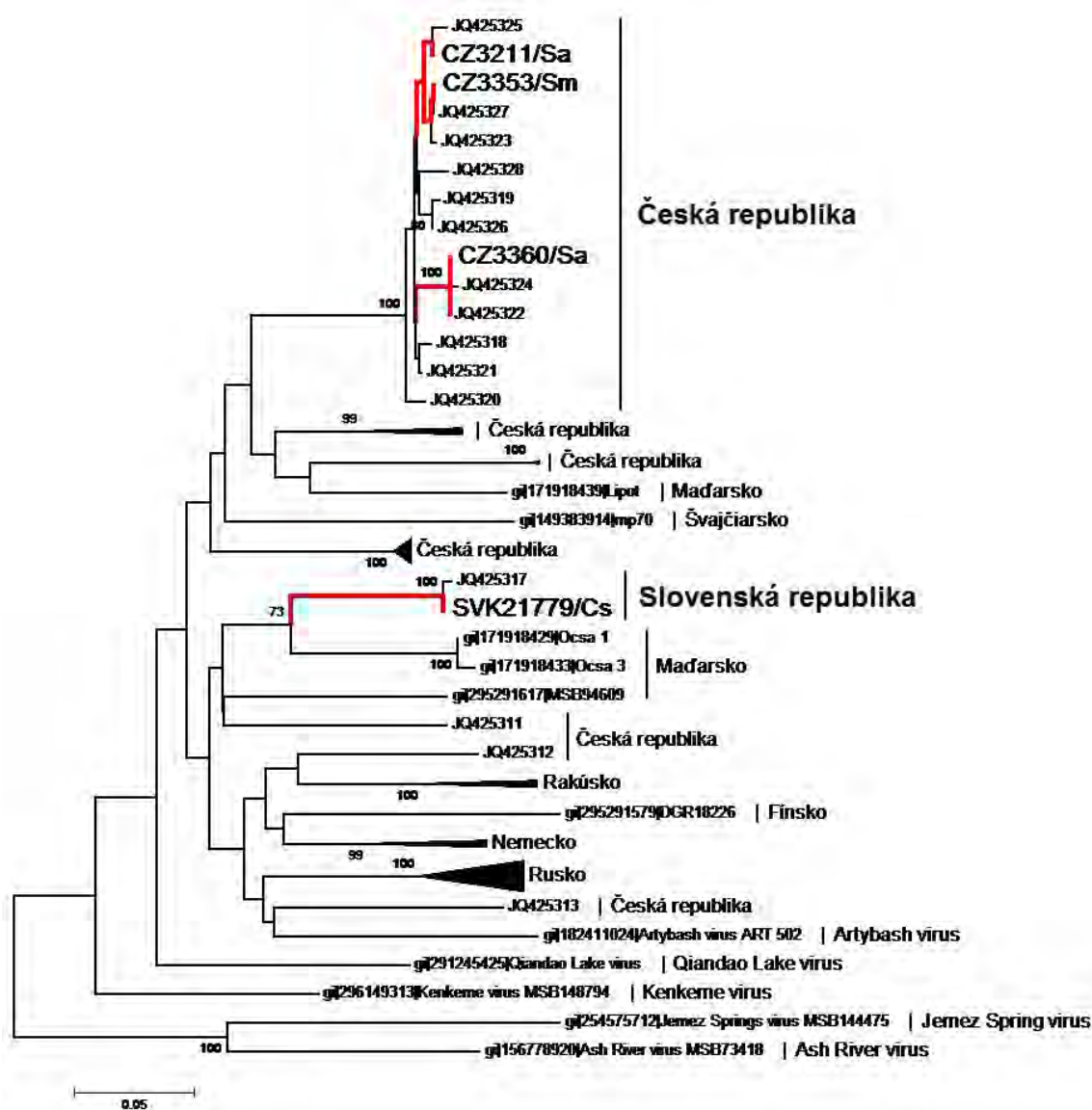
Parciálne sekvencie sme editovali pomocou programu SEQMAN, ktorý je súčasťou Lasergene software (DNASTAR, Madison, USA). V programe BioEdit [10] sme vytvorili alignment zo získaných konsenzus sekvencií spolu s dostupnými referenčnými sekvenciami. Fylogenetickú analýzu sme realizovali pomocou programu MEGA5 [11] metódou Neighbour-joining. Fylogramy sme vytvorili metódou Maximum Composite Likelihood, pomocou ktorej sme zistili jednotlivé evolučné vzdialenosti medzi subjektmi. Štatistickú presnosť získanej topológie sme verifikovali metódou bootstrap s počtom opakovaní 500.

Výsledky a diskusia

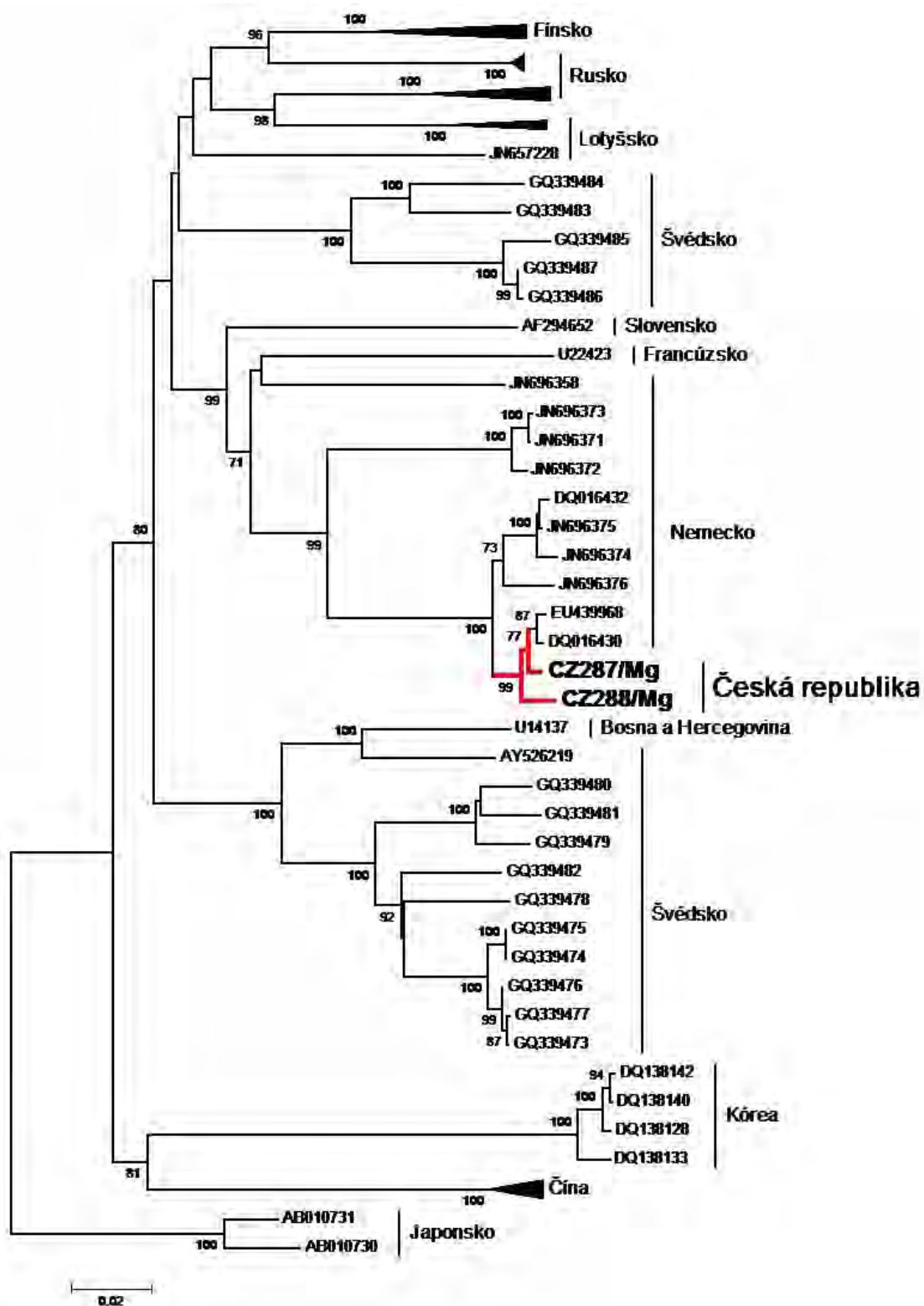
Prostredníctvom RT-PCR sme podrobili skríningu 122 vzoriek tkanív z 10 druhov hostiteľov (tab.1), pričom zo Slovenska pochádzalo 63 a z Českej republiky 59. Vzorky pochádzajú z oblasti Moravy a z oblasti východného Slovenska. Detegovali sme a identifikovali 7 pozitívnych vzoriek na základe parciálnych nukleotidových sekvencií L segmentu hantavírusového genómu, ktoré sme získali pomocou RT-PCR [9]. Zo Slovenska pochádzala jedna pozitívna vzorka SWSV z Bieložúbky krpatej (*Crocidura suaveolens*), čo potvrdzuje že SWSV je schopný okrem primárneho rezervoárového hostiteľa *S. araneus* príležitostne infikovať aj iné druhy hmyzožravcov (tzv. spillover infekcie) [12]. Z moravskej oblasti sme potvrdili štyri prípady SWSV u *Sorex araneus* a jeden prípad SWSV u Piskora malého (*Sorex minutus*), čo je ďalšia spillover infekcia u tohto vírusu (obr.1). Jedna vzorka z Hraboša močiarného (*Microtus agrestis*), bola pozitívna na TULV. Prítomnosť TULV u tohto druhu hostiteľa je prirodzená [7]. Dôležitým výsledkom našej práce je získanie dvoch kompletných sekvencií S segmentu PUUV, z *Myodes glareolus*, z pozitívnych vzoriek pochádzajúcich z Českej republiky (obr.2). Kompletné nukleotidové sekvencie S segmentu sme získali niekoľkými nested a semi-nested RT-PCR.

Tab. 1 Druhové zastúpenie, počet vyšetrených jedincov a počet pozitívnych jedincov

Druh	n vyšetrených	n pozitívnych	Druh	n vyšetrených	n pozitívnych
<i>Apodemus agrarius</i>	14	0	<i>Microtus arvalis</i>	1	0
<i>Apodemus flavicollis</i>	8	0	<i>Microtus minutus</i>	3	0
<i>Crocidura leucodon</i>	8	0	<i>Neomys fodiens</i>	4	0
<i>Crocidura suaveolens</i>	11	1	<i>Sorex araneus</i>	59	4
<i>Microtus agrestis</i>	13	1	<i>Sorex minutus</i>	1	1
			SPOLU	122	7



Obr. 1 Fylogenetická analýza SWSV nukleotidových sekvencií pomocou metód Neighbour-Joining a Maximum Composite Likelihood. Pre túto analýzu sme použili 324bp z L segmentu. Čísla na vetvách fylogramu sú bootstrap hodnoty vygenerované z 500 replikácií. Vzorky CZ3358/Sa, CZ3360/Sa a CZ3363/Sa obsahujú identické nukleotidové sekvencie.



Obr. 2 Fylogenetická analýza PUUV nukleotidových sekvencií pomocou metód Neighbour-Joining a Maximum Composite Likelihood. Pre túto analýzu sme použili kompletný otvorený čítací rámec S segmentu o veľkosti 1299bp. Čísla na vetvách fylogramu sú bootstrap hodnoty vygenerované z 500 replikácií.

Záver

Naša práca obsahuje výsledky skríningu a fylogenetickú analýzu nukleotidových sekvencií hantavírusov stredoeurópskej oblasti. Pomocou skrínigovej RT-PCR sme detegovali a identifikovali celkovo 7 nových pozitívnych vzoriek. Získané kompletne sekvencie S segmentu PUUV sú cenným prínosom do databáz a pre ďalšie výskumy hantavírusov. Ukázalo sa, že naše analyzované vzorky PUUV, pochádzajúce zo Šumavy, sú evolučne najviac príbuzné s PUUV z Bavorského lesa. Objavením SWSV vo vzorkách *Sorex minutus* a *Crocidura suaveolens* sme demonštrovali, že SWSV je schopný príležitostne infikovať aj iné druhy hmyzožravcov. Identifikovali sme dve samostatné evolučné línie SWSV. Z geografického hľadiska sa jedna vyvíja v Západopanónskej panve, druhá vo Východopanónskej panve, do ktorej patrí aj východ Slovenska. Detekciou TULV u *Microtus agrestis* sme potvrdili doterajšie štúdie [7]. Naše výsledky môžu byť v budúcnosti využité pri vývoji hantavírusových vakcín a pri zdokonalení diagnostických metód.

Pod'akovanie

Projekt bol realizovaný za podpory APVV-0267-10. Osobitné poďakovanie za prínos do problematiky si zaslúžia Mathias Schlegel, Michal Stanko, Milan Pejčoch, Lukáš Radosa, Marta Heroldová a kolektív, ktorí nám zabezpečili vzorky pre výskum.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Klempa B. (2009) Clin. Microbiol. Infect., p. 6
- [2] Ettinger J., Hofmann J., Enders M. et. al. (2012) Emerg. Infect. Dis. 18(9), p. 1461
- [3] Krüger D. H., Ulrich, R., Lundkvist, Å. (2001) Microbes Infect 3, p. 1129
- [4] Schmaljohn C. S., Nichol, S. T. (2007) Fields Virology 2(5), p. 1741
- [5] Khaiboullina S. F., Morzunov S. P., St. Jeor S. C. (2005) Curr. Mol. Med. 5, p. 773
- [6] Krüger D.H., Schnrich G., Klempa B. (2011) Human Vaccines 7:6, p. 1
- [7] Klempa B., Meisel H., Ráth S., et. al. (2003) J. Clin. Microbiol. 41(10), p. 4894
- [8] Radosa L. (2010) Identifikácia a fylogenetická analýza nových kmeňov hantavírusov z oblasti strednej Európy (Diplomová práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, p. 13
- [9] Klempa B., Fichet-Calvet E., Lecompte E., et al. (2006) Emerg. Infect. Dis. 12(5), p.838
- [10] Hall T. A. (1999) Nucl Acids Symp Ser, 41, p. 95
- [11] Takamura K., Peterson D., Peterson N., et. al. (2011) Mol. Biol. Evol. 28(10), p. 2731
- [12] Schlegel M., Radosa L., Rosenfield U.M., et. al. (2012) Virus Genes 45(1), p. 48

Cielené rozpoznávanie adhezínu baktérie *Helicobacter pylori* bakteriálnymi inklúznymi telieskami konjugovanými so sialylovaným proteínom

Klaudia Talafová^{1,2}, Eva Hrabárová^{1,2}, Dušan Chorvát³, Jozef Nahálka^{1,2}

¹*Slovenská akadémia vied, Chemický ústav, Oddelenie enzymológie sacharidov, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika; klaudia.talafova@savba.sk*

²*Slovenská akadémia vied, Chemický ústav, Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika*

³*Medzinárodné laserové centrum, Oddelenie biofotoniky, Ilkovičova 3, Mlynská dolina, 81219 Bratislava, Slovenská republika*

Abstrakt

Adhesins of pathogens play a crucial role in host glycan recognition and adherence as well as in determination of pathogen tissue preferences. In current biomedicine, glyco-nanomaterials are considered to be novel potential tools for antimicrobial therapy. We demonstrate that our tailored inclusion bodies are able to specifically bind pathogen adhesins and potentially they can provide a therapeutic protein delivery. Tailored inclusion bodies are composed of indicator protein aggregated to form inclusion bodies conjugated with sialylated protein fetuin *via* glutaraldehyde. Sialic acids on the fetuin molecule are responsible for specific recognition of pathogen *Helicobacter pylori*. For our study, we selected SabA adhesin originated from *H. pylori* that bind host cell sialic acids. Results showed that our tailored inclusion bodies specifically recognize SabA adhesins bound on the erythrocyte surfaces. This suggests that precisely designed inclusion bodies could be promising “nanopills” for biomedical application.

Kľúčové slová: inklúzne telieska; cielenie patogéna; antimikrobiálna terapia; biomedicína

Úvod a formulácia cieľa

Interakcie hostiteľa s patogénom sú sprostredkované predovšetkým oligosacharidovými reťazcami na povrchu hostiteľských buniek, ktoré sú rozpoznávané adhezínmi na povrchu buniek patogéna. Adhezíny majú teda veľký význam pri adherencii, ktorá je prvým krokom pri kolonizácii a invázii patogéna [1]. Dobre preštudované sú adhezíny baktérie *Helicobacter pylori*, ktorá sa podieľa na vzniku peptických vredov a niektorých nádorových ochorení tráviacej sústavy. Doposiaľ bolo u nej identifikovaných šesť štruktúr, ktoré majú pravdepodobne funkciu adhezínov. Pri kolonizácii sú najvýznamnejšie BabA a SabA. Adhezín SabA viažuci sialové kyseliny na bunkách hostiteľa [2] bol vybraný ako modelový adhezín pre našu štúdiu.

V súčasnosti sa čoraz častejšie upriamuje pozornosť na výskum špecifických glyko-nanomateriálov, ktoré by umožňovali cielenie terapeutika priamo na patogéna alebo nádorovú bunku [3,4]. Inklúzne telieska (IB) majú veľký potenciál využitia na tieto účely vďaka ich biologickému pôvodu, mechanickej stabilite a nožnej regulácii rozmerov [5]. Hoci boli IB v minulosti považované za odpadové produkty tvorené biologicky neaktívnymi proteínmi,

súčasné poznatky poukazujú na zachovanú aktivitu [6] aj na ich možné využitie v biomedicíne na dopravenie terapeutických proteínov. Viaceré štúdie totiž potvrdili, že rôzne proteíny agregované do formy IB sú schopné obnoviť príslušnú chýbajúcu funkciu v bunke [7,8].

Cieľom prezentovanej práce je ukázať, že vhodne konjugované častice pozostávajúce z IB a rozpustného proteínu dokážu špecificky rozpoznať adhezíny naviazané na bunkách a majú potenciál prenášať proteín, čiže by sa mohli stať účinnými nástrojmi pre biomedicínu.

Materiál a metódy

Na produkciu IB lektínu SabA (sabIB) a hemaglutináciu týmito IB bol použitý postup podľa Nahálka et al. (2009) [9]. sabIB boli izolované z kmeňa *Escherichia coli* BL21(DE3), ktoré boli transformované plazmidovým vektorom pET-34b(+). Inzert nesený týmto vektorom predstavoval časť génu HP0662, ktorý bol vložený tak, aby N-koniec výsledného proteínu bol fúzovaný s doménou viažucou celulózu z baktérie *Clostridium cellulovorans* (CBD_{clos}), ktorá iniciuje fyziologické agregovanie proteínu a tvorbu IB. Gén HP0662 bol získaný z genómovej DNA kmeňa *Helicobacter pylori* ATCC 700824D. Transformované bunky *E. coli* boli kultivované v LB médiu (10 g/l trypton, 5 g/l kvasničný autolyzát, 10 g/l NaCl) s pridaným kanamycínom (30 µg/ml). Po kultivácii boli bunky lyofilizované. Na izoláciu bolo použitých 10 mg lyofilizovaných buniek, ktoré boli lyzované pridaním 500 µl neiónového lytického detergentu. Lyzát bol následne centrifugovaný pri 13000 g, 10 min., 4°C, premytý trikrát s Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) a nakoniec rozsuspendovaný v 1 ml PBS (0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,115% Na₂HPO₄·7H₂O, 0,02% KH₂PO₄, pH 7,2). Podobne bol pripravený aj konštrukt gfpIB predstavujúci indikátorový proteín GFP (green fluorescent protein) vo forme IB.

Na prípravu konjugátov gfpIB s fetuínom (F), resp. kontrolným nesialylovaným proteínom (albumínom-A, asialofetuínom-AF) sa použil glutaraldehyd (0,25%). Na inaktiváciu nezreagovaného glutaraldehydu bol použitý glycín, resp. lyzín. Na optimalizáciu reakcie a testovanie konjugátov bola použitá hemaglutinačno-inhibičná metóda [10]. Pôvodná suspenzia sabIB bola nariadená v pomere 1:16 a z nej bola pripravená séria 1,5- alebo 1,2-násobných riedení. K 15 µl jednotlivých riedení IB boli pridané 1,5-násobné riedenia suspenzie konjugovaných gfpIB-F, gfpIB-A alebo gfpIB-AF v objeme 10 µl. Následne bolo pridaných 50 µl suspenzie erytrocytov (50 µl krvi v 5 ml PBS). Kontrolu predstavovala krv v PBS, krv so sabIB a tiež krv so sabIB a nekonjugovanými gfpIB. Platnička bola inkubovaná 1 hodinu pri laboratórnej teplote a 3 hodiny pri 4°C. Následne bola z elektronického záznamu

porovnaná zóna pozitívnej hemaglutinácie pri jednotlivých riedeniach a kontrolách.

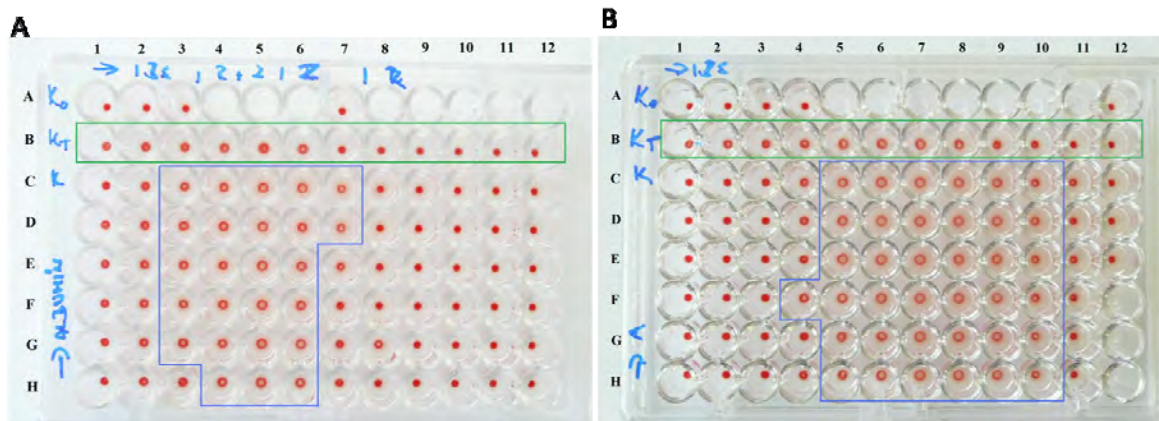
Na *in vitro* model cieleného rozpoznávania adhezínov bola zmiešaná suspenzia erytrocytov so sabIB a po sedimentácii bola zmes dvakrát premytá s PBS. Potom sa pridali konjugáty gfpIB-F, resp. gfpIB-AF a po sedimentácii bola zmes dvakrát premytá s PBS. Nakoniec bola zmes rozsuspendovaná v PBS a pozorovaná fluorescenčným konfokálnym mikroskopom. Pomer jednotlivých zložiek bol zvolený na základe výsledkov testovania konjugátov hemaglutinačno-inhibičnou metódou.

Výsledky a diskusia

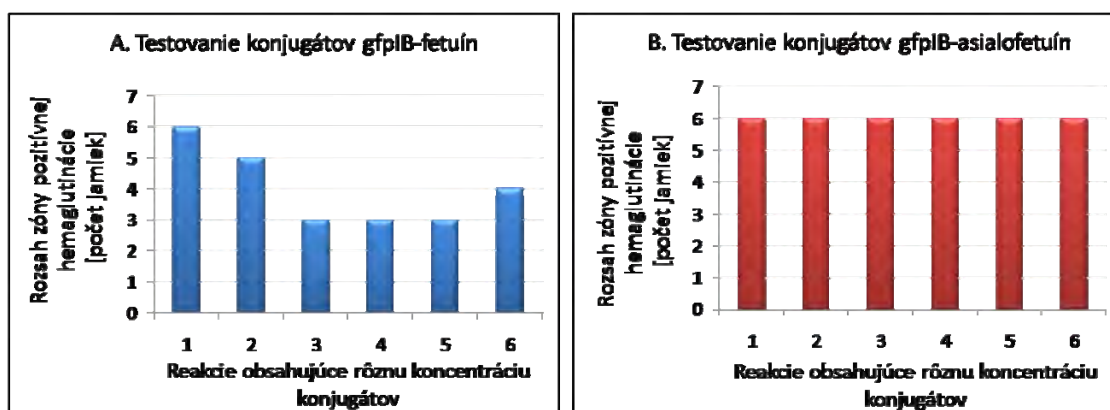
Adhezín SabA a GFP použité v našich experimentoch boli na N-konci pripojené k doméne CBD_{clos}, čo vyvolalo fyziologickú agregáciu proteínov do formy IB, avšak ich aktivita zostala zachovaná. GFP slúži ako indikátorový proteín, ktorý môže byť potenciálne nahradený akýmkoľvek proteínom vrátane terapeutického. Rozpustný proteín fetuín je zodpovedný za špecifické rozpoznanie modelového adhezínu SabA.

Na konjugáciu gfpIB s rozpustným proteínom bol použitý glutaraldehyd, pričom na optimalizáciu tejto reakcie bol zvolený sialylovaný proteín fetuín a nesialylovaný proteín albumín ako kontrola. Účinnosť reakcie bola vyhodnotená hemaglutinačno-inhibičným testom pomocou adhezínu SabA, ktorý je zodpovedný za hemaglutináciu erytrocytov v dôsledku väzby na ich sialové kyseliny [2]. Úroveň hemaglutinácie je ovplyvnená pridaním sialylovaných komponentov do reakcie, zatiaľ čo nesialylované zložky nemajú významný vplyv na túto interakciu [10]. Použitím glycinu na elimináciu nezreagovaného glutaraldehydu však dochádzalo k ovplyvneniu hemaglutinácie aj pridaním gfpIB-A. Výsledky hemaglutinácie v kontrole obsahujúcej erytrocyty, sabIB a nekonjugované gfpIB však naznačili, že tieto zmeny sú spôsobené hydrofóbnymi interakciami medzi sabIB a gfpIB. Tieto nežiaduce hydrofóbne interakcie boli úspešne eliminované nahradením glycinu za hydrofilnú aminokyselinu lyzín v procese inaktivácie nezreagovaného glutaraldehydu (Obr. 1).

Po úspešnej optimalizácii boli pripravené konjugáty gfpIB s fetuínom a ako kontrola s jeho nesialylovaným variantom asialofetuínom. Hemaglutinačno-inhibičné testy ukázali správnosť reakcie, keďže v porovnaní s kontrolou došlo pri gfpIB-F k zmenám v rozsahu zóny pozitívnej hemaglutinácie v závislosti od koncentrácie konjugátov, kým pri gfpIB-AF bol pri všetkých koncentráciách jej rozsah zhodný s kontrolou (Obr. 2). Uvedené výsledky potvrdili, že táto interakcia je špecifická, závislá od obsahu sialových kyselín.



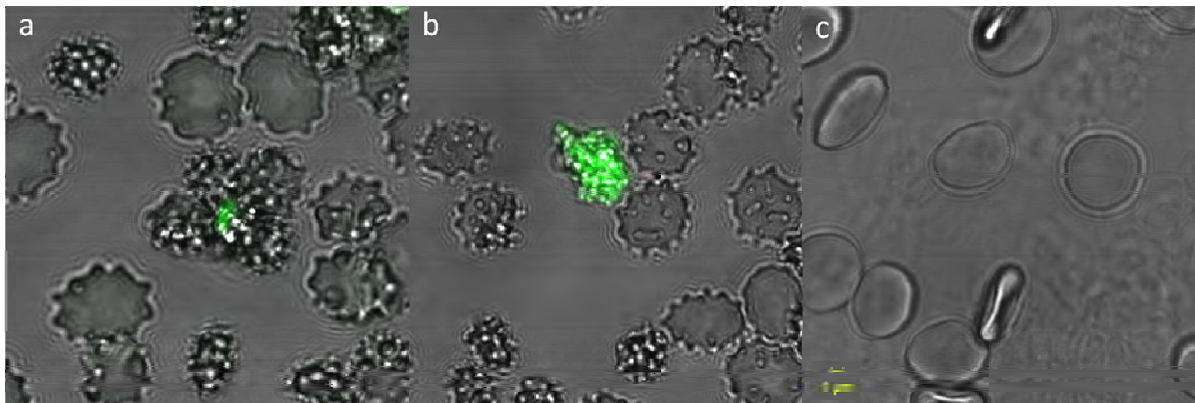
Obr. 1 Konjugáty gfpIB s albumínom (gfpIB-A) po použití (A) glycínu a (B) lyzínu na elimináciu nezreagovaného glutaraldehydu. Zelený rám-kontrola erytrocyty, sabIB a nekonjugované gfpIB; modrý rám-zóna pozitívnej hemaglutinácie. Riadok A-kontrola negatívnej hemaglutinácie (erytrocyty v PBS); C-kontrola erytrocyty a sabIB; H-G-riedenie gfpIB-A; stĺpce 1-12-riedenie sabIB.



Obr. 2 Testovanie konjugátov (A) gfpIB-fetuín a (B) gfpIB-asialofetuín porovnaním rozsahu zóny pozitívnej hemaglutinácie pri rôznych koncentráciách konjugátov a kontroly. 1-kontrola (erytrocyty a sabIB); 2-6- interakcia sabIB s erytrocytmi a konjugátmi; koncentrácia konjugátov klesá od 2 po 6.

Nakoniec bol pripravený samotný *in vitro* model rozpoznávania adhezínu SabA konjugovanými časticami. Adhezín SabA agregovaný vo forme IB je náhradou bakteriálnych buniek, keďže obsahuje na povrchu viacero väzbových domén pre sialové kyseliny. Pozorovania fluorescenčným konfokálnym mikroskopom ukázali, že sabIB naviazaný na sialových kyselinách na povrchu erytrocytov, mimikujúci patogéna adherovaného na bunkách hostiteľa, je špecificky rozpoznávaný časticami gfpIB-F. To sa prejavilo zhluknutím erytrocytov s naviazaným sabIB okolo fluoreskujúceho agregátu gfpIB-F (Obr. 3a). V kontrolnej reakcii obsahujúcej konjugáty gfpIB-AF boli erytrocyty s naviazaným sabIB iba náhodne rozmiestnené okolo agregátu bez zjavnej interakcie medzi nimi (Obr. 3b). Zmeny v morfológii erytrocytov sú pravdepodobne spôsobené naviazaním častíc sabIB na sialové kyseliny, keďže erytrocyty sú citlivé na vonkajšie podmienky a zmeny v ich morfológii môžu

byť indukované rôznymi faktormi [11].



Obr. 3 Mikroskopické pozorovanie interakcie adhezínu SabA vo forme IB naviazaného na povrchu erythrocytov s agregátmi konjugátov (a) gfpIB-fetuín a (b) gfpIB-asialofetuín; (c) kontrola (erythrocyty v PBS).

Nahradením indikátorového proteínu GFP terapeutickým proteínom a pridaním účinného štiepiaceho modulu medzi samotný proteín a CBD_{clos} (napr. proteáza, inteín) [12,13] do konštruktú by mohli byť takéto častice schopné nielen špecificky rozpoznať patogéna, ale aj prenášať a uvoľniť liečivo.

Záver

Uvedené výsledky naznačujú, že správne skonštruované IB konjugované so sialylovaným rozpustným proteínom dokážu špecificky rozpoznať adhezín SabA patogéna *H. pylori* naviazaného na hostiteľskej bunke. Pre medicínske využitie by bolo možné pripraviť častice obsahujúce liečivo vo forme IB konjugované s proteínom zodpovedným za špecifické rozpoznanie patogéna. Štiepiaci modul, ktorý by bol súčasťou IB, by následne umožnil uvoľnenie liečiva. Neustále sa rozširujúce poznatky o adhezínoch patogénov v kombinácii s nanomateriálom na princípe prezentovaných konjugovaných častíc by mohli predstavovať účinný nástroj pri celení antimikrobiálnej terapie priamo na patogéna.

Pod'akovanie

Prezentované výsledky sú súčasťou realizácie projektu Centra excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, podporovaného Operačným programom pre výskum a rozvoj, ktorý je financovaný ERDF.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Karlsson K. A. (1998) *Mol. Microbiol.* 29(1), p. 1
- [2] Aspholm M., Olfat F. O., Nordén J., et al. (2006) *PLoS Pathog.* 2(10), p. 989
- [3] Du J., Yarema K. J. (2010) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62(7-8), p. 671
- [4] El-Boubbou K., Huang X. (2011) *Curr. Med. Chem.* 18(14), p. 2060
- [5] García-Fruitós E., Vázquez E., Díez-Gil C., et al. (2012) *Trends Biotechnol.* 30(2), p. 65
- [6] García-Fruitós E., González-Montalbán N., Morell M., et al. (2005) *Microb. Cell Fact.* 4, p. 27
- [7] Villaverde A., García-Fruitós E., Rinas U., et al. (2012) *Microb. Cell Fact.* 11, p. 76
- [8] Vázquez E., Corchero J. L., Burgueño J. F., et al. (2012) *Adv. Mater.* 24(13), p. 1742
- [9] Nahálka J., Pätoprstý V. (2009) *Org. Biomol. Chem.* 7(9), p. 1778
- [10] Talafová K., Nahálka J. (2012) *J. Glycomics Lipidomics* 2, p. 3
- [11] Tachev K. D., Danov K. D., Kralchevsky P. A. (2004) *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 34(2), p. 123
- [12] Mao H. (2004) *Protein Expr. Purif.* 37(1), p. 253
- [13] Xing L., Wu W., Zhou B., et al. (2011) *Microb. Cell Fact.* 10, p. 42

Molekulárna genetika ochorenia Charcot-Marie-Tooth typu 1B

Barbara Tóthová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; barbara.tothova@gmail.com

Abstrakt

Charcot-Marie-Tooth is a genetically and clinically heterogeneous disease. It belongs to the most common inherited disorders affecting the peripheral nervous system. Weakness, distal muscular atrophy of the limbs and sensory loss in these extremities belongs to the typical clinical features of this disease. The main cause of CMT1B are mutations in the myelin protein zero gene. The long-term aim of our work is to establish mutational status of CMT-related genes in the Slovak CMT suspected patient population. In this article, we focused on the characterization of mutations in MPZ, which are most commonly associated with disease subtype CMT1B.

KLúčové slová: *Charcot-Marie-Tooth 1B; dedičná periférna neuropatia; myelínový proteín zero*

Úvod a formulácia cieľa

Ochorenie Charcot-Marie-Tooth (CMT) patrí k najbežnejšie sa vyskytujúcim neuropatiám, ktoré postihujú periférny nervový systém [1]. Táto klinicky aj geneticky heterogénna skupina dedičných motorických a senzorických periférnych neuropatií má odhadovanú incidenciu 17-40 na 100 000 jednotlivcov [2]. Pre CMT je charakteristická postupná progresia príznakov objavujúcich sa najčastejšie v prvých dvoch dekádach života, v mnohých prípadoch už v detstve. Priebeh ochorenia a závažnosť príznakov je však u pacientov značne variabilná. Klasickým CMT fenotypom je oslabenie a atrofia distálnych svalov končatín ako následok poškodenia periférnych nervov [3], pričom dochádza aj k strate citlivosti v daných končatinách v dôsledku zhoršenia funkcie senzorických nervov. CMT nie je smrteľná porucha a nijako neskracuje predpokladanú dĺžku života, avšak značne zhoršuje jeho kvalitu. Objasnením jeho molekulárno-genetickej podstaty by sa napomohlo rozvoju účinných liekových stratégií a tým vývoju špecifickej liečby, ktorá doteraz neexistuje ani na jeden typ CMT.

Jednotlivé typy CMT sa môžu klasifikovať na základe viacerých aspektov. Napríklad podľa dedičnosti sa rozlišujú AD, AR a X-viazané formy. Na základe elektrofyziologických nálezov ich môžeme deliť na demyelinizačné alebo axonálne formy. Na základe génu, v ktorom sa kauzatívna mutácia nachádza, alebo na základe konkrétnych mutácií sa tiež odlišujú rôzne podtypy CMT [4]. CMT má úzke prepojenie aj s ďalšími dvoma diagnostickými jednotkami

hereditárných neuropatií akými sú distálna hereditárna motorická neuronopatia a hereditárna a autonómická neuropatia. Spomenuté syndrómy majú spoločné nielen prekrývajúce sa fenotypové prejavy ale aj alelickú a lokusovú heterogenitu.

Prevažná časť prípadov CMT je klasifikovaných ako demyelinizačná forma neuropatie s AD dedičnosťou s označením CMT1. Hlavným podtypom je CMT1A [3] ktorý zodpovedá približne polovici všetkých CMT prípadov. CMT1A je spojená s duplikáciou 1,5 Mb úseku na chromozóme 17p11.2, ktorý zahrňuje gén pre periférálny myelínový proteín 22 (PMP22) [5]. Opačný prípad predstavuje delécia tohto 1,5 Mb úseku, ktorá zapríčiňuje hereditárnu neuropatiu s náchylnosťou na tlakové obrny (HNPP) [6].

CMT1B patrí k vyššie spomenutým AD demyelinizačným neuropatiám, avšak spôsobeným mutáciami v géne myelínového proteínu zero (*MPZ*) lokalizovaného na lokuse 1q22-q23. Tie predstavujú asi 5% celkových prípadov CMT1 [4]. Mutácie v *MPZ* géne sú príčinou aj kongenitálnej hypomyelinizácie a ďalšej závažnej formy CMT, Déjèrine-Sottas syndrómu. Produktom tohto génu je hlavný štrukturálny proteín periférneho nervového systému, myelínový proteín zero (*MPZ*) [7]. Vyše 150 rozličných mutácií bolo ku dnešnému dňu identifikovaných v géne *MPZ* spôsobujúcich CMT1B, pričom môže ísť o missense, nonsense mutácie, malé inzercie alebo delécie, ako aj mutácie zostrihového miesta, pričom sa môže jednať o familiárnu a takisto aj *de novo* mutáciu [8]. Vlastnosti mutácií sú rôzne. Niektoré narúšajú rozvoj a údržbu proteínu zmenou štruktúry jednotlivých domén proteínu, ďalšie účinkom abnormálneho nadobudnutia funkcie spôsobujú toxicitu nesprávne skladaného proteínu alebo môžu mať za následok znížené množstvo proteínu, haploinsuficienciu.

Mutácie v géne *MPZ* sa prejavujú značnou fenotypovou variabilitou [9], čo spolu s neodstatočnou znalosťou ich molekulárneho mechanizmu môže viesť k nesprávne stanovenej diagnóze. Identifikáciou mechanizmov, ktoré podmieňujú CMT1B fenotyp by sme mohli porozumieť spôsobu, akým mutácie v *MPZ* zapríčiňujú túto poruchu, a tak prispieť k rozvoju účinných liečebných stratégií.

K dosiahnutiu týchto cieľov je veľmi dôležité mať prehľad o frekvenciách jednotlivých mutácií v jednotlivých génoch spojených s rôznymi podtypmi CMT v konkrétnych krajinách. Dlhodobým cieľom našej práce je preto postupné stanovenie mutačného statusu CMT spojených génov v slovenskej populácii CMT suspektných pacientov. V tomto príspevku sme sa zamerali

na charakterizáciu mutácií v géne *MPZ*, ktoré sú najčastejšie spojené s podtypom ochorenia CMT1B.

Materiál a metódy

Analyzovali sme 96 vybraných DNA vzoriek zo súboru pochádzajúceho z DNA banky združeného pracoviska Katedry molekulárnej biológie Prif UK a Laboratória genetiky ÚMFG SAV. Tieto vzorky pochádzali od pacientov suspektných na CMT, u ktorých v rámci predchádzajúcej práce nebola identifikovaná duplikácia, delécia alebo bodová mutácia v géne *PMP22* [10].

Skríning jednotlivých exónov *MPZ* génu sme uskutočnili pomocou sekvenovania Sangerovou metódou. Na preamplifikáciu DNA sme použili metódu PCR. K reakcii sme použili 0,75 μl forward a reverse primeru (Tab.1) špecifického pre každý exón s koncentráciou 10 pmol. μl^{-1} .

Tab. 1 Sekvencia primérov

primer	sekvencia
MPZ exon 1 FOR	5'-CCA CCA CCT CTC AAC TGC AC-3'
MPZ exon 1 REV	5'-GGG GAT TGC TGA GAG ACA CC-3'
MPZ exon 2 FOR	5'-TGG CCT CTG ACC TGT GAC TC-3'
MPZ exon 2 REV	5'-TTC TGT TAT CCA ACC CCA GGA-3'
MPZ exon 3 FOR	5'-GGG TCC TCT CAC ATG CTT CC-3'
MPZ exon 3 REV	5'-GCC TCT TCC CCC AAC CTA TC-3'
MPZ exon 4 FOR	5' -CCT CAA TGC AGG GCA TAC AC-3'
MPZ exon 4 REV	5'-ATG GGG GAT AGT GGG GAG AG-3'
MPZ exon 5 FOR	5'-GGG CGG AGA CTA CTC CAG TG-3'
MPZ exon 5 REV	5'-GCT TTG GTG CTT CTG CTG TG-3'
MPZ exon 6 FOR	5'-GGA ACA GTC AAG CCC CAG TC-3'
MPZ exon 6 REV	5'-GGC TCT GCT CAT CCT TTC GT-3'

Amplifikáciu sme vykonávali za nasledujúcich podmienok: 5 min úvodná amplifikácia pri 95 °C, nasledovaná 35 cyklami amplifikácie, tvorených 30 sek denaturáciou pri 95 °C, 30 sek aneláciou pri 62 °C a 30 sek polymerizáciou pri 72 °C. Po amplifikácii nasledovala 10 min záverečná amplifikácia pri 72 °C. PCR produkty boli potom schladené na 4 °C. Za účelom kontroly kvality a kvantity amplikónov alikvóty produktov PCR reakcie sme separovali pomocou elektroforézy na 1,5% agarózovom géli a vizualizovali pomocou fluorescenčnej farbičky SYBR Green I. Fragментy sme sekvenovali pomocou BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kitu (Applied Biosystems), následnú separáciu a detekciu fragmentov sme vykonávali prístrojom ABI 3130xl Genetic Analyzer a na analýzu sekvencií a ich porovnávanie s referenčnou sekvenciou [ENST00000533357](#) sme použili softvér ChromasPro.

Výsledky a diskusia

Je dôležité poznať mutácie vo všetkých génoch spojených s rôznymi typmi CMT, a preto sme sa rozhodli riešiť *MPZ* gén, ktorému je tento príspevok venovaný. *MPZ* je 7 kb dlhý gén, má 6 exónov a skladá sa z 248 aminokyselín. Až trištvrtina mutácií v géne *MPZ* je lokalizovaná v kódujúcej oblasti exónov 2 a 3. Mutácie v exóne 4 spôsobujú oveľa závažnejšie fenotypy demyelinizovaných periférálnych neuropatií. Sekvenovali sme všetky exóny a príľahlé intronické sekvencie.

Z celkového počtu analyzovaných vzoriek sme identifikovali štyri jednobodové zámény v sekvencii génu *MPZ*, z ktorých tri už sú klasifikované. Známe sekvenčné varianty sú polymorfizmy c.600G>A (Gly200Gly), c.684C>T (Ser228Ser) [11] a missense mutácia c.395C>T (Pro132Leu) [12]. Novo identifikovanou variantou je missense mutácia c.391A>C (Asn131His). Z dôvodu, že tieto sekvenčné varianty nie sú prítomné v databáze mutácií pre dedičné periférálne neuropatie – IPNMDB, ani v databáze jednobodových polymorfizmov – dbSNP, a aby sa predišlo falošne pozitívnym vyhodnoteniam, momentálne sú tieto výsledky vo fáze overovania.

Polymorfne varianty c.600G>A a c.684C>T boli u jednotlivých pacientov identifikované v heterozygotnom, ako aj homozygotnom stave. Bodová mutácia v kódujúcej oblasti c.395C>T, bola prítomná u probandky, táto mutácia je klasifikovaná ako patogénna a zapríčiňuje CMT1 bližšie neurčeného typu. Heterozygotná bodová zámena c.391A>C bola identifikovaná u troch jedincov, dvoch členov z jednej rodiny, matky a jej syna, a u probanda z nepríbuznej rodiny.

Nakoľko klinický status pacientov a ich ďalších rodinných príslušníkov s novo identifikovanými mutáciami nám nie je známy, je potreba jeho overenia na príslušných klinických pracoviskách za účelom zhodnotenia vzájomného vzťahu medzi genotypom a fenotypom.

Popri overovaní výsledkov, sekvenovaním otáznych vzoriek z opačnej strany, plánujeme v blízkej budúcnosti vykonať *in silico* predikcie na teoretický odhad dopadu daných zmien na funkčnosť proteínu. Takisto plánujeme uskutočniť skríning daných sekvenčných variant na vhodnom súbore DNA vzoriek pochádzajúcich od zdravých nepríbuzných jedincov zo slovenskej populácie. Prirodzene, definitívna klasifikácia danej zmeny môže byť uskutočnená až po jej identifikácii u väčšieho súboru pacientov potvrdením jednoznačnej kosegregácie s klinickými symptómami v postihnutých rodinách a/alebo funkčnými štúdiami na úrovni proteínu.

Záver

Výsledky našej analýzy uskutočnenej na slovenskej populácii pacientov s predpokladom na ochorenie CMT potvrdzujú, že mutačná variabilita a frekvencia mutácií v géne *MPZ* je porovnateľná s výsledkami pozorovanými v klinických populáciách ostatných krajín.

PodĎakovanie

Ďakujem kolektívu laboratória humánnej genetiky KMB Prif UK a laboratóriu genetiky ÚMFG SAV za cenné rady a pomoc pri práci a Mgr. Petrovi Reškovi, PhD. za pomoc pri dizajnovaní primerov.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Shy M, Lupski JR, Chance PF, et al. (2005) *Dyck Periph neurop* 4,p. 1623
- [2] Skre H. (1974) *Clin Genet*, 6. p. 98
- [3] Pareyson D, Marchesi C. (2009) *Lancet Neurol* 8, p. 654
- [4] Szigeti K, Lupski JR. (2009) *Eur J Hum Genet* 17, p. 703
- [5] Raeymaekers P, Timmerman V, Nelis E, et al. (1991) *Neuromuscul Disord* 1, p. 93
- [6] Lupski JR, Chance PF. (2005) *Periph Neurop Elsevier Saunders* 4, p. 1659
- [7] Kirschner DA, Wrabetz L, Feltri ML. (2004) *Elsev*, p. 523
- [8] Shy ME. (2006) *J Neurol Sci* 242,p. 55

- [9] Mandich P, Fossa P, Capponi S, et al. (2009) *Eur J Hum Genet* 17, p. 1129
- [10] Resko P, Radvansky J, Odnogova Z, et al. (2011) *Gen. Physiol. Biophys.* 30, p. 379
- [11] Roa BB, Warner LE, Garcia CA, et al. (1996) *Hum Mutat* 7, p. 36
- [12] Sorour E, Upadhyaya M. (1998) *Hum Mutat Suppl.* 1, p. s22

Molekulárne prístupy na stanovenie farby srsti u psov

Evelína Turňová, Marcela Bieliková, Andrej Dudáš

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
evelina.turnova@gmail.com*

Abstrakt

Coat colour is one of the essential characteristics of domestic dog breeds. Domestic dogs have the most variable phenotype of all domestic animals. Majority of more than 400 breeds were artificially created by men by specific breeding of selected individuals with suitable exterior and working qualities. Our studies provide valuable information about determination of the structure and coat colour on level of genotype, which the breeders can make use of while assembling the breeding pairs. With combination of these information and the aimed breeding of individuals, it is possible to achieve the consecutive appearance of desired color in puppies.

Kľúčové slová: farba srsti; štruktúra srsti; *Pes domáci*

Úvod a formulácia cieľa

K jedným z hlavných morfológických rozdielov medzi rôznymi plemenami psov patrí vzhľad srsti. Dnes už poznáme gény, ktoré ovplyvňujú štruktúru, dĺžku a kučeravosť srsti na molekulárnej úrovni. Podobne sú už známe aj gény ovplyvňujúce sfarbenie srsti u psov.

V súvislosti s typom srsti boli nájdené rôzne varianty v troch génoch a to: gén kódujúci *FGF5* (fibroblast growth factor - 5) ovplyvňuje dĺžku srsti, ktorá môže byť dlhá alebo krátka. Druhý gén kódujúci *KRT71* (keratin-71) je zodpovedný za prítomnosť alebo neprítomnosť kučier srsti. Tretí kódujúci *RSPO2* (R-spondin-2) kóduje prítomnosť alebo neprítomnosť znakov, ako sú výrazné fúzy a obočie charakteristické pre hrubosrsté psy Tab.1. [1] Tejto téme sme sa venovali v minuloročnom príspevku. [2]

Tab. 1 Prehľad základných génov, lokusov a aliel determinujúcich štruktúru srsti

Gén kódujúci:	Lokus:	Ovplyvňuje fenotyp:
FGF5	L	Dĺžka srsti
KRT71	Cu	Kučeravosť
RSPO2	Wh	Hrubosrstosť

Sfarbenie srsti ovplyvňuje produkcia dvoch hlavných pigmentov eumelanínu (hnedý až čierny pigment) a feomelanínu (svetlý až hnedočervený, červený pigment). V posledných rokoch bol zaznamenaný veľký pokrok aj pri objasnení molekulárnej podstaty pigmentácie srsti u psov. Bolo identifikovaných 6 základných génov ovplyvňujúcich špecifickú farbu srsti zhrnuté v Tab 2. [3]

Tab. 2 Prehľad základných génov, lokusov a aliel determinujúcich farbu srsti psov

Lokus:	Názov génu:	Skratka génu:	Alely:
E	melanocortin 1 receptor	MC1R	E, e, EM
K	canine β -defensin 103	CBD103	$K^B > k^{br} > k^y$
A	agouti signal peptide	ASIP	$A^y > a^w > a^t > a$
B	tyrosine related protein 1	TYRP1	B, b ^s , b ^c , b ^d
D	melanophilin	MLPH	D, d
M	Silver/pre-melanosomal protein	SILV/PMEL17	M, m

Cieľom mojej práce bolo, zaviesť a optimalizovať metódy pre určenie genotypu lokusov uvedených v Tab. 1 a Tab. 2 a následne ich aplikovať na vybranú skupinu vzoriek psov.

Materiál a metódy

Analyzovali sme vzorky DNA 40 jedincov rôznych plemien psov. Biologický materiál bol odoberaný pomocou sterilnej vatovej tyčinky alebo cytologickej kefky, sterom z bukálnej sliznice. Genómovú DNA sme izolovali použitím kitu Gentra Puregene Buccal Cell Kit (Qiagen) podľa návodu výrobcu. Pre jednotlivé gény boli navrhnuté primery programom Primer 3 a následne boli optimalizované špecifické podmienky polymerázovej reťazovej reakcie. Z dôvodu následného štiepenia sme po amplifikácii cieľového úseku overovali správnu PCR amplifikáciu produktu elektroforézou na 2% agarózovom géli. Jednotlivé alely daných génov sme detegovali štiepením rôznymi restriktívnymi endonukleázami. Gény, pri ktorých sa deteguje inzercia, sme vyhodnotili nanosením vzoriek na 2% agarózový gél. Pre alelu b^c sme použili metódu ACRS (amplification create restriction site), kde zmenou jedného nukleotidu v sekvencii primeru vzniklo štiepne miesto špecifické k danej mutácii. Veľkosti fragmentov štiepenia sme vyhodnocovali elektroforeticky v 8% PAGE géli.

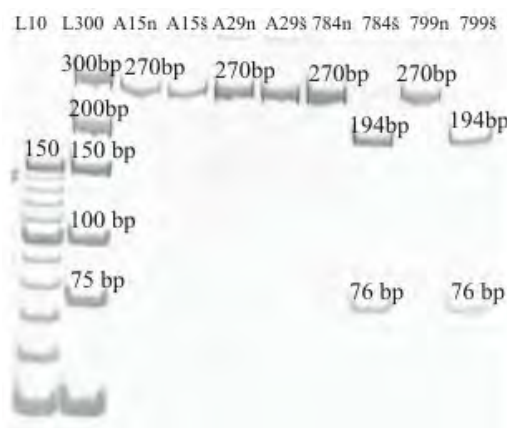
Výsledky a diskusia

Gén kódujúci *MC1R* bol prvým génom, ktorý bol študovaný molekulárnymi metódami u psov. [4] Mutácia je lokalizovaná v pozícii c.914C>T na 5. psom chromozóme a spôsobuje stratu funkcie tvorby eumelanínu. Tvoriaci sa feomelanín spôsobuje jednofarebné červené sfarbenie. [5] Druhá mutácia lokalizovaná v tomto géne v pozícii c.799A>C spôsobuje u psov melanistickú masku. [6] V Tab. 3 je zhrnutý prehľad analýzy jednotlivých aliel restriktívnym štiepením.

Tab. 3 Alely génu MC1R, veľkosti PCR produktov, restriktčné endonukleázy a restriktčný profil

Alela	Lokalizácia mutácie	Restriktáza	PCR produkt	RE profil		Fenotyp
				Štandardná forma	Mutácia	
E	914C	Eco47III	99 bp	99bp	-	Čierna
e	914T			-	71 + 28 bp	Červená farba srsti
E	799A	NlaIII	270 bp	270bp	-	Čierna
EM	799C			-	194bp + 76 bp	Melanistická maska

Restriktčné fragmenty sme vyhodnocovali vo vertikálnej elektroforetickej aparátúre. Elektroforéza prebiehala v elektroforetickom tlmivom roztoku TBE, ktorý bol 1x koncentrovaný pri napätí 66V v 8% polyakrylamidovom géli 2 hodiny. Záznam elektroforézy je zobrazený na Obr. 1.



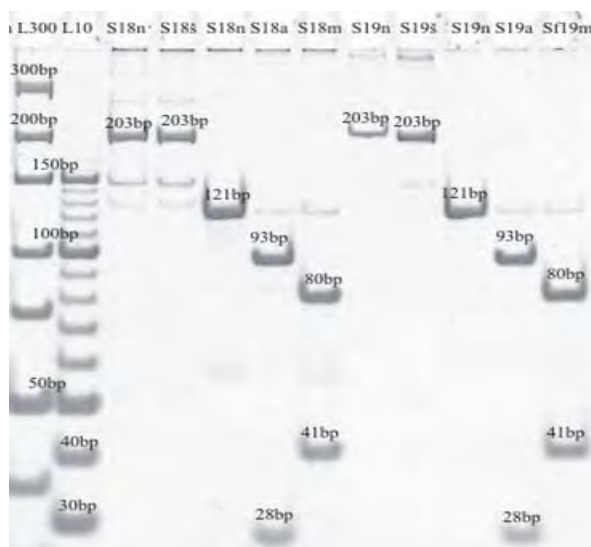
Obr. 1 Záznam z elektroforézy v 8% polyakrylamidovom géli, kde sa separovali restriktčné fragmenty génu MC1R aliel EM, E, e, ktoré boli štiepené enzýmom *NlaIII*. V prvej dráhe veľkostný štandard 10 bp v druhej 300 bp. V 3. a 4. dráhe vzorka A15 neštiepená a štiepená, V 5. a 6. dráhe vzorka A29 neštiepená a štiepená, V 7. a 8. dráhe vzorka 784 neštiepená a štiepená (vidíme mutáciu v MC1R géne) rovnako aj v dráhe 9. a 10.

Gén kódujúci *TYRP1* ovplyvňuje produkciu hnedého alebo čierneho eumelanínu. Tento gén má dve alely, alela *B* kontroluje čierne zafarbenie srsti a alela *b* kontroluje hnedé zafarbenie srsti. V súvislosti s hnedým zafarbením boli detekované alely b^S , b^D , b^C . V týchto alelách boli detekované tri alely a mutácie b^S (991C>T), b^D (345del), b^C (121C>T). V prítomnosti dvoch aliel *b* jedinec produkuje hnedý eumelanín. Alela *B* zapríčiňuje produkciu čierneho eumelanínu a dedí sa dominantne voči recesívnej hnedej *b* alele. [7] Pre analýzovanie aliel tohto génu používame rozdielne PCR reakcie, kedy fragmenty dlhé 203 bp sa štiepia restriktázou *RsaI*. A fragmenty druhej PCR reakcie dlhé 121bp sa štiepia restriktázami *AciI* a *MnlI* V Tab. 4. je zhrnutý prehľad restriktčných analýz jednotlivých aliel.

Tab. 4 Alely génu TYRP1, veľkosti PCR produktov, restriktčné endonukleázy a restriktčný profil

Alela	Typ mutácie	Restriktčná endonukleáza	Dĺžka PCR produktu	Restriktčný profil	
				Štandardná forma	Mutácia
B	991C	AciI	121bp	121bp	93 + 28 bp
b ^S	991T				
B	345prol	MnII	121bp	80 + 41 bp	121 bp
b ^D	345del				
B	121C	RsaI	203bp	203 bp	182 + 21 bp
b ^C	121T				

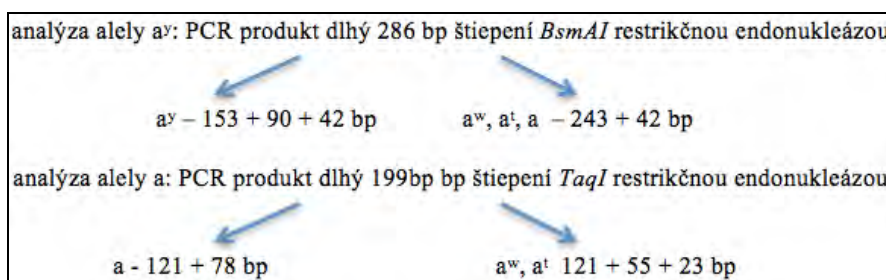
Restriktčné fragmenty sme vyhodnocovali vo vertikálnej elektroforetickej aparátúre. Elektroforéza prebiehala v elektroforetickom tlmivom roztoku TBE, ktorý bol 1x koncentrovaný pri napätí 66V v 8% polyakrylamidovom géli 2 hodiny. Záznam elektroforézy je zobrazený na Obr. 2.



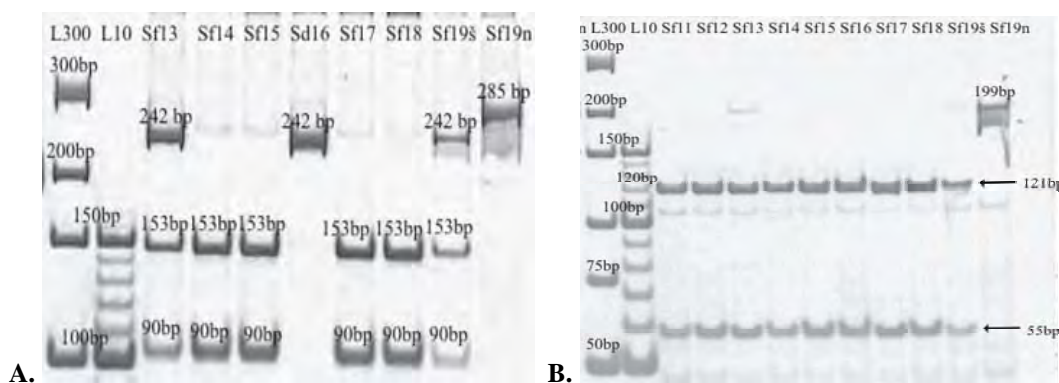
Obr. 2 Záznam z elektroforézy v 8% polyakrylamidovom géli, kde sme separovali restriktčne štiepené PCR fragmenty génu TYRP1 alel b^S, b^D, b^C. V prvej dráhe veľkostný štandard 300 bp v druhej 10 bp v v ďalších dráhach sú výsledky vzoriek S18 a S19 pre alely B a b^S, b^D, b^C. 3. dráha neštiepená vzorka S18 4. dráha štiepená vzorka S18 restriktázou *RsaI* 5. dráha Neštiepená vzorka S18 6. dráha štiepená S18 restriktázou *AciI* 7. dráha štiepená vzorka S18 restriktázou *MnII* v ďalších dráhach rovnaké poradie pre vzorku S19 – obe vzorky majú prítomnú mutáciu b^S, v ostatných alelách majú štandardnú formu.

Gén kódujúci *ASIP* má 4 alely zoradené podľa dominance $a^y > a^w > a^t > a$. Diverzita farby kože a srsti u cicavcov je spôsobená rozdielnou expresiou a regionálnou distribúciou dvoch typov už spomínaných pigmentov. [7] Prepínanie medzi syntézou jedného alebo druhého je regulované parakrinnou signálnou molekulou - aguti proteínom. Pre výsledný genotyp v tomto lokuse analyzujeme vzorky dvomi rozdielnymi PCR reakciami Obr. 3, kedy

pri prvej vieme podľa restričného profilu rozlíšiť alelu a^y od ostatných troch. A druhou PCR reakciou rozlíšime alelu a (non agouti) od aliel a^w , a^t Obr. 4.



Obr. 3 Schématické znázornenie analýzy alel Lokusu A, veľkosti PCR produktov, restričné endonukleázy a restričný profil



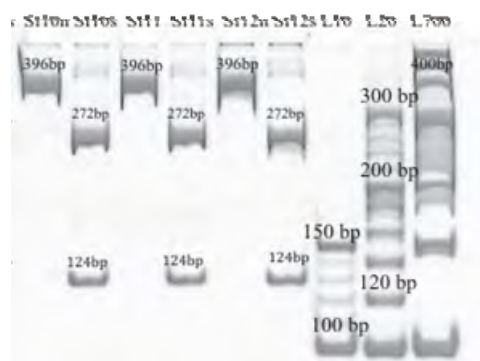
Obr. 4 Záznamy z elektroforéz v 8% polyakrylamidovom géli 2 PCR reakcií.
 A. Detekcia alely a^y B. Detekcia alely a .

Úloha génu kódujúceho *CBD103* bola rozpoznaná len nedávno. Tento gén ovplyvňuje reguláciu tvorby pigmentu. [8] Kombináciou metód skúmania rodokmeňov a mapovaní populácii bola identifikovaná K^B mutácia, konkrétne delécia 3 bp na 16. psom chromozóme (CFA 16) v géne kódujúcom *CBD 103*, ktorá spôsobí nefunkčnosť tohto génu. [9] Výsledné sfarbenie je definované genotypom v lokuse A Tab 5.

Tab. 5 Alely génu *CBD103*, veľkosti PCR produktov, restričné endonukleázy a restričný profil

Alela	Lokalizáci a mutácie	Restriktáza	PCR produkt	RE profil		Fenotyp
				Štandardná forma	Mutácia	
K	del	<i>EcoRI</i>	396 bp	369 bp	-	Čierna
k	914T			-	272 + 124 bp	podľa lokusu A

Restričné fragmenty sme vyhodnocovali elektroforézou pri napätí 66V v 8% polyakrylamidovom géli 2 hodiny. Záznam elektroforézy je zobrazený na Obr. 5.



Obr. 5 Záznam z elektroforézy restričných fragmentov Lokusu K v 8% polyakrylamidovom géli, v dráhach č. 1, 3, 5 sú neštiepené vzorky v dráhach č. 2, 4, 6 sú vzorky štiepené restriktázou *EcoRI*, u všetkých vzoriek bola prítomná mutácia, 7.dráha veľkostný štandard 10 bp 8. dráha veľkostný štandard 20 bp, 9. dráha veľkostný štandard 700 bp

Záver

V predchádzajúcej práci sme sa venovali lokusom ovplyvňujúcich štruktúru srsti a sfarbeniu srsti merle, v tejto práci sme sa venovali ostatným lokusom ovplyvňujúcich farbu srsti u psov. Celkovo sme optimalizovali PCR reakcie pre stanovenie aliel v lokusoch A, B, Cu, E, D, K, L, M, Wh podmieňujúcich štruktúru a farbu srsti u psov a následne sme ich aplikovali na vzorky psov. Táto štúdia je významná pre chovateľov, pre ktorých je informácia o genotype a pravdepodobnosti výskytu požadovaného sfarbenia šteniat neoceniteľná z dôvodu cieleného kríženia.

PodĎakovanie

Moje poďakovanie patrí Ing. Marcele Bielikovej, PhD. a RNDr Andrejovi Dudášovi PhD. za vedenie pri mojej práci. Ďakujem chovateľom psov za poskytnutie vzoriek DNA.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Cadieu E., Neff M. W., Quignon P., et al. (2009) Science. 326, p. 150
- [2] Turňová E., Bieliková M. (2012) Študentská vedecká konferencia PriF UK 2012, Zborník recenzovaných príspevkov, Bratislava, SR, p. 735
- [3] Schmutz S. M., Berryere T. G. (2007) Anim. Genet. 6, p. 539
- [4] Schmutz S. M., Moker J. S., Berryere T. G., et al. (2001) Anim. Genet. 32, p. 43
- [5] Schmutz S. M., Berryere T. G., Goldfinch A. D. (2002) Mamm. Genome. 7, p. 380
- [6] Schmutz S. M., Berryere T.G., Ellinwood N. M., et al. (2003) J. Hered. 94, p. 6
- [7] Kerns J. A., Newton J., Berryere T. G., et. al. (2004) Mamm. Genome. 15, p. 798
- [8] Kerns J. A., Olivier M., Lust G., et al. (2003) J. Hered. 94, p. 75
- [9] Candille S. I., Kaelin C. B., Cattanach B. M., et al. (2009) In Science. 318, p. 1418

Vplyv rôznych foriem antimónu na rast kukurice siatej (*Zea mays* L.)

Miroslava Vaculíková¹, Marek Vaculík², Miroslava Luxová¹

¹Botanický ústav SAV, Oddelenie fyziológie rastlín, Dúbravská cesta 9, 845 23, Bratislava, Slovenská republika; e-mail: miroslava.vaculikova@savba.sk

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyziológie rastlín, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

Abstrakt

Increased attention is paid to the toxic element antimony (Sb) in the recent years. The amount of Sb increased in the environment because of industrial activity and traffic. Its occurrence is also high in soil and water around mining areas, where Sb ores have been mined in the past. Risk of Sb incorporation into food chains is higher on these sites. However, until now there is still lack of knowledge about its toxicity, availability and influence on biochemical and physiological reactions running in plant organism. In general, it is known that organic form of Sb is less toxic than inorganic form, and that Sb^{III} is about 10-times more toxic than Sb^V. The aim of this contribution was to compare the influence of two Sb compounds on the growth of maize (*Zea mays* L.) and evaluate the toxicity of Sb in relation with the form of Sb presented in the medium. These results are the basis for our future studies of Sb influence on plants.

Kľúčové slová: Antimón; biomasa; kukurica siata; toxicita.

Úvod a formulácia cieľa

Antimón patrí medzi polokovy s toxickými účinkami, ktorý sa podieľa na kontaminácii životného prostredia. Jeho zvýšené množstvá sa môžu vyskytovať v ovzduší, riečnych sedimentoch, ako aj podzemných a povrchových vodách, čo predstavuje vážny environmentálny problém, a vzhľadom na to, že má karcinogénne a mutagénne účinky, môže vážne ohroziť zdravie ľudí [1, 2].

Vyskytuje sa v rôznych koncentráciách a formách, pričom jeho pôvod môže byť prirodzený alebo antropogénny. Prirodzeným zdrojom Sb je zvetrávanie hornín a vulkanická činnosť. Vo väčšom množstve sa však Sb dostáva do životného prostredia antropogénnou činnosťou [3]. Dôležitým zdrojom Sb je priemysel a doprava, no oveľa významnejším zdrojom a obzvlášť pre Slovensko sú vysoké ložiskové koncentrácie tohto prvku v horninovom prostredí. Ťažba antimónovej rudy, jej úprava a v súčasnej dobe hlavne jej pozostatky vo forme odkalísk a výtokov z bankských štôlní, spôsobujú, že na niektorých lokalitách dochádza k zvyšovaniu koncentrácie Sb v pôde a vode [4]. V Nariadení vlády Slovenskej republiky č. 354/2006 Z.z., ktorým sa ustanovujú požiadavky na vodu určenú na ľudskú spotrebu, je definovaná najvyššia medzná hodnota pre Sb 0,005 mg·l⁻¹ [5]. V okolí bankských lokalít koncentrácia Sb často prekračuje túto hodnotu aj niekoľkonásobne.

V porovnaní s inými prvkami je veľký nedostatok informácií o jeho toxicite a správaní v heterogénnom prostredí, o formách výskytu a dostupnosti pre živý organizmus. Vo všeobecnosti je známe, že v životnom prostredí, biologických a geochemických vzorkách sa Sb vyskytuje najčastejšie v dvoch oxidačných stavoch (III a V) a že Sb v oxidačnom stave III je toxickejší ako Sb v oxidačnom stave V. Ale tiež je známe, že anorganická forma je viac toxická ako organická [1]. Cieľom nášho príspevku bolo porovnať dve formy Sb, v ktorých sa Sb vyskytuje v rozdielnych oxidačných stavoch a zhodnotiť ich toxický vplyv na rast kukurice siatej (*Zea mays* L.)

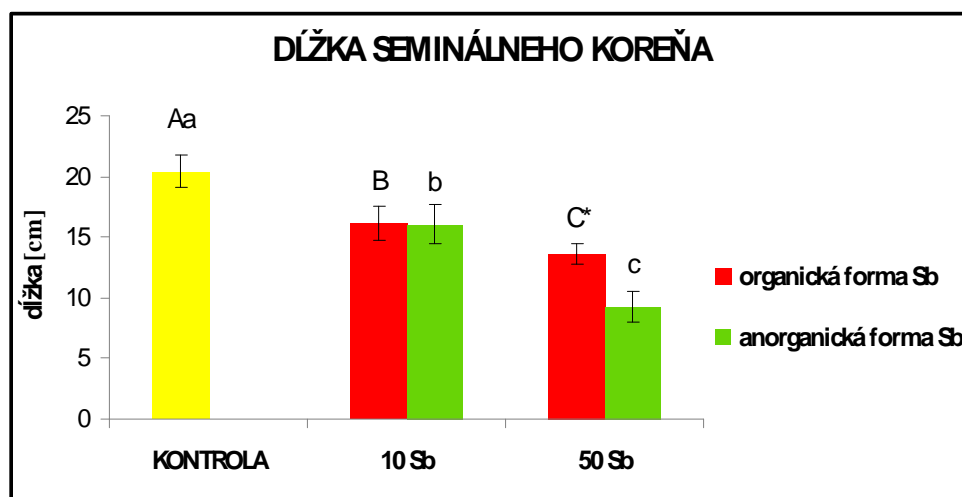
Materiál a metódy

Zrná kukurice siatej (*Zea mays* L.) hybrid Novania povrchovo sterilizované v 1% Save 20 min, klíčili 3 dni v tme pri teplote 26°C. Klíčne rastliny sa pestovali v Hoaglandovom živnom roztoku [6] v nasledovných variantoch: 0 (kontrola), 10 mg.l⁻¹ Sb_{org}, 50 mg.l⁻¹ Sb_{org}, 10 mg.l⁻¹ Sb_{anorg}, 50 mg.l⁻¹ Sb_{anorg} s pH upraveným na hodnotu 6,2 pre každý variant. Zdrojom organickej formy Sb bol K₂(SbO)₂C₈H₄O₁₀.3H₂O (Sb_{org}) a zdrojom anorganickej formy Sb bol KSbO₃.3H₂O (Sb_{anorg}). Klíčne rastliny sme pestovali 10 dní v kontrolovaných kultivačných podmienkach pri teplote 24/22°C deň/noc, vlhkosti vzduchu 70 % a fotoperióde 16 h svetlo/8 h tma. Na desiaty deň kultivácie boli rastliny zozbierané a rozdelené na nadzemnú a podzemnú časť. V prípade nadzemnej časti sa zmerala dĺžka a šírka každého listu a podľa [7] sa vypočítala celková listová plocha. Pri podzemnej časti sa zmerala dĺžka primárneho seminálneho koreňa. Hmotnosť čerstvej biomasy sa zmerala zvlášť pre nadzemnú a zvlášť pre podzemnú časť, podobne aj hmotnosť suchej biomasy. Suchá biomasa sa dosiahla vysušením rastlinného materiálu pri teplote 70°C počas 72 hodín. Na zistenie štatistickej preukaznosti medzi jednotlivými variantmi sa použil Student t-test pri hladine preukaznosti p = 0,05.

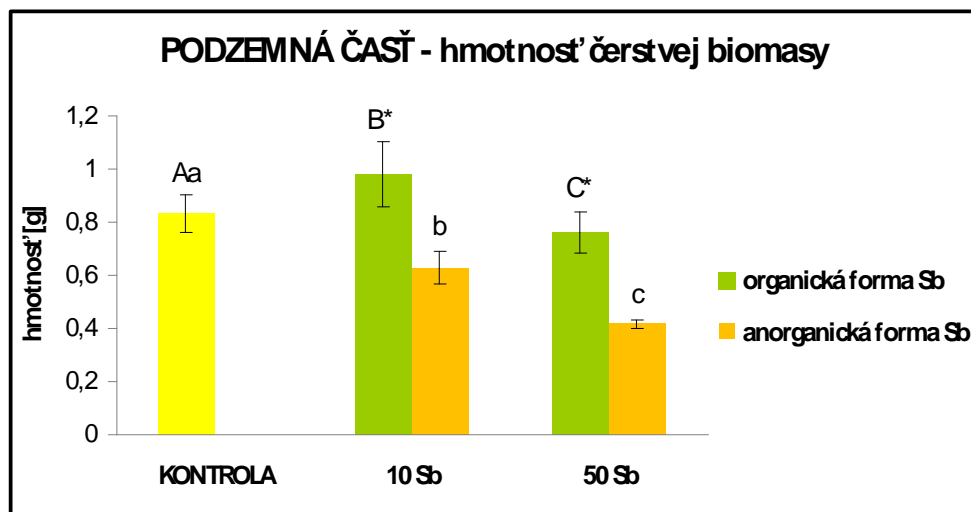
Výsledky a diskusia

V našich experimentoch sme zistili, že dĺžka primárneho seminálneho koreňa klesá úmerne so zvyšujúcou sa koncentráciou Sb v médiu (Obr. 1). Podobný trend zaznamenali He a Yang [8], ktorí tiež porovnávali vplyv Sb_{org} a Sb_{anorg} pri ryži (*Oryza sativa* L.), rovnako aj Pan a kol. [9], ktorí pri svojom experimente sledovali vplyv organickej formy Sb na *Z. mays*, a zaznamenali pokles dĺžky hlavného seminálneho koreňa so zvyšujúcou sa koncentráciou Sb v médiu. V prípade nižšej použitej koncentrácie Sb (10 mg.l⁻¹) sme nezaznamenali rozdiely

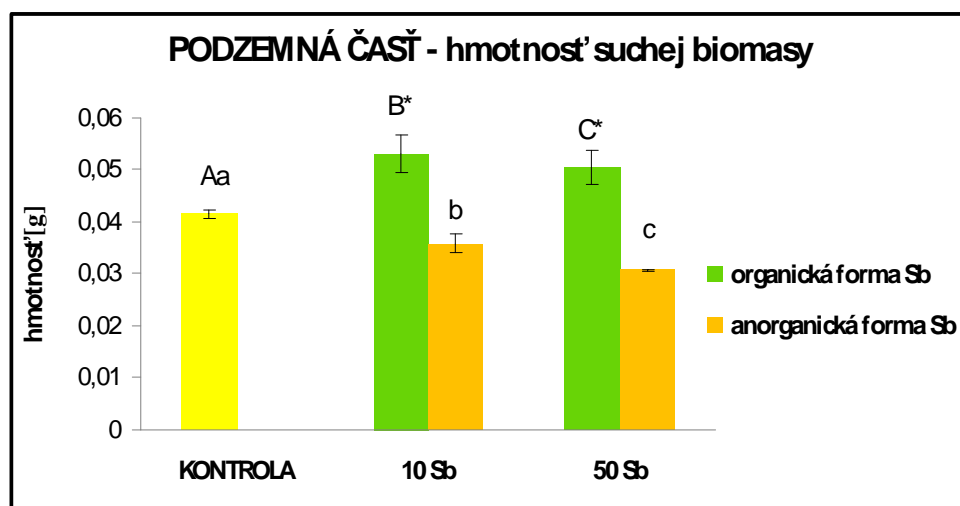
medzi Sb_{org} a Sb_{anorg} , kým pri vyššej použitej koncentrácii Sb (50 mg.l^{-1}) boli korene preukazne kratšie v prípade Sb_{anorg} (Obr. 1). Pri aplikácii Sb_{org} sa čerstvá hmotnosť podzemnej časti rastlín zvýšila pri 10 mg.l^{-1} , kým pri vyššej koncentrácii Sb (50 mg.l^{-1}) mierne klesla v porovnaní s kontrolou (Obr. 2). Meraním suchej hmotnosti podzemnej biomasy sme dospeli k prekvapivému zisteniu, že pri oboch použitých koncentráciách Sb_{org} bola hmotnosť preukazne vyššia v porovnaní s kontrolou (Obr. 3). Na rozdiel od toho, čerstvá aj suchá hmotnosť biomasy podzemnej časti klesala priamo úmerne so zvyšujúcou sa koncentráciou Sb_{anorg} v médiu (Obr. 2, 3). Pri porovnávaní hmotnosti čerstvej aj suchej nadzemnej biomasy sme zistili, že v prípade obidvoch použitých foriem Sb došlo k preukaznému poklesu hmotnosti biomasy úmerne so vzrastajúcou koncentráciou Sb v médiu, pričom toxickejší účinok sme pozorovali pri Sb_{anorg} (Obr. 4, 5). He & Yang [8] zistili, že pri stúpajúcej koncentrácii anorganickej formy Sb v médiu dochádza k poklesu tvorby nadzemnej ako aj podzemnej biomasy. Pri použití organickej formy Sb pozorovali, že Sb stimulovalo tvorbu nadzemnej biomasy a inhiboval tvorbu podzemnej biomasy rastlín ryže, pričom my sme pozorovali presne opačný efekt (Obr. 2, 4). Celková listová plocha rastlín klesala so zvyšujúcou sa koncentráciou oboch foriem Sb.



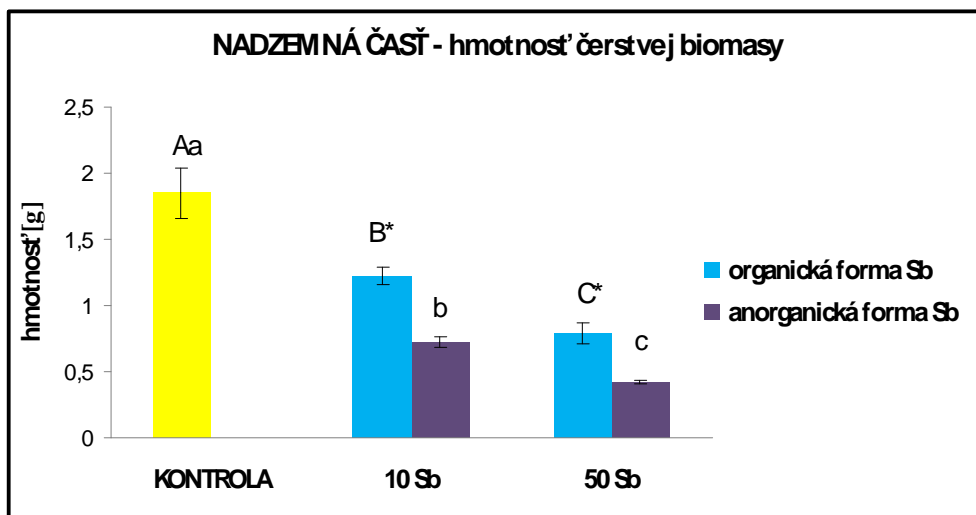
Obr. 1 Porovnanie dĺžky seminálneho koreňa pri hybridе Novania pestovanej v kontrolných podmienkach a v podmienkach s pridaným Sb (10 a 50 mg.l^{-1}). Antimón bol pridaný v organickej a anorganickej forme. Na obrázku sú zobrazené priemerné hodnoty s príslušnou smerodajnou odchýlkou. Rozdielne písmená v rámci jednej použitej formy Sb označujú štatisticky preukazné rozdiely medzi jednotlivými variantmi. Symbol * označuje štatisticky preukazné rozdiely medzi rovnakými variantmi rôznych foriem Sb. Hladina preukaznosti $p = 0,05$



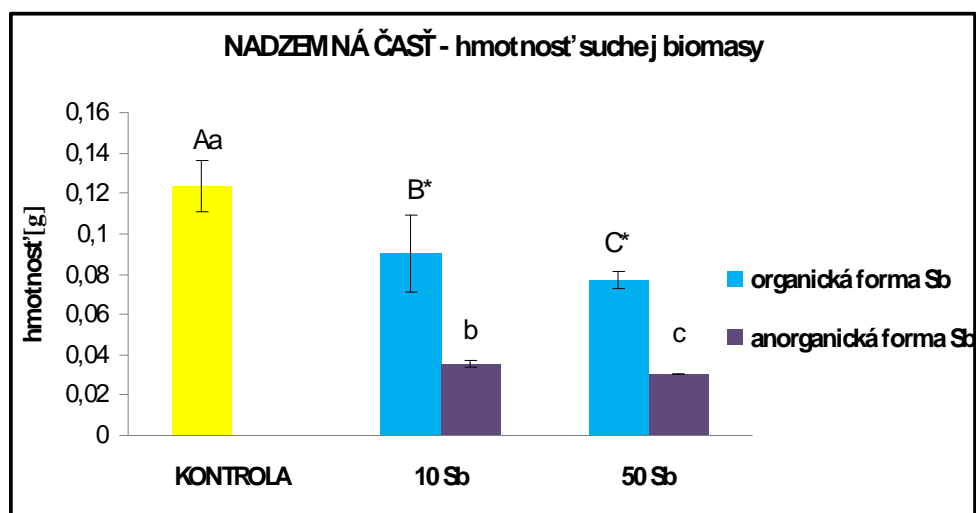
Obr. 2 Porovnanie hmotnosti čerstvej biomasy podzemnej časti pri hybride *Novania* pestovanej v kontrolných podmienkach a v podmienkach s pridaným Sb (10 a 50 mg.l⁻¹). Antimón bol pridaný v organickej a anorganickej forme. Na obrázku sú zobrazené priemerné hodnoty s príslušnou smerodajnou odchýlkou. Rozdielne písmená v rámci jednej použitej formy Sb označujú štatisticky preukazné rozdiely medzi jednotlivými variantmi. Symbol * označuje štatisticky preukazné rozdiely medzi rovnakými variantmi rôznych foriem Sb. Hladina preukaznosti $p = 0,05$



Obr. 3 Porovnanie hmotnosti suchej biomasy podzemnej časti pri hybride *Novania* pestovanej v kontrolných podmienkach a v podmienkach s pridaným Sb (10 a 50 mg.l⁻¹). Antimón bol pridaný v organickej a anorganickej forme. Na obrázku sú zobrazené priemerné hodnoty s príslušnou smerodajnou odchýlkou. Rozdielne písmená v rámci jednej použitej formy Sb označujú štatisticky preukazné rozdiely medzi jednotlivými variantmi. Symbol * označuje štatisticky preukazné rozdiely medzi rovnakými variantmi rôznych foriem Sb. Hladina preukaznosti $p = 0,05$



Obr. 4 Porovnanie hmotnosti čerstvej biomasy nadzemnej časti pri hybride *Novania* pestovanej v kontrolných podmienkach a v podmienkach s pridaným Sb (10 a 50 mg.l⁻¹). Antimón bol pridaný v organickej a anorganickej forme. Na obrázku sú zobrazené priemerné hodnoty s príslušnou smerodajnou odchýlkou. Rozdielne písmená v rámci jednej použitej formy Sb označujú štatisticky preukazné rozdiely medzi jednotlivými variantmi. Symbol * označuje štatisticky preukazné rozdiely medzi rovnakými variantmi rôznych foriem Sb. Hladina preukaznosti p = 0,05



Obr. 5 Porovnanie hmotností suchej biomasy nadzemnej časti pri hybride *Novania* pestovanej v kontrolných podmienkach a v podmienkach s pridaným Sb (10 a 50 mg.l⁻¹). Antimón bol pridaný v organickej a anorganickej forme. Na obrázku sú zobrazené priemerné hodnoty s príslušnou smerodajnou odchýlkou. Rozdielne malé písmená v rámci jednej použitej formy Sb označujú štatisticky preukazné rozdiely medzi jednotlivými variantmi. Symbol * označuje štatisticky preukazné rozdiely medzi rovnakými variantmi rôznych foriem Sb. Hladina preukaznosti p = 0,05

Záver

Z našich zistení vyplýva, že so zvyšujúcou sa koncentráciou Sb v médiu klesá dĺžka primárneho seminálneho koreňa, ako aj tvorba čerstvej a suchej biomasy podzemnej a nadzemnej časti rastlín. Hoci niektoré sledované parametre boli pri aplikácii 10 mg.l⁻¹

organickéj formy Sb v prípade podzemnej časti vyššie v porovnaní s kontrolou, vyššia dávka Sb preukazne inhibovala tvorbu biomasy podzemnej časti. V prípade anorganickéj formy Sb sme zistili, že všetky nami sledované parametre boli nižšie pri oboch použitých koncentráciách v porovnaní s kontrolnými rastlinami. Preto predpokladáme, že anorganická forma Sb má na rast kukurice siatej viac toxický vplyv ako organická forma Sb. Napriek literárnym poznatkom, že Sb v oxidačnom stupni III má väčší toxický vplyv na živé organizmy ako Sb v oxidačnom stupni V, predpokladáme, že pri rastlinách kukurice má rozhodujúci vplyv forma v akej sa Sb nachádza a nie oxidačný stav v ktorom sa Sb vyskytuje v zlúčenine.

Dosiahnuté výsledky sú základom pre ďalšie štúdium prejavov toxicity Sb v rastlinnom organizme.

Pod'akovanie

Práca bola podporená Agentúrou pre podporu výskumu a vývoja na základe grantov APVV 0140-10, APVV SK-FR-0020-11 a bola tiež súčasťou riešenia projektu VEGA 1/0817/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Filella M., Belzile N., Chen Y.-W. (2002a) *Earth Sci. Rev.* 57, p. 125
- [2] Filella M., Belzile N., Chen Y.-W. (2002b) *Earth Sci. Rev.* 59, p. 265
- [3] Tschan M., Robinson B.H., Schulin R. (2009) *Environ. Chem.* 6, p. 106
- [4] Ženišová Z., Fláková R., Jašová I., et al. (2009) *Podzemná voda*. 1, 100-117
- [5] Nariadenie vlády Slovenskej republiky č. 354/2006 Z.z. z 10. mája 2006, ktorým sa ustanovujú požiadavky na vodu určenú na ľudskú spotrebu a kontrolu kvality vody určenej na ľudskú spotrebu (účinnosť od 1. júna 2006)
- [6] Hoagland D.R., Arnon D.I. (1950) *California Experiment Station Circular 347*, The Collage of Agriculture, University of California, Berkeley.
- [7] Květ J., Nečas J. (1966) Measurement of leaf area. In: Šesták Z., Čatský S. (Eds.) *Methods of Studying Photosynthetic Production of Plants*. Academia Praha, p. 315.
- [8] He M., Yang J. (1999) *Sci. Total Environ.* 243/244, p. 149
- [9] Pan X., Zhang D., Chen X., et al. (2011) *Water Air Soil Pollut.* 215, p. 517

Ohniská patogénov prenášaných kliešťom *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) na vybraných lokalitách v Bratislave

Tatiana Vaculová¹, Veronika Tarageľová²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra ekológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; tana.vaculova@gmail.com

²Slovenská akadémia vied, Ústav zoológie, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovenská republika

Abstrakt

Ticks gradually penetrate into the urban areas due to environment changes and anthropogenic activity and new foci of tick-borne diseases are formed. In our study two urban sites in Bratislava (Železná studienka and Horský park) were selected in order to study the seasonal dynamics of *I. ricinus* ticks and the prevalence of two tick-borne pathogens in questing ticks. Ticks were collected by flagging from March to October 2011 and 2012. Tick population density fluctuated seasonally and small differences between studied sites were recorded. Molecular diagnostics confirmed the presence of *B. burgdorferi* s.l. and *A. phagocytophilum* in both localities. The infection prevalence of borreliae were 11,9% (Železná studienka) and 15,3% (Horský park), the prevalence of *Anaplasma*-infected ticks were 4,4% (Železná studienka) and 7,5% (Horský park). Six genospecies in *Borrelia*-positive samples were determined. The most frequent was *B. afzelii* followed by *B. garinii* and *B. valaisiana*.

Key words: *Ixodes ricinus*; *Borrelia burgdorferi*; *Anaplasma phagocytophilum*; urban foci

Úvod a formulácia cieľa

V posledných desaťročiach sa vplyvom klimatických a socio-ekonomických zmien sústreďuje čoraz väčší záujem na šírenie kliešťov a nimi prenášaných patogénov spôsobujúcich mnohé závažné ochorenia. Prostredie je limitujúcim faktorom pri prenose zoonóz. Kliešťami prenášané ochorenia sa vyznačujú fenoménom prírodnej ohniskovosti. Z prírodných ohnisk sa infekcia môže šíriť do bezprostrednej blízkosti človeka, čo dokazuje zvýšený výskyt urbánnych a suburbánnych ohnisk. Predpokladom existencie prírodných ohnisk je prítomnosť pôvodcu ochorenia, vektora a citlivého hostiteľa. Vo výskume sme sa zamerali na dva významné kliešťami prenášané patogény: *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) a *Anaplasma phagocytophilum*. Kliešť obyčajný *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) plní funkciu vektora mnohých patogénov vrátane borélií a anaplasiem a zaisťuje tak ich cirkuláciu v rámci prírodných ohnisk. Má široké spektrum hostiteľov a každé životné štádium cicie na inom hostiteľovi, čím sa zvyšuje pravdepodobnosť získania patogénneho agens.

Hlavným cieľom práce bolo určiť prevalenciu patogénov *B. burgdorferi* s.l. a *A. phagocytophilum* v kliešťoch zozbieraných v dvoch urbánnych ekosystémoch a porovnať výsledky s ohľadom na lokalitu a sezónnu dynamiku kliešťov. Pretože sa variabilita u *B.*

burgdorferi s.l. prejavuje i na úrovni patogenity, bolo dôležité stanoviť okrem prevalencie aj zastúpenie jednotlivých genospecies.

Materiál a metódy

Za účelom analýzy prevalencie *B. burgdorferi* s.l. a *A. phagocytophilum* v urbánných ohniskách boli vyšetrené kliešte druhu *I. ricinus* z 2 lokalít v Bratislave: Železná studienka a Horský park. Kliešte boli zbierané metódou vlajkovania (vlnená vlajka rozmeru 100x100 cm). Zbery prebiehali od marca do októbra počas rokov 2011 a 2012.

Izolácia DNA- alkalická hydrolýza

Zozbierané kliešte sme zaradili do druhov pomocou determinačného kľúča a rozdelili podľa vývojových štádií a pohlavia. Patogény sme detegovali len v kliešťoch druhu *I. ricinus*. Na extrakciu DNA sme použili metódu alkalickej hydrolýzy [1]. Získanú DNA sme uchovávali pri teplote – 20 stupňov.

Detekcia patogénov

PCR (polymerázová reťazová reakcia) reakcie boli realizované s použitím PCR kitu (Qiagen). Kvôli zachovaniu sterilných podmienok sme PCR reakčný mix pripravovali v sterilnom PCR boxe. Pripravený mix sme rozpipetovali po 20 µl do 0,2 ml mikroskúmaviek. Do mixu sme pridali 5 µl templátovej DNA. Skúmavky sme krátko scentrifugovali v centrifúge a vložili do PCR termocykléra.

Amplifikácia DNA

Na detekciu borélií sme zvolili amplifikáciu úseku 5S (*rrfA*)-23S (*rrlB*) oblasti intergénového medzerníka s použitím primerov IGSa (5'-CGA CCT TCT TCG CCT TAA AGC -3 ') a IGSb (5'-AGCTCT TAT TCG CTG ATG GTA -3') [2]. Reakčná zmes na jednu vzorku pozostávala z 2,5 µl 10x PCR pufru, 1 µl MgCl₂, 0,5 µl 10x dNTPs, 0,5 µl primer 1, primer 2, 0,125 µl Taq DNA polymerázy a 14,875 µl H₂O.

Vizualizácia amplifikovanej DNA bola robená pomocou horizontálnej elektroforézy za použitia agarózových gélov.

V pozitívnych vzorkách sme ďalej metódou RFLP detegovali jednotlivé genospecies *B. burgdorferi* s.l.

Real-time PCR

Real-time PCR metóda bola použitá na zistenie prítomnosti špecifického úseku DNA *A. phagocytophilum* vo vzorkách. Reakčná zmes na jednu vzorku pozostávala z 2,5 µl 10x PCR pufru, 4,5 µl MgCl₂, 0,5 µl 10x dNTPs, 2,25 µl primer 1, primer 2, 0,31 µl próby, 0,25 µl Taq DNA polymerázy a 7,44 µl H₂O.

Primery pre *A. phagocytophilum* na amplifikáciu génu *msp2* [3]:

ApMSP2f – 5'-ATGGAAGGTAGTGTTGGTTATGGTATT-3'

ApMSP2r – 5'-TTGGTCTTGAAGCGCTCGTA-3'

Próba TaqMan: ApMSP2p-HEX- 5'-TGGTGCCAGGGTTGAGCTTGAGATTG-3'

Reakčnú zmes sme rozpipetovali do PCR stripov a pridali 5 µl DNA. Na detekciu amplifikovaného úseku sme použili Real-time PCR termocyklér.

Metóda RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) – analýza dĺžky reštrikčných fragmentov [2]

Do skúmaviek sme napipetovali 13 µl naamplifikovanej DNA, 0,5 µl enzýmu MseI a 1,5 µl 10x pufru R. Vzorky sme inkubovali cez noc pri teplote 65 °C. Po inkubácii sme do každej vzorky pridali 3 µl farbiva DNA Loading Dye a krátko scentrifugovali. Pripravené vzorky sme naniesli do 12% PAGE (polyakrylamidový) gélu, ktorý sme predtým zaliali elektroforetickým tlmivým roztokom 1×TBE. Separácia produktov prebiehala pri 150 V (180 min.). Po skončení elektroforézy sme gély farbili 25 minút v roztoku zloženom zo 100 ml 1×TBE a 5 µl Sybr Green v trepačke. Fragmenty DNA sme vizualizovali na UV transiluminátore.

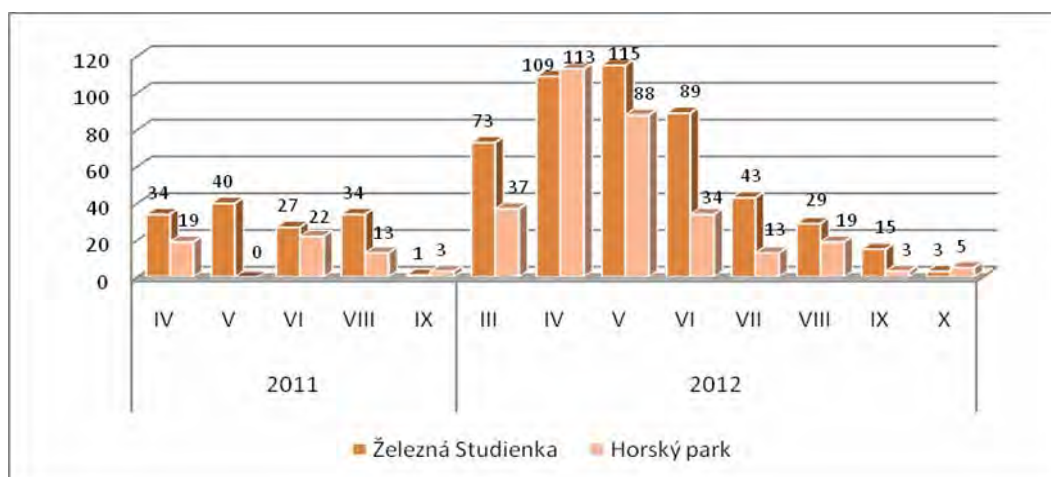
Výsledky a diskusia

Celkovo bolo nazbieraných 981 kliešťov *I. ricinus*, 369 na lokalite Horský park a 612 na lokalite Železná studienka. V obidvoch rokoch boli na obidvoch sledovaných lokalitách dominantné nymfy, s výnimkou mesiaca máj, kde v roku 2011 na lokalite Železná studienka dominovali samce a v roku 2012 samice. V Horskom parku boli najväčšie výkyvy zaznamenané v mesiaci apríl v roku 2011, kedy najväčšiu prevalenciu vykazovali samce a v mesiaci august larvy. Počet všetkých zozbieraných kliešťov v jednotlivých mesiacoch a rokoch znázorňuje Obr. 1. Kliešte *I. ricinus* obvykle vykazujú počas roka dva vrcholy početnosti [4]. Prvý vrchol nastáva koncom jari alebo začiatkom leta a je zväčša výraznejší ako jesenný [5]. K druhej fáze dochádza koncom leta a začiatkom jesene [4]. V posledných

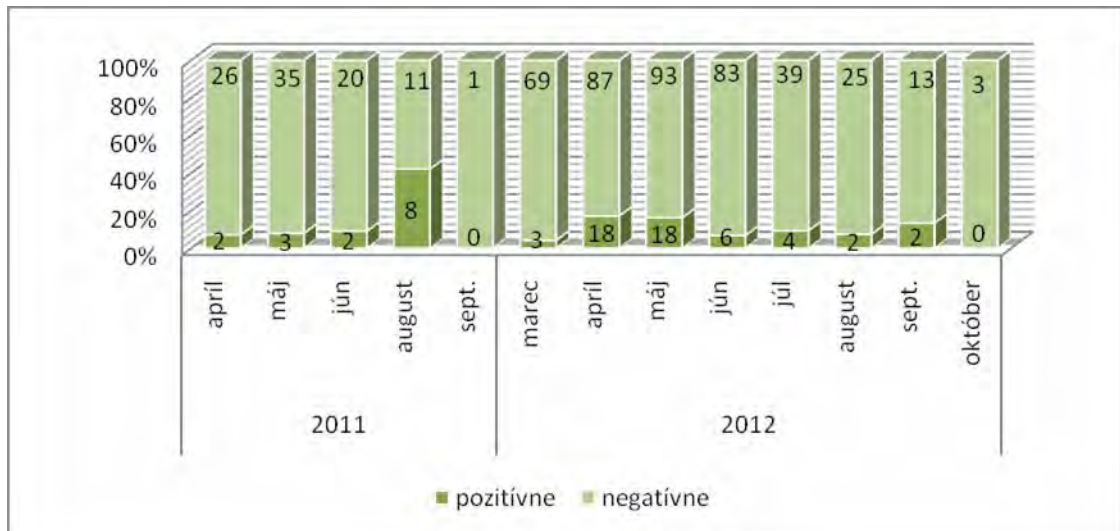
rokoch sa však pravdepodobne vplyvom klimatických zmien tento obraz početnosti kliešťov môže meniť a typická dvojrcholová krivka môže zanikať medzi viacerými menšími vrcholmi počas sezóny, prípadne je zaznamenaný len jeden vrchol početnosti. V našej štúdii sme zaznamenali len prvé maximum. Nízke počty kliešťov na jeseň boli dané nepriaznivými klimatickými podmienkami pre vývin kliešťov.

B. burgdorferi s.l. bola detegovaná v 13,2 % ($n = 123$) kliešťov z celkového počtu 932 vyšetrených, pričom na lokalite Horský park bola zaznamenaná o niečo vyššia prevalencia (15,3 %) ako na lokalite Železná studienka (11,9 %). Prevalencia pozitívnych kliešťov na jednotlivých lokalitách je znázornená na Obr. 2 a 3. *A. phagocytophilum* bola zistená na oboch lokalitách s celkovým počtom 52 pozitívnych kliešťov (5,6 %). Najvyššiu prevalenciu dosahovala v Horskom parku v roku 2012 (7,9%).

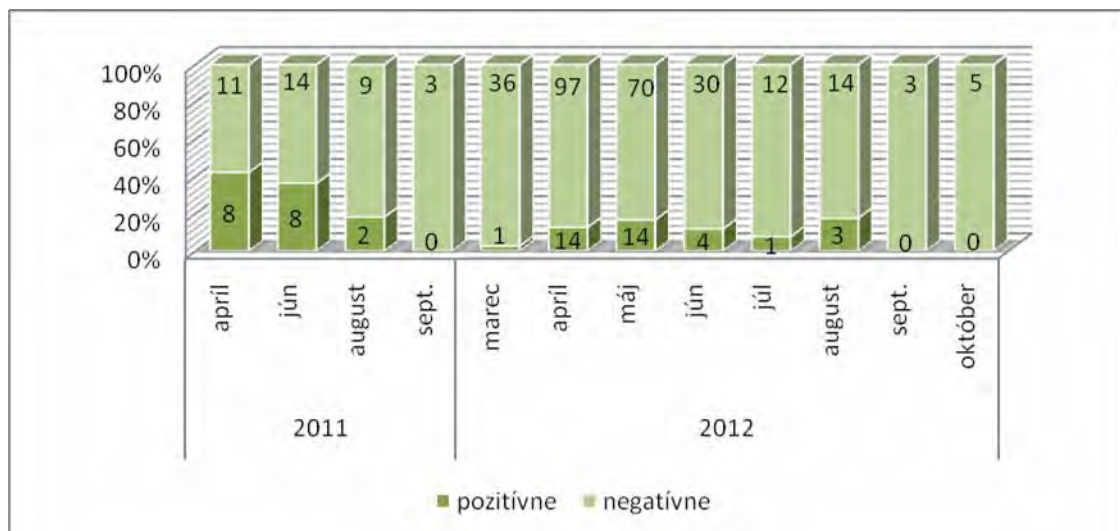
Predchádzajúce štúdie potvrdili, že *A. phagocytophilum*, ale najmä jednotlivé genospecies *B. burgdorferi* s.l. sa špecializujú na skupiny stavovcov, medzi ktorými nachádzajú vhodných rezervoárových hostiteľov, ktorí zabezpečujú udržanie patogénneho agens v prírode. Na lokalite Železná studienka sa početne vyskytujú hlodavce, čo môže byť dôvod dominantného zastúpenia *B. afzelii*, ktorá je v prírode udržiavaná práve hlodavcami [6]. *B. valaisiana* a *B. garinii* boli takisto frekventovane zastúpené na obidvoch lokalitách. Na ich cirkulácii sa podieľajú vtáky [7], ktoré sú početne zastúpené ako na Železnej studienke, tak aj v Horskom parku. Popri viazanosti *A. phagocytophilum* na kopytníky a drobné zemné cicavce bola infekcia dokázaná aj u psov a mačiek [8]. Keďže je v Horskom parku obmedzený výskyt hlodavcov (vlastné pozorovanie) na cirkulácii anaplasiem sa pravdepodobne čiastočne zúčastňujú vtáky a možným rezervoárovým hostiteľom môžu byť aj psy a mačky. Na potvrdenie tejto teórie je však potrebný ďalší výskum.



Obr. 1 Počet zozbieraných kliešťov na lokalitách v jednotlivých mesiacoch



Ob. 2 Prevalencia kliešťov pozitívnych na *B. burgdorferi* s.l. na lokalite Železná studienka v jednotlivých mesiacoch a rokoch.



Ob. 3 Prevalencia kliešťov pozitívnych na *B. burgdorferi* s.l. na lokalite Horský park v jednotlivých mesiacoch.

Záver

Výsledky potvrdili, že aj v mestách existujú, prípadne vznikajú nové ohniská kliešťami prenášaných patogénov. Potvrdili sme prítomnosť patogénnych agens, ktoré sú najčastejšími pôvodcami kliešťami prenosných ochorení (borélia, anaplasma). Na lokalitách sme zaznamenali prítomnosť patogénnych genospecies borélií (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. spielmani*, *B. afzeli*, *B. garinii*), takže riziko infikovania ľudí týmito patogénmi je reálne, keďže sledované lokality sú ľuďmi frekventovane navštevované za rekreačným účelom. Prínosom výskumu môže byť aktívna informovanosť širokej verejnosti pre zlepšenie prevencie prírodne ohniskových nákaz ľudí a zvierat v podmienkach klimatických zmien.

Pod'akovanie

Táto štúdia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Vývoj diagnostických postupov pre detekciu patogénov prenášaných kliešťami a postupov na prípravu vakcín proti kliešťom, (kód ITMS: 26240220044), spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Guy E. C., Stanek G. (1991) *J. Clin. Pathol.* 44, p. 610
- [2] Derdáková M., Baeti L., Peťko B., et al. (2003) *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (1), p. 509
- [3] Courtney J. W., Kostelnik L. M., Zeidner N. S., et al. (2004) *J. Clin. Microbiol.* 42 (7), p. 3164
- [4] Hubálek Z., Rudolf I. (2007) *Mikrobiální zoonózy a saponózy*. Masarykova univerzita, Brno, p. 176
- [5] Egyed L., Élő P., Sréter-Lancz Z., et al. (2012) *Ticks Tick Borne Dis.* 3, p. 90
- [6] Hanincová K., Schäfer S. M., Etti S., et al. (2003) *Parasitology.* 126, p. 11
- [7] Tarageľová V., Koči J., Hanincová K., et al. (2008) *Appl. Environ. Microbiol.* 74, p. 1289
- [8] Tozon N., Petrovec M., Avsic-Zupanc T. (2003) *Ann N Y Acad Sci.* 990, p. 424

Gén *GJB6*, autozomálne recesívne formy hluchoty a hluchotu spôsobujúce mutácie v mitochondriálnom genóme

Magdaléna Vaváková, Marian Baldovič, Lukáš Šebest

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15, Bratislava, Slovenská Republika; magdalena.vavakova@gmail.com

Abstrakt

Genetic counseling focused on probands and nearest family of patients with a genetically transmitted disease is based on knowledge about prevalence of this disease in concrete population. Aim of the study was to assess presence and subsequently frequency of mutations in the gene *GJB6* and in the selected regions of mitochondrial genome that cause non-syndromic deafness. Detected variability of the gene *GJB6* was represented by 0.31% (1/321) presence of heterozygote for frameshift mutation c.312 delC and 0.31% (1/318) presence of deletion Δ (*GJB6*-D13S1830) also in heterozygote state. This mutation is however extremely rare in the central Europe. Pathogenic mutation A1555G located in mitochondrial genome was detected in 0.93% (3/323) cases, what correlate with frequency of this mutation in Germany.

KLúčové slová: nesyndromatická hluchota; mutácie v géne *GJB6*; mutácie v mitochondriálnej DNA

Úvod a formulácia cieľa

Bilaterálnou stratou sluchu nad 40 decibelov trpí 1: 500 novorodencov. V adolescencii táto frekvencia stúpne na 1: 290. Hluchota môže byť geneticky podmienená (50%), alebo môže vzniknúť na základe vplyvov prostredia (úrazy hlavy, vystavenie nadmernému hluku, novorodenecká žltáčka, cytomegalovírus, toxoplazmóza, atď.). Môže sa vyskytovať ako samostatné ochorenie (nesyndromatická hluchota), alebo spolu s ďalšími postihnutiami a fenotypickými príznakmi (syndromatická hluchota) [1-4].

Nesyndromatická hluchota predstavuje 70% geneticky podmienenej straty sluchu. Môže byť spôsobená mutáciami vo viac ako 130 lokusoch a 50 génoch. Genetický prenos hluchoty je spojený so všetkými známymi typmi dedičnosti, t.j. dedičnosti autozomálne dominantnej aj recesívnej, viazanej na pohlavné chromozómy (X aj Y) a prenosom mutácií matrilineárnou dedičnosťou [2-7].

Mutácie v géne *GJB2* sú zodpovedné až za 50% prípadov nesyndromatickej hluchoty s autozomálne recesívnou dedičnosťou [8]. Gén *GJB2* má pritom najväčšiu sekvenčnú podobnosť s génom *GJB6*, ktorý sa nachádza pribl. 30 kb upstram od *GJB2*. Táto blízkosť vytvára predpoklady vzájomnej interakcie regulačných mechanizmov a spoločnej génovej expresie oboch génov [9-11]. Gén *GJB6* patrí do rodiny *gap junction beta* proteínov a je kódovaný šiestimi exónmi. Splicing exónov je tkanivovo špecifický, pričom len exón 5 je prítomný u všetkých transkriptov. Aminokyselinovú (AK) sekvenciu tvorí jediný prepisujúci

exón, pozostávajúci z 261 AK dlhého polypeptidového reťazca [9, 12]. Gén kóduje tzv. konexín 30 (Cx30), ktorý má molekulárnu hmotnosť ~30 kDa. Šesť konexínov vytvára konexón. Medzi dvomi konexónmi lokalizovanými v susedných bunkách vzniká *gap junction*. Toto spojenie umožňuje medzibunkovú komunikáciu a transport molekúl menších ako 1,2 kDa. V prípade vnútorného ucha zabezpečuje homeostázu hlavne draslíkových iónov (K^+) v endolymfe. Jej narušenie vedie k hromadeniu K^+ v extracelulárnom priestore a k apoptóze vláskových buniek, čo znemožňuje správne fungovanie sluchového orgánu [9-11, 13, 14]. Najčastejšími mutáciami v géne *GJB6* sú 309 kb delécia $\Delta(GJB6-D13S1830)$ [15] a 232 kb delécia $\Delta(GJB6-D13S1854)$ [16]. $\Delta(GJB6-D13S1830)$ sa vyskytuje hlavne v krajinách subtropického pásma, s frekvenciou do 40% (Španielsko, Francúzsko) [17]. $\Delta(GJB6-D13S1854)$ predstavuje vzácnejšiu deléciu, s frekvenciou okolo 2,2% [16]. Obe delécie sa vyskytujú hlavne v *trans* stave s ľubovoľnou mutáciou vyvolávajúcou hluchotu v géne *GJB2* (digénna dedičnosť), ale je publikovaný prípad pacienta heterozygotného pre 309 kb deléciu a zároveň pre 232 kb deléciu [16].

Mutácie v mitochondriálnom genóme spôsobujúce nesyndromatickú hluchotu sa vyskytujú takmer výhradne v géne *MT-RNTR1* kódujúcom 12S rRNA a géne *MT-TS1* pre serínovú tRNA (tRNA_{ser}) [6]. Najčastejšou mutáciou je A1555G (podľa číslovania [18]), ktorá sa v európskych populáciách a bez vplyvu modifikátorov pochádzajúcich z vonkajšieho prostredia (napr. ototoxické liečivá) vyskytuje vo frekvencii 0,6 – 1,8% [19]. Mutácia sa vyskytuje nezávisle od haploskupinovej príslušnosti pacientov, ale v niektorých haploskupinách bola detegovaná vo zvýšenej miere (H3, B5b). [20-22]. Mutácia znižuje množstvo nasyntetizovaných mitochondriálnych proteínov a zhoršuje presnosť translácie mitochondriálnej rRNA kvôli zmene párovania báz a destabilizácii sekundárnych a terciálnych štruktúr 12S rRNA [23, 24].

Cieľom práce bolo zistiť prevalenciu mutácií v géne *GJB6* a vo vybraných úsekoch mitochondriálneho genómu spôsobujúcich nesyndromatickú hluchotu v slovenskej populácii.

Materiál a metódy

Vzorky DNA boli izolované z periférnej krvi modifikovanou fenol-chloroformovou extrakciou podľa [25]. 321-324 vzoriek pacientov trpiacich nesyndromatickou hluchotou u ktorých bola zistená jedna alebo žiadna mutácia v géne *GJB2* bolo následne sekvenovaných pomocou prístroja ABI 3130xl Genetic Analyser (APPLIED BIOSYSTEMS, USA). Oligonukleotidové primery pre PCR a sekvenačné reakcie boli navrhnuté pomocou programu *Primer 3* [26]. Sekvencia primerov a dĺžka sekvenovaných PCR produktov je uvedená v

Tab. 1. Teplotný program PCR pre prepisujúci exón génu *GJB6*, 516-1 689 nukleotid génu pre 12S rRNA a 7 215-7 666 nukleotid génu pre tRNA_(ser) zahrňoval 32 cyklov s 40 sekundovou denaturáciou pri 94°C, anelačnou teplotou špecifickou pre každý fragment (63°C pre *GJB6*, 62,5°C pre 12S rRNA a 61,5°C pre tRNA_(ser)) po dobu 40 sekúnd a polymerizáciou pri 72 °C po 45 sekúnd. Počiatočná denaturácia trvala 3 minúty a záverečná polymerizácia 7 minút.

309 kb delécia v géne *GJB6* bola detegovaná podľa postupu [27] s upraveným teplotným programom a s pridaním betaínu a MgCl₂ na zlepšenie amplifikácie PCR. 33 krát opakovaný cyklus pozostával z 15 sekundovej denaturácie pri 95°C, 15 sekundovej anelácie pri 55°C a 15 sekundovej polymerizácie pri 72°C. Počiatočná denaturácia prebiehala 5 minút a záverečná polymerizácia 7 minút.

Tab. 1 Tabuľka znázorňuje sekvencie primerov a dĺžku PCR produktov pre gény *GJB6*, 12S rRNA (*MT-RNR1*) a tRNA pre serín (*MT-TS1*). Primery pre detekciu 309kb delécie (*GJB6del*) boli prevzaté od [27], pričom del30KF a del30KR predstavujú primery pre detekciu kontrolnej, nedeletovanej alely. del30F a del30R reprezentujú primery amplifikované v prípade prítomnosti alely s deléciou.

Gén	Názov primeru	Sekvencia primeru	Dĺžka PCR produktu
GJB6	GJB6ex4F	5'CCTTTGCCCACTTTTGTCTG	894bp
	GJB6ex4R	5'GGTTGGTATTGCCTTCTGGA	
GJB6del	del30KF	5'GCCCTCCAGCTGATCTTCGTCTC	177bp
	del30KR	5'GTACGTCCACCACAGCGACCC	
	del30F	5'AACCACCATTCCACCTTCCGTCTCT	164bp
	del30R	5'CACGGTCTTCTCTGTTGGCCTAGA	
MT-RNR1	rRNA_F	5'CACACACACCGCTGCTAA	1174bp
	rRNA_R	5'TGGGGCTAGGTTTAGCTCAG	
MT-TS1	tRNA_F	5'CGACGTTACTCGGACTACCC	452bp
	tRNA_R	5'GGCGTGATCATGAAAGGTG	

Výsledky a diskusia

Sekvenovanie 261AK génu *GJB6* u 321 pacientov odhalilo dva typy frameshiftových mutácií v heterozygotnej forme. U 0,62% prípadov (2/321) došlo k inzercii A na pozícii c.682-689 (N230K), čo vyvolalo vznik STOP kodónu o 10 AK ďalej. Mutácia spôsobila delécia 21 AK na C-terminálnom konci polypeptidu, ktorý je nekonzervovaný medzi odlišnými ľudskými konexínmi aj v rámci medzidruhového porovnania polypeptidovej sekvencie Cx30 [28, 29]. Vplyv konkrétneho frameshiftu však nie je podložený publikáciami a jeho vplyv na fenotypický prejav hluchoty je otázný. Delécia C na pozícii c.312 (R104R) sa

vyskytla v 0,31% prípadov (1/321). Nepôvodný STOP kodón vznikol na 114. AK, v dôsledku čoho bolo deletovaných 56% polypeptidového reťazca. Frameshift tak spôsobil deléciu vysoko konzervovaných cysteínov v druhom extracelulárnom ohybe. Porušením disulfidových mostíkov medzi prvým a druhým extracelulárnym ohybom bolo znemožnené ukotvenie konexínu a teda aj správne fungovanie hemikanálu. Delécia taktiež narušila schopnosť konexínu uzatvárať kanál na základe zmeny hladiny pH v bunke, za ktoré zodpovedá čiastočne deletovaný cytoplazmatický ohyb a pravdepodobne aj úplne deletovaný C-terminálny koniec molekuly [28, 30].

V 0,31% prípadoch (1/318) bola detegovaná prítomnosť 309 kb delécie ($\Delta GJB6$ -D13S1830) v heterozygotnej forme na základe elektroforetickej analýzy PCR produktu. Delécia bola následne overená sekvenovaním pomocou primerov pre amplifikáciu úseku DNA s miestom zlomu, ktorý spája časť génu *GJB6* s časťou susedného génu lokalizovaného 309 kb upstream (primery del30F a del30R, vid' **Tab. 1**). Doplňujúcou mutáciou potrebnou pre vznik hluchoty digénnou dedičnosťou bola u pacienta už skôr zistená mutácia *35delG* v géne *GJB2*. Prítomnosť 309 kb delécie je v strednej Európe veľmi vzácna. Jej prítomnosť nebola potvrdená v Rakúsku. V Nemecku boli zaznamenaní dvaja hluchí pacienti s deléciou v spojení s mutáciou *35delG* v *GJB2* géne. V Českej republike bol detegovaný jeden prípad heterozygota pre deléciu. Doplňujúcou mutáciou spôsobujúcou stratu sluchu však bola mutácia *313del14* v géne *GJB2* [27, 31-33]. Prítomnosť 309 kb delécie v heterozygotnom stave v slovenskej populácii u jediného pacienta potvrdzuje vzácnosť výskytu mutácie v strednej Európe.

V géne pre tRNA_{ser} nebola u 325 sekvenovaných vzorkách pacientov detegovaná žiadna patologická zámena báz spájaná s hluchotou alebo iným ochorením.

Vo vybranom úseku 12S rRNA bol spomedzi 323 sekvenovaných vzoriek identifikovaný jeden typ patogénnej mutácie vyvolávajúcej nesyndromatickú hluchotu (A1555G) prítomný u troch nepríbuzných jedincov (0,93% prípadov). Frekvencia mutácie bola porovnateľná s frekvenciou detegovanou u nemeckej populácie (0,7%), ale bola nižšia než v prípade poľskej populácie (2,4 - 3,6%) [19, 34].

Záver

Sekvenovaním súboru pacientov trpiacich nesyndromatickou hluchotou sme detegovali jeden typ patogénnej mutácie v mitochondriálnom genóme vyvolávajúcu stratu sluchu (A1555G) a zistili sme jej prevalenciu v slovenskej populácii. Analýzou vzoriek sme

tiež detegovali heterozygota pre 309 kb deléciu zasahujúcu gén *GJB6* a identifikovali sme dva typy frameshiftových mutácií v jeho jedinom prepisujúcom exóne.

Zisťovanie prevalencie mutácií pri ochoreniach dedených viacerými génmi je dôležité pre stanovenie najvhodnejšej rutínnej analýzy, ktorá by detegovala najčastejšie sa vyskytujúce mutácie spôsobujúce stratu sluchu v konkrétnej populácii. Dosiahnuté výsledky tiež umožňujú poskytnúť hluchým pacientom a ich rodinám odborné genetické poradenstvo o predispozíciách prenosu ochorenia do ďalších generácií.

PodĎakovanie

Moje podĎakovanie patrí kolektívu Katedry molekulárnej biológie UK a tiež v všetkým osobám, ktoré mi poskytli rady a podporu pri spracovaní tejto práce.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Morton NE. (1991) *Ann N Y Acad Sci.* 630, p. 16
- [2] Van Camp G., Willems PJ., Smith RJ. (1997) *Am J Hum Genet.* 60(4), p. 758
- [3] Gorlin RJ., Toriello HV., Cohen MM. (1995) *Hereditary hearing loss and its syndromes.* Oxford university press, Oxford, UK, p. 43
- [4] Bitner-Glindzicz M. (2002) *Br Med Bull.* 63, p. 73
- [5] Song MH., Lee KY., Choi JY., et al. (2012) *Front Biosci (Elite Ed).* 4, p. 924
- [6] Hilgert N., Smith RJ., Van Camp G. (2009) *Mutat Res.* 681(2-3), p. 189
- [7] Wang QJ., Lu CY., Li N., et al. (2004) *J Med Genet.* 41(6), p. 80
- [8] Zelante L., Gasparini P., Estivill X., et al. (1997) *Hum Mol Genet.* 6, p. 1605
- [9] Dahl E., Manthey D., Chen Y., et al. (1996) *J Biol Chem.* 271(30), p. 17903
- [10] Ahmad S., Chen S., Sun J., et al. (2003) *Biochem Biophys Res Commun.* 307(2), p. 362
- [11] Forge A., Marziano NK, Casalotti SO., et al. (2003) *Cell Commun Adhes.* 10(4-6), p. 341
- [12] Essenfelder GM., Larderet G., Waksman G., et al. (2005) *Gene.* 350(1), p. 33
- [13] Robinson SR., Hampson EC., Munro MN, et al. (1993) *Science.* 262(5136), p. 1072
- [14] Kikuchi T., Adams JC., Mizabe Y., et al. (2000) *Med Electron Microsc.* 33(2), p. 51
- [15] del Castillo, I., Villamar M., Morelo-Pelayo MA., et al. (2002) *N Engl J Med.* 346(4), p. 243
- [16] del Castillo FJ., Rodríguez-Ballesteros M, Alvarez A., et al. (2005) *J Med Genet.* 42(7), p. 588

- [17] del Castillo I., Moreno-Pelayo MA., del Castillo FJ et al. (2003) *Am J Hum Genet.* 73(6), p. 1452
- [18] Andrews RM., Kubacka I., Chinnery PF., et al. (1999) *Nat Genet.* 23(2), p. 147
- [19] Kupka S., Tóth T., Wróbel M., et al. (2002) *Hum Mutat.* 19(3), p. 308
- [20] Achilli A., Rengo C., Magri C., et al. (2004) *Am J Hum Genet.* 75(5), p. 910
- [21] Lu J., Qian Y., Li Z., et al. (2011) *Mitochondrion.* 10(1), p. 69
- [22] Yao, YS., Salas A., Bravi CM., et al. (2006) *Hum Genet.* 119(5), p. 505
- [23] Guan MX., Fishel-Ghodsian N., Attardi G. (1996) *Hum Mol Genet.* 5(7), p. 963
- [24] Hobbie SN., Bruell CM., Akshaz S., et al. (2008) *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(9), p. 3244
- [25] Kunkel LM., Smith KD., Boyer SH et al. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(3), p. 1245
- [26] Rozen S., Skaletsky H. (2000) *Methods Mol Biol.* 132, p. 365
- [27] Gunther B., Steiner A., Nekahm-Heis D., et al. (2003) *Hum Mutat.* 22(2), p. 180
- [28] Yaeger M., Nicholson BJ. (1996) *Curr Opin Struct Biol.* 6(2), p. 183
- [29] Ru B., Han N., He G., et al. (2012) *Biochem Genet.* 50(3-4), p. 213
- [30] Morley GE., Taffet SM., Delmar M. (1996) *Biophys J.* 70(3), p. 1294
- [31] Frei K., Ramsebner R., Lucas T., et al. (2004) *Hear Res.* 196(1-2), p.1 15
- [32] Seeman P., Bendová O., Rasková D., et al. (2005) *Ann Hum Genet.* 69(1), p. 9
- [33] Bolz H., Schade G., Ehmer S., et al. (2003) *Hear Res.* 188(1-2), p. 42
- [34] Rydzanicz M., Wróbel M., Pollak A., et al. (2010) *Biochem Biophys Res Commun.* 395(1) p. 116

Vplyv prenatálne a perinatálne navodenej hypertenzie na správanie potkana laboratórneho vo vyvýšenom bludisku tvare plus

Henrieta Végešiová, Lucia Kršková

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Mlynská dolina B2, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika; quinzinka@gmail.com

Abstrakt

Hypertension is known as one of the most dangerous cardiovascular affection and even after great interest, doctors and scientists are still unable to clarify the reason of its origin. The origin is closely associated with the process of fetal programming. Activation of renin-angiotensin-aldosterone system could lead to development of hypertension in postnatal life, what includes many physiological and behavioral changes. The aim of our experiment was to observe an influence of prenatally and perinatally induced high blood pressure on behavioral indicators – anxiety and emotionality in *Ratus norvegicus* strain Wistar. We tested animals in three ontogenetic stages (weaning, puberty, adulthood) in the elevated plus-maze test. Elevated levels of Ang II during prenatal stage and high salt diet during perinatal stage didn't affect the level of anxiety and emotionality in our test.

Kľúčové slová: hypertenzia; anxiety; emocionalita; prenatálne programovanie.

Úvod a formulácia cieľa

Kardiovaskulárne ochorenia sú v dnešnej dobe považované za najčastejšiu príčinu úmrtí vo svete a predstavujú až 30% zo všetkých úmrtí [1]. Hypertenzia je jedným z najzávažnejších kardiovaskulárnych ochorení a napriek záujmu zo strany lekárov a vedcov ostáva jej patogenéza dodnes nejasná. Podľa [2] ide o multifaktoriálne ochorenie, dané množstvom environmentálnych faktorov prelínajúcich sa v interakcii s ešte nedeterminovanou genetickou predispozíciou a kontrolnými mechanizmami tlaku krvi. Arteriálna hypertenzia je definovaná ako dlhodobé zvýšenie hodnôt arteriálneho krvného tlaku, kedy hodnota systolického tlaku presahuje 140 mmHg a hodnota diastolického tlaku 90 mmHg [3].

Vznik hypertenzie je veľmi úzko spojený s procesom fetálneho naprogramovania. Teória fetálneho pôvodu ochorení predpokladá, že zmeny vo výžive plodu a zmeny endokrinného stavu matky majú za následok vznik vývojových modifikácií, ktoré natrvalo zmenia štruktúru, fyziológiu a metabolizmus jedinca. Vzniká tým predispozícia pre vznik viacerých závažných ochorení, vrátane kardiovaskulárnych v neskoršom živote jedinca [4]. Podľa prieskumov majú deti hypertenzných matiek zvýšený tlak [5]. Podradovský (1991) [6] zistil takmer zákonitý vzťah medzi primárnou hypertenziou u matky a hypotrofiou ľudského plodu, ako aj predčasnými pôrodmi intrauterinne odumretých plodov. Zistenie existencie

tohto vzťahu teda taktiež podporuje myšlienku dôležitosti prenatálneho prostredia pre proces fetálneho programovania mechanizmov kontroly arteriálneho tlaku [7].

Dôležitú úlohu v regulácii krvného tlaku majú jednotlivé komponenty renín-angiotenzín-aldosterónového systému (RAAS). Kľúčovú úlohu hrá angiotenzín II (Ang II). Ide o vazokonstrikčný hormón, ktorého účinok sa prejavuje zvýšenou vaskulárnou rezistenciou a zvýšením krvného tlaku [8]. K zmenám v tlaku krvi prichádza aj po prenatálnom vystavení Ang II [9], aj keď bližšie informácie o mechanizmoch takéhoto účinku v nami dostupnej literatúre absentujú. Ang II pôsobí prostredníctvom vlastných špecifických receptorov, pričom základnými typmi sú AT₁ a AT₂ receptory [10]. Oba typy receptorov sú prítomné vo vybraných oblastiach CNS, ktoré hrajú dôležité úlohy v regulácii homeostázy telových tekutín a elektrolytov v kardiovaskulárnom systéme [11]. Oba receptory sú prítomné aj vo fetálnom mozgu [12].

Veľmi výrazné sú aj behaviorálne účinky Ang II, kde zvýšené hladiny spôsobujú kognitívne dysfunkcie, zmenu emocionality a navodzujú depresie a anxiétu [13]. Anxiogenický účinok Ang II sa zisťuje na základe výsledkov z Vogelovho konfliktného testu a z elevated plus maze testu [14].

Hypertenzné TGR potkany so zvýšenou aktivitou RAAS vykazujú v elevated plus maze teste anxióznejší profil ako kontrolné Sprague-Dawley potkany, čo sa spája so zvýšenou hladinou mozgového angiotenzínu a prudkou hypertenziou [15] týchto jedincov, ktorá sa prejavuje aj zvýšenou emocionalitou. Anxióznejší profil hypertenzných potkanov so zvýšenou aktivitou RAAS môže byť spojený so zmenami v mozgovom serotonergickom systéme. Medzi hypertenznými potkanmi so zvýšenou aktivitou RAAS a kontrolou však neboli počas elevated plus maze testu zistené rozdiely v uvoľňovaní noradrenalínu [16]. Neuroanatomickým miestom anxiogenických účinkov Ang II môže byť amygdala obsahujúca AT₁ a AT₂ receptory a AT₂ receptory nachádzajúce sa v *locus coeruleus* [12]. Obe štruktúry sa podieľajú na tvorbe emocionálneho správania [17].

V snahe získať čo možno najviac informácií o vplyve narušenia činnosti RAAS matky na postnatálne zmeny v správaní potomstva, sme si za cieľ našej práce stanovili sledovanie vplyvu prenatálne a perinatálne navodenej hypertenzie na vybrané behaviorálne ukazovatele. Svoju pozornosť sme upriamili na anxiétu a emocionalitu potkana laboratórneho v období odstavu, puberty a dospelosti.

Materiál a metódy

Rodičovskú generáciu predstavovalo 6 samíc a 2 samci kmeňa Wistar pochádzajúce z VELAZ Praha, CZ. Po povinnej týždňovej karanténe boli samice rozdelené na základe frekvencie motorickej aktivity z testu otvoreného poľa (pomocou využitia automatickej záznamovej aparatury Conducta) do troch z hľadiska excitability vyrovnaných skupín: kontrolnej (K: n=2), kontrolnej soľnej (Ks: n=2) a pokusnej angiotenzínovej (A: n=2). Zvieratá sa chovali v akreditovanom zverinci Katedry živočíšnej fyziológie a etológie PRIF UK v Bratislave, v klietkach z plastu o rozmeroch 38x59x20 cm s hoblinovou podstielkou, v počte 2-3 jedince na klietku. Vo zverinci bol zabezpečený regulovaný svetelný režim svetlo : tma 12:12 so začiatkom svetelnej fázy o 7:00 hod do 19:00 hod. SEČ, priemerná teplota $21 \pm 2^\circ\text{C}$ a relatívna vlhkosť $55 \pm 5 \%$. Vodu a potravu (štandardná krmná zmes SOD 2b) mali zvieratá *ad libitum*. Samice boli následne pripárované. Fázy ovulačného cyklu a neskôr graviditu sme určovali podľa Gleich a Froberg [18]. Odbery prebiehali v čase od 7:00 do 8:00 hod. Prítomnosť spermii vo vaginálnom sekréte samíc sme považovali za 0.-tý deň gravidity. Rodičovské zvieratá sme po určení fázy ovulačného cyklu pripustili v pomere 3 samice : 1 samec. Po úspešnom pripustení boli samice a samce oddelené a odchovávané v pôvodnom zložení podľa príslušnosti svojej skupiny (K, Ks, A) až do 20. dňa gravidity.

Na prenatálne navodenie hypertenzie sme A samiciam na 5.- 6. deň gravidity implantovali subkutánne osmotické pumpičky (Alzet model 2002), z ktorých bol angiotenzín II (koncentrácia 19,23 mg/ml vo fyziologickom roztoku) uvoľňovaný kontinuálne, v množstve 10 µg/kg/hod počas 14 dní. Priemerný objem pumpičiek bol 213 (± 12) µl a priemernú rýchlosť uvoľňovania roztoku 0,52 ($\pm 0,03$) µl/h. V pumpách bol použitý Ang II (Angiotensin II, Human, Cat. No. 05-23-0101, Calbiochem, USA). K a Ks samice boli podrobené Sham operácii, počas ktorej sme im implantovali oválny predmet intaktného materiálu, tvaru a veľkosti alzetovej pumpičky. Perinatálne bola u Ks skupiny hypertenzia vyvolaná príjmom soľnej diéty.

Tri dni pred pôrodom boli samice rozdelené do samostatných klietok až do odstavu mláďat. Po pôrode boli K a Ks vrhy optimalizované na 8 mláďat (4 samce: 4 samice) a ponechané pod matkou až do dosiahnutia 50 g hmotnosti a následne odstavené. Kvôli malej početnosti vrhov A (spolu 5 samcov + 3 samice) boli pod matkami ponechané všetky živo narodené mláďatá, pričom z dôvodu úmrtia jedincov sme ďalej sledovali len 3 samcov a 2 samice. Samice boli so svojimi vhrmi (po odstave už len potomstvo) umiestnené jednotlivo v klietkach s *ad libitum* prístupom k vode a potravu (K- štandardná krmná zmes MP-OŠ-06; Ks, A – v období od pôrodu – štandardná krmná zmes MP-OŠ-06 s 2% koncentráciou NaCl).

Potomstvo (K samce: n=8 , K samice: n=8, Ks samce: n=8, Ks samice: n=8 a A samce: n=3, A samice: n=2) bolo podrobené testovaniu vo vyvýšenom bludisku v tvare plus (EPM), pričom správanie každého jedinca bolo zaznamenávané za využitia kamerového systému Logitech Quickcam E 2500 pomocou softvéru Debut Video Capture Software v.1.42 (Nch Software, USA). Testovanie prebiehalo v odpoľudňajších hodinách od 13:00 do 18:00 hodiny, v 3 obdobiach ontogenézy: v období odstavu (25. deň), v puberte (47. deň) a v dospelosti (77. deň). Bludisko bolo umiestnené vo výške 50 cm, jeho ramená mali dĺžku 50 cm, šírku 10 cm, výška uzavretých ramien bola 40 cm. Testované zviera sme umiestnili do stredu priesečníka ramien, tzv. centrálnej zóny, hlavou smerom do uzavretého ramena.. Počas piatich minút sme zaznamenávali: dobu latencie (s) - čas, za ktorý sa zviera odhodlá k vstupu do jednotlivého ramena; čas strávený v otvorených ramenách (s); čas v uzavretých ramenách (s); čas strávený v centrálnej zóne (s) a počet prechodov do jednotlivých ramien (frekvencia výskytu). Za prechod do ramena sme považovali prejdenie hranice ramena oboma prednými labkami. Miera anxiety bola hodnotená na základe celkového počtu vstupov do otvorených a uzavretých ramien (s), času stráveného v otvorených ramenách a pomeru času stráveného v otvorených ramenách: celkový čas v ramenách x 100.

Mieru anxiety a emocionalitu sme hodnotili za využitia štatistického softvéru STATISTICA v 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA). Dáta sme analyzovali multifaktorovou analýzou rozptylu (ANOVA) s opakovaním s fixnými faktormi skupina, pohlavie a vek. Variabilitu medzi vrhmi sme v analýze zohľadnili ako faktor vrhu testovaný v rámci skupiny. V prípade zistenia signifikancie sme dáta následne analyzovali za využitia Fisherovho LSD post hoc testu.

Výskum bol schválený etickou komisiou PRIF UK v Bratislave.

Výsledky a diskusia

Za využitia multifaktorovej analýzy rozptylu sme existenciu signifikantných rozdielov medzi nami testovanými skupinami v žiadnom období ontogenézy nezistili (tab. 1-3). Prenatálne vystavenie Ang II (a následná postnatálna soľná diéta), a ani perinatálne vystavenie 2% soľnej diéte teda anxiety, a ani emocionalitu zvierat neovplyvnilo a to aj napriek skutočnosti, že u nami testovaných A a Ks zvierat zaznamenal Svitok (2012) [9] zvýšené hodnoty systolického tlaku krvi. Na základe údajov vyššie citovaného autora, ale aj literárnych údajov o účinkoch zvýšenej hladiny Ang II na anxiety [13] sme predpokladali, že aj u nami testovaných zvierat príde k ich narušeniu, čo sa nám však nepotvrdilo.

Nami získané výsledky môžu byť ovplyvnené malým počtom použitých zvierat. Či k zmenám v anxiete a emocionalite naozaj nedochádza by nám tiež mohli odhaliť výsledky ďalších testov zameraných na výskum týchto foriem správania. U A skupiny zvierat si tiež treba uvedomiť, že išlo o transplacentárny prechod Ang II, ktorého účinok na úrovni CNS je potrebné objasniť ďalším výskumom.

Tab. 1 Výsledky sledovaných behaviorálnych parametrov kontrolnej (K: n=16), kontrolnej soľnej (Ks: n=16) a angiotenzínovej (A: n=5) skupiny v EPM teste v období odstavu

Sledované behaviorálne parametre	Odstav		
	K	Ks	A
ANXIETA			
čas v otvorenom ramene (OR) (s)	39,62 ± 5,17	32,77 ± 6,64	36,76 ± 7,35
celkový počet vstupov (OR + UR) (frekvencia)	7,25 ± 0,85	7,75 ± 1,05	8,40 ± 1,81
% času v OR z celkového času testovania	13,21 ± 1,72	10,92 ± 2,21	12,25 ± 2,45
EMOCIONALITA			
čistenie (s)	30,18 ± 6,16	32,72 ± 7,61	21,24 ± 4,53
defekácia (frekvencia)	0 ± 0	0,19 ± 0,19	0,80 ± 0,80

Hodnoty sú udávané ako priemer ± S.E.M. Signifikantné rozdiely medzi nami testovanými skupinami v období odstavu neboli zistené.

Tab. 2 Výsledky sledovaných behaviorálnych parametrov kontrolnej (K: n=16), kontrolnej soľnej (Ks: n=16) a angiotenzínovej (A: n=5) skupiny v EPM teste v období puberty

Sledované behaviorálne parametre	Puberta		
	K	Ks	A
ANXIETA			
čas v otvorenom ramene (OR) (s)	23,81 ± 5,89	25,65 ± 7,72	29,28 ± 13,25
celkový počet vstupov (OR + UR) (frekvencia)	9,06 ± 1,54	8,94 ± 1,67	7,80 ± 2,93
% času v OR z celkového času testovania	7,79 ± 1,96	8,55 ± 2,57	9,76 ± 4,42
EMOCIONALITA			
čistenie (s)	12,84 ± 5,07	9,87 ± 3,24	24,58 ± 9,08
defekácia (frekvencia)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Hodnoty sú udávané ako priemer ± S.E.M. Signifikantné rozdiely medzi nami testovanými skupinami v období puberty neboli zistené.

Tab. 3 Výsledky sledovaných behaviorálnych parametrov kontrolnej (K: n=16), kontrolnej soľnej (Ks: n=16) a angiotenzínovej (A: n=5) skupiny v EPM teste v období dospelosti

Sledované behaviorálne parametre	Dospelosť		
	K	Ks	A
ANXIETA			
čas v otvorenom ramene (OR) (s)	40,88 ± 6,10	25,81 ± 6,88	18,89 ± 8,29
celkový počet vstupov (OR + UR) (frekvencia)	13,75 ± 1,42	12,75 ± 1,62	7,00 ± 2,93
% času v OR z celkového času testovania	13,63 ± 2,03	8,60 ± 2,29	6,30 ± 2,76
EMOCIONALITA			
čistenie (s)	6,85 ± 2,41	3,69 ± 1,69	10,50 ± 8,63
defekácia (frekvencia)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Hodnoty sú udávané ako priemer ± S.E.M. Signifikantné rozdiely medzi nami testovanými skupinami v období dospelosti neboli zistené.

Záver

Prenatálne vystavenie Ang II (a následná postnatálna soľná diéta), a ani perinatálne vystavenie soľnej diéte anxiétu, a ani emocionalitu sledovaných zvierat testovaných vo vyvýšenom bludisku v tvare plus neovplyvnilo.

Pod'akovanie

Tento projekt bol zrealizovaný vďaka grantu VEGA 1/0686/12 a VEGA 2/0107/12

Zoznam použitej literatúry

- [1] Lee D. E., Cooper R. S. (2009) *Curr. Hypertens. Rep.* 11, p. 444
- [2] Sninčák M., Kujaník Š. (2004) *Vojenské zdravotnícke listy.* 73(4), p. 130
- [3] Tatár M., Lauko Ľ. (2007) *Patologická anatómia a patologická fyziológia.* Osveta, Martin, p. 126
- [4] Godfrey K. M., Barker D. J. P. (2001) *Public Health Nutr.* 4, p. 611
- [5] Barker D. J. P. (1998) *Clin. Sci.* 95, p. 115
- [6] Podradovský K. (1991) *Hypotrofia plodu a novorodenca.* Osveta, Martin, p. 36
- [7] Granger J. P. (2002) *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 283, p. 1289
- [8] Langley-Evans S. C. (2001) *Proc Nutr Soc.* 60, p. 505
- [9] Svitok P. (2012) *Dôsledky fetálnych manipulácií na reguláciu tlaku krvi v dospelosti u potkanov.* (Diplomová práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p. 102
- [10] Souček M., Kára T. (2002) *Klinická patofyziologie hypertenze.* Grada, Praha, p. 649
- [11] Phillips M. I. (1987) *Annu Rev Physiol.* 49, p. 413
- [12] Tsutsumi K., Saavedra J. M. (1991) *Am J Physiol.* 261, p. 667
- [13] Von Bohlen Und Halbach O., Albrecht D. (2006) *Cell Tissue Res.* 326, p. 599
- [14] Braszko J. J., Kulakowska A., Winnicka M. M. (2003) *J Physiol Pharmacol.* 54, p. 271
- [15] Wilson W., Voigt P., Bader M., et al. (1996) *Brain Res.* 729, p. 1
- [16] Voigt J. P., Rex A., Sohr R., Fink H. (1999) *Eur Neuropsychopharmacol.* 9, p. 279
- [17] Davis M. (1991) *Psychopharmacology of Anxiolytics and Antidepressants,* Pergamon Press, New York, p. 1
- [18] Gleich J., Froberg H. (1977) *Methods in Prenatal Toxicology.* GeorThieme Publishers, Stuttgart, p. 94

Modulácia imunitnej odpovede flavonoidom silymarínom počas experimentálnej infekcie larválnym štádiom cestóda u myší

Emília Vendelová¹, Gabriela Hrčková¹, Samuel Velebný¹, Miloslava Mrázová²

¹Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovenská republika;

vendelova.emilia@gmail.com

²Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN, Albertov 4, 128 00 Praha 2, Česká republika

Abstrakt

Millions of people worldwide suffer from parasitic helminth infections and, in the case of larval stages of helminths, cure rate is often very low, due to a limited efficacy of anthelmintics, hosts immuno-suppression and often parasite fibrous encapsulation. Derived from a variety of sources, immunomodulators are used to change the immune system response to infections. In the present studies on experimental parasitic infection caused by the larval stage of the cestode *Mesocostoides vogae* in mice we examined the immunomodulatory effects of flavonoid silymarin on non-specific effector functions, distribution of cells of innate immunity in the liver and peritoneal cavity after co-administration with the anthelmintic praziquantel. Parallel administration of natural substance with drug significantly elevated efficacy of the treatment. The effects on ROS production, cells distribution and the degree of fibrosis differed between treated groups. Therefore the examined combined therapy offers a promising alternative treatment option for tissue-dwelling chronic diseases caused by helminths.

Kľúčové slová: *immunomodulation; parasitic infections; praziquantel; silymarin; therapy*

Úvod a formulácia cieľa

V priebehu evolúcie boli živočíchy vystavené pôsobeniu rôznych mnohobunkových extracelulárnych parazitov, ktoré predstavovali ohrozenie integrity ich tkanív. Proinflamačný oxidatívny typ imunologického útoku je zväčša účinný voči intracelulárnym mikróbom a v ojedinelých prípadoch môže poškodzovať aj mnohobunkové parazity. Keďže mnohobunkové helminty nemôžu byť fagocytované, zápalové a toxické mediátory sú z kompetentných buniek vypúšťané do okolia. Takýmto spôsobom dochádza k poškodeniu tkanív a vážnemu ohrozeniu fitness hostiteľa. Počas evolúcie si hostitelia na obranu voči mnohobunkovým cudzorodým organizmom museli preprogramovať imunitnú odpoveď na takú, ktorá by umožnila patogén tolerovať resp. vypudiť a rýchlo opraviť akékoľvek poškodenie tkanív. Takýto typ imunitnej odpovede sa označuje Th2-typ a predstavuje spoločný znak pre väčšinu helmintóz. V tomto prípade, Th1-typ imunitnej odpovede, charakterizovaný INF- γ produkciou a následnou kontrolou vrodenej zložky imunitného systému bojujúcej s mikróbmi, ustupuje. Obrana hostiteľa voči larválnym štádiám parazitov je teda kontrolovaná Th2 bunkami a cytokínmi interleukín-4 (IL-4), IL-5 a IL-13. Tieto cytokíny majú rôzny vplyv na efektorové bunky imunitného systému a vo všeobecnosti vyvolávajú aktiváciu mastocytov, bazofilov a eozinofilov, IgE produkciu atď [1]. Súhra

zapojených zložiek do Th2-typu imunitnej odpovede sa prejavuje aj voči larválnym štádiám cestódov, ktoré vyvolávajú chronický zápal [2]. Kvôli ich migrácii a prebývaníu v orgánoch dochádza k poškodeniu tkanív, ktoré je rýchlo opravované formou fibrózneho spojivového tkaniva v procese fibrogenéza, v snahe o zachovanie integrity a stabilizácie funkcie orgánu. Výsledkom takého procesu je fibróza postihnutého orgánu, ktorá môže mať závažné patologické a patofyziologické následky [3].

Larvy (metacestódy) cestóda *Mesocestoides vogae* sú vďaka svojmu rýchlemu vývoju a udržateľnosti v laboratórnych podmienkach používané ako vhodný modelový organizmus, vo farmakologických a imunologických štúdiách, pre pomalšie sa vyvíjajúce, patogénnejšie metacestódy akými sú napr. *Echinococcus* spp., *Taenia* spp. Larvy cestódov spôsobujú závažné ochorenia (larválne helmintózy) s vysokým percentom morbidity (94 – 100% v priebehu 10 -15 rokov po diagnostike) u neliečených resp. nesprávne liečených jedincov. Napriek intenzívnej zápalovej reakcii hostiteľa sú infekcie bez liečby antihelmintikami potlačené len veľmi ojedinele. Praziquantel (PZQ) patrí medzi širokospektrálne antihelmintiká vhodné aj na liečbu cestodóz. Na potlačenie infekcie je nevyhnutná dlhotrvajúca liečba, ktorá však nevedie k zníženiu vedľajších účinkov granulomatózneho zápalu a iných imunopatologických prejavov [4]. Liečivo má značný rozsah aktivity namierenej proti dospelým štádiám, no účinnosť na larválne štádia je obmedzená len na parazitostatický účinok. Je potrebné navrhnuť účinnejšie spôsoby a nové prístupy v terapii, ktoré by viedli k zvýšeniu účinnosti, predchádzaniu vzniku rezistencie a obmedzeniu patologických dôsledkov infekcie.

Už v čase našich predkov bolo známe, že flavonoidy spolu s inými prírodnými látkami zohrávajú úlohu pri úspešnej liečbe ochorení rôznej etiológie. Od posledného storočia sa opäť stali predmetom narastajúceho záujmu vedcov z rôznych oblastí medicínskeho výskumu, vrátane farmakológie pri parazitárnych ochoreniach [5]. Silymarín (SIL) predstavuje zmes flavonoligandov izolovaných z rastliny *Silybum marianum* a je známy svojim hepatoprotektívnym účinkom, antioxidantnými, antimutagénymi a imunomodulačnými vlastnosťami [6].

V predloženej práci sme sledovali imunomodulačný vplyv liečby PZQ a jeho kombinovaného účinku so silymarínom. V experimentoch boli použité larválne štádia (tetrathyridia) *M. vogae*, ktoré kvôli svojej lokalizácii v pečeni a peritoneálnej dutine myši predstavujú vhodný model na sledovanie javov spätých s chronickým zápalom.

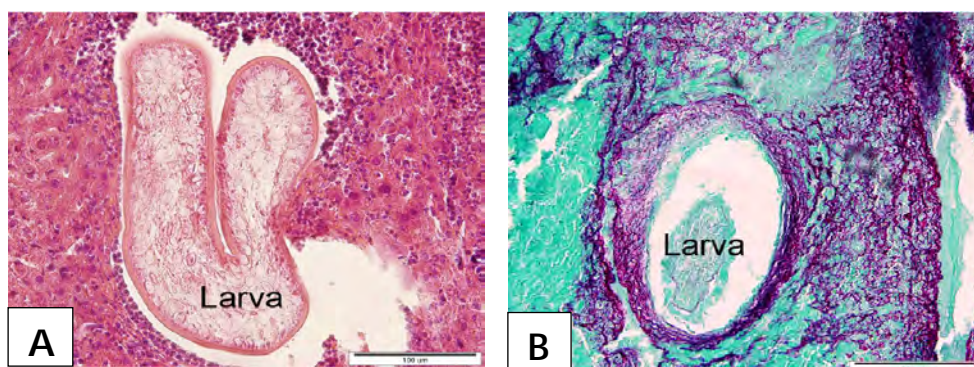
Materiál a metódy

Experimenty boli uskutočnené na samcoch kmeňa ICR, ktoré boli orálne infikované 55-60 tetratyridiami *M.vogae*. V pečeni a peritoneálnej dutine myší bol sledovaný vplyv infekcie, ako aj vplyv liečby praziquantelom samotným (PZQ) alebo PZQ v kombinácii so silymarínom (PZQ+SIL). Terapia trvala 10 dní od 15. dňa po infekcii (p.i) a celková dávka PZQ (350mg/kg váhy) a SIL (350mg/kg) bola podaná myšiam orálne. Larvy, pečene a peritoneálne exudátové bunky boli izolované na 0., 7., 14., 21., 25., 28., 35., 44. a 90. deň po infekcii (d.p.i.) a z liečených skupín na 25/1, 28/4, 35/11 a 44/20 d.p.i./ deň po terapii (d.p.t.). V uvedené dni bola počítaná účinnosť liečby na základe redukcie počtu lariev v liečených skupinách v porovnaní s kontrolnou skupinou. Larvy z pečene boli izolované po natrávení tkaniva trypsínom a kolagenázou I. Časť buniek z peritoneálnej dutiny bola použitá na sledovanie respiračného vzplanutia, ktoré je sprevádzané produkciou reaktívnych kyslíkových radikálov. Vzorky pečeni boli spracované pre parafínové a kryostatové rezy, ktoré boli následne farbené rôznymi farbivami technikami: hematoxylín/eozín, toluidín blue (detekcia mastocytov), imunohistochemické farbenie kolagénu I. Na kryostatových rezoch pečeni bol histochemickým farbením lokalizovaný enzým peroxidáza u eozinofilov a neutrofilov. Sledovali sme tiež expresiu génov pre vybrané cytokíny TGF- β , TNF- α , IL-4 a IL-5 (Th1 a Th2 typu odpovede) v pečeni a peritoneálnej dutine metódou Real-Time PCR.

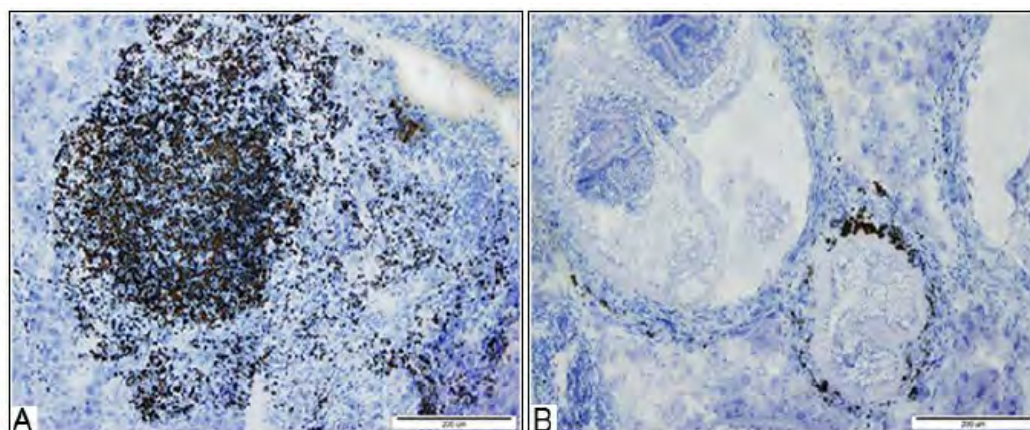
Výsledky a diskusia

Asexuálne rozmnožujúce sa larválne štádia *M. vogae* perzistujú v pečeni a peritoneálnej dutine myší. Vplyvom terapie došlo k redukcii počtu lariev v oboch predilekčných miestach, viac po kombinovanej liečbe PZQ+SIL (dáta nie sú zobrazené). Z predchádzajúcich štúdií je známe, že silymarín však nemá priamy larvicídny účinok [3]. Počas 44 dní po infekcii bola sledovaná dynamika zápalových zmien, fibrogenéza a jej modulácia vplyvom liečby. V akútnom štádiu infekcie boli migrujúce larvy obklopené masívnym bunkovým infiltrátom (Obr.1A), ktorý bol postupne nahrádzaný extracelulárnou hmotou tvorenou kolagénom (Obr.1B) v procese fibrogenézy. Prostredníctvom imunohistochemického farbenia kolagénu I. bol zistený profibrotický charakter liečby samotným PZQ, a že súčasné podávanie silymarínu významne znížilo počet buniek produkujúcich kolagén I. V neliečenej skupine myší boli v akútnej fáze v pečeni dominantnými bunkami polymorfonukleárne granulocyty (Obr. 2A), pričom v chronickej fáze bol ich počet vo fibróznych ložiskách značne zredukovaný (Obr. 2B). Ďalšou zo sledovaných

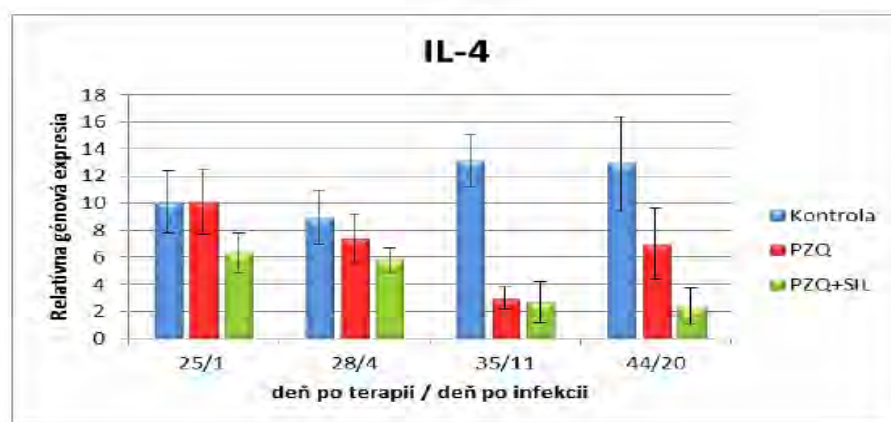
bunkových populácii boli mastocyty známe svojou úlohou pri rozvoji fibrózy. Tieto bunky boli prítomné len v chronických ložiskách a kapsulách lariev (Obr. 3).



Obr.1 Histopatológia pečene infikovanej larvami *M. vogae*. (A) Sekcie farbené HE poukazujú na bunkový infiltrát v okolí larvy v akútnom štádiu infekcie, (B) picrosirius red/fast green sekcie poukazujú na prítomnosť kolagénu v okolí larvy v chronickom štádiu



Obr. 2 Sekcie pečene po Px-farbení. (A) Granulocyty v akútnom štádiu infekcie (B) v chronickom štádiu infekcie (B)



Obr. 3 Vplyv terapie na relatívnu expresiu génu (RGE) pre interleukín IL-4

Podávanie SIL signifikantne znížilo rozsah fibrózy a počet mastocytov v pečeni. Výsledkom takého javu je zvýšenie dostupnosti liečiva k larvám a následnej zvýšenej účinnosti liečby. Počas infekcie helmintmi je známe potlačenie efektorových funkcií imunitných buniek, ktoré je z veľkej miery stimulované parazitom, s cieľom zaistiť si čo najdlhšiu dobu prežívania v rámci svojho hostiteľa. Počas neliečenej infekcie v kontrolnej skupine došlo k takmer 30 násobnému nárastu buniek imunitného systému, no napriek takémuto zvýšeniu nedošlo k redukcii počtu lariev. Medzi kľúčové efektorové bunky, ktoré podliehajú výraznej modulácii patria makrofágy. Makrofágy prispievajú k nešpecifickej obrane mechanizmami, medzi ktoré patrí prezentácia antigénu, fagocytóza a respiračné vzplanutie (RB). RB, ktoré fagocytózu sprevádza, môže v nadmernej miere spôsobiť oxidačný stres s potencionálnym negatívnym účinkom na celý organizmus [7]. Produkcia voľných radikálov bola signifikantne potlačená po kombinovanej liečbe PZQ a silymarínom, kedy hodnoty dosahovali úroveň hodnôt zdravých myši (dáta nie sú zobrazené). Oxidačný stres, ktorý môže pri procese infekcie vznikáť vedie k poklesu imunity a práve doplnenie antioxidantov, medzi ktoré patrí aj silymarín, môže zvrátiť potlačenú imunitnú odpoveď a chrániť pred negatívnym vplyvom voľných radikálov.

Silymarín má schopnosť polarizovať Th1-/Th2-typ odpovede u hostiteľov podľa typu ochorenia a v prípade alergických ochorení s vysokými hladinami IL-5 a eozinofiliou, charakteristickými aj pre helmintózne ochorenia, stimuloval produkciu IFN- γ a naopak znížil produkciu IL-4 [8]. Viaceré práce preukázali, že vysoké hladiny IFN- γ u hostiteľov infikovaných larválnymi štádiami helmintov vedú k potlačovaniu infekcie a naopak Th2 cytokínová odpoveď je spojená s chronicitou ochorenia. Expresia TNF- α po liečbe obidvoma typmi liečiv bola znížená. TNF- α môže mať negatívny účinok namierený proti patogénom ale aj voči vlastným štruktúram, kedy môže dôjsť k poškodeniu funkcií buniek. Veľmi citlivé sú T lymfocyty, ktorých defekt bol zistený pri zníženej imunite pozorovanej pri oxidačnom strese. Takéto bunky majú poškodenú schopnosť odpovedať na antigén, resp. dochádza k inhibícii ich proliferácie. Práve preto môže zníženie expresie TNF- α eliminovať poškodenie. Znížená expresia TNF- α bola signifikantne vyššia v prípade kombinovanej liečby PZQ+SIL (dáta nie sú zobrazené). To podporuje aj fakt, že TNF- α môže mať škodlivý účinok pri nedostatku antioxidantov, ktoré súčasne pôsobia aj imunostimulačne [7]. Expresia génov pre Th2 cytokíny IL-4, IL-5 a transforming growth factor β (TGF- β) v pečeni s postupujúcou infekciou narastala a pri terapii došlo k jej potlačeniu hlavne v prípade po kombinovanej liečbe. TGF- β má silný prozápalový charakter a zároveň slúži ako silný profibrotický

mediátor [1]. V korelácii s touto jeho úlohou je zvýšená tvorba kolagénu I a III [9], ktorá je priamym výsledkom pôsobenia cestóda (Th2 stimul) a je vysoko závislá na cytokínoch IL-4 a IL-13. Na základe účinkov SIL došlo k zmene hodnôt sledovaných parametrov (zníženie RGE Th2 cytokínov, redukcia počtu lariev, znížený rozsah fibrózy, stimulácia efektorových funkcií) čo viedlo v prípade pečene k zvýšeniu jej funkčnosti a dostupnosti liečiva PZQ až k larvám.

Záver

Na základe výsledkov môžeme konštatovať, že kombinovaná terapia PZQ a SIL vedie k obnoveniu fyziologickej a imunologickej rovnováhy a je farmakologicky účinnejšia na elimináciu lariev *M. vogae* ako v pečeni tak aj v peritoneálnej dutine. Imunomodulačná aktivita SIL teda ponúka sľubnú alternatívnu možnosť pri liečbe chronických zápalových ochorení alergického Th2 typu.

Pod'akovanie

Práca vznikla za podpory grantovej agentúry pre podporu vedy VEGA No. 2/0150/13.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Allen J. E., Wynn T. A. (2011) PLoS Pathog. 7(5), e1002003
- [2] Hrčková G., Velebný S., Solár P. (2010) Int. J. Parasitol. 10, p. 163
- [3] Velebný S., Hrčková G., Konigová A. (2010) Parasitol Int. 59(4), p.524
- [4] MacDonald A. S., Araujo M. I., Pearce E. J. (2002) Infect. Immun. 70(2), p. 427
- [5] Hrčková G., Velebný S. (2013) Pharmacological potential of selected natural compounds in the control of parasitic diseases. Springer, Amsterdam, p. 61
- [6] Ďuráčková Z., Knasmüller. (2007) The activity of natural compounds in diseases prevention and therapy. Springer, Amsterdam, p. 11
- [7] Racek J. (2001) Epidemiolog. Mikrobiol. Immunol. 70, p. 87
- [8] Kuo F. H., Jan T. R. (2009) Phytomedicine. 16, p. 271
- [9] Hrčková G., Velebný S. (1997) Parasitology. 114, p. 475

Vplyv rôznych foriem mangánu v diétach nosníc na aktivitu antioxidantných enzýmov

Katarína Venglovská¹, Klaudia Čobanová², Iveta Plachá², Ľubomíra Grešáková²

¹Univerzita P. J. Šafárika, Prírodovedecká fakulta, Ústav biologických a ekologických vied, Katedra fyziológie živočíchov, Moyzesova 11, 040 01, Košice, Slovenská republika; kvenglovaska@saske.sk

²Slovenská akadémia vied, Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Šoltésovej 4-6, 040 01 Košice, Slovenská republika

Abstrakt

The objective of this study deals with the effect of feed supplementation with different forms of manganese (Mn) on parameters of antioxidant status and liver enzymes activities of laying hens. During the 8 weeks the birds were randomly allocated to 4 treatments. Group 1 was fed the unsupplemented basal diet (BD). Diets for groups 2, 3 and 4 were supplemented with a Mn dose of 120 mg/kg in the form of Mn-sulphate, Mn-proteinate and Mn-glycine chelate, respectively. The Mn supplementation decreased the activity of alkaline phosphatase (ALP) in plasma. The activity of glutathione peroxidase (GPx) in blood and superoxide dismutase (SOD) in erythrocytes were significantly increased by addition of Mn sulphate into diet. Intake of BD enriched with Mn-proteinate resulted in significantly higher total antioxidant status (TAS) in plasma. The dietary Mn intake did not influence the lipid peroxidation in plasma and liver. The results indicate that feed supplementation with Mn can affect the activity of antioxidant enzymes and has positive effect on total antioxidant status of poultry.

Kľúčové slová: mangán; nosnice; antioxidantné enzýmy; lipidová peroxidácia.

Úvod a formulácia cieľa

Mangán (Mn) je esenciálnym stopovým prvkom, ktorý je v organizme dôležitý pre celý rad fyziologických procesov. Mn je dôležitým komponentom viacerých kľúčových metaloenzýmov podieľajúcich sa na odstránení reaktívnych foriem kyslíka (ROS), syntéze aminokyselín (glutamín syntetáza), močovinovom cykle (argináza), energetickom metabolizme (pyruvát karboxyláza) [1]. Najznámejším Mn-obsahujúcim metaloenzýmom je Mn-superoxid dismutáza (Mn-SOD), ktorá katalyzuje detoxifikáciu O₂ radikálov na peroxid vodíka. Okrem toho je Mn aktivátorom mnohých enzýmov ako sú, galaktozyl transferáza, glykozyl transferáza, ktoré sú potrebné pre tvorbu chrupavky a kostného tkaniva [2,3]. Všeobecne sa dá povedať, že Mn je dôležitý pre metabolizmus sacharidov, bielkovín, pre správne fungovanie nervového a reprodukčného systému a má významnú úlohu pri formovaní kostného tkaniva a antioxidantnej ochrane [4,5].

Preto je dôležité dopĺňať diéty hospodárskych zvierat o tento stopový prvok a stanoviť jeho optimálnu hladinu a formu pre úžitkové zvieratá tak, aby boli zachované adekvátne biologické funkcie a zootecnická úžitkovosť. Hladina suplementovaného Mn v diétach sa

väčšinou riadi požiadavkami NRC. Podľa NRC je 20 mg Mn/kg krmiva dostatočné množstvo na splnenie požiadaviek pre hnedonosné nosnice [6]. Avšak maximálny povolený obsah Mn v EÚ upravuje smernica Európskej komisie (EC 1334/2003 a EC 479/2006) a je stanovený na 150 mg Mn/kg kompletnej kŕmnej zmesi. Za tradične využívané aditíva Mn sa považujú anorganické soli, ako sú oxid mangánatý alebo síran mangánatý. Avšak v posledných rokoch sa zvyšujú obavy ohľadne využívania anorganických aditív a to z dôvodu ich slabšej biologickej využiteľnosti, potenciálu pôsobiť ako antagonisti, čím sa môže zhoršiť absorpcia iných prvkov, ako aj z dôvodu vyššieho zaťaženia životného prostredia týmto stopovým prvkom [7]. V porovnaní s anorganickými aditívami majú organické aditíva niekoľko výhod a to, chránia pred neželanými chemickými reakciami gastrointestinálnom trakte, ľahko prechádzajú cez intestinálnu stenu a sú absorbované inými absorpčnými cestami [8]. Avšak vedecké štúdie ohľadne biodostupnosti organických aditív - chelátov sú rozporuplné. V niektorých štúdiách sa uvádza, že organické aditíva sú oveľa viac biodostupnejšie ako anorganické [9,10,11]. Naopak iné štúdie tvrdia, že medzi nimi nie je žiadny rozdiel [12,13].

Cieľom tejto štúdie bolo preto zistiť vplyv diét obohatených o Mn z jeho rôznych zdrojov na antioxidačný status nosníc, konkrétne na zmenu aktivity glutathión peroxidázy (GPx), superoxid dimutázy (SOD) a na koncentráciu malondialdehydu (MDA), ako indikátora lipidovej peroxidácie. Čiastkovým cieľom práce bolo sledovať aj zmenu aktivity niektorých ďalších enzýmov ako γ -glutamyl transferázy (GGT) a alkalickéj fosfatázy (ALP) u nosníc dostávajúcich diéty suplementované 120 mg Mn/kg diéty.

Materiál a metódy

Do experimentu bolo zaradených 96 nosníc plemena Lohmann Brown vo veku 20. týždňov. Zvieratá boli počas celej doby trvania pokusu ustajnené v obohatenej dvojetážovej klietkovej technológii, ktorá spĺňala všetky požiadavky obohatených klietok stanovené platnou legislatívou. Každá klietka bola vybavená dvoma nipelovými napájačkami. V hale mali nosnice upravený svetelný režim podľa potreby pre dané plemeno a legislatívnych požiadaviek. Počas obdobia znášky mali nosnice upravený svetelný režim na 16 hodín svetla. V hale bola zabezpečená výmena vzduchu ventilátormi, teplota vzduchu bola udržiavaná v rozmedzí 16-20°C a bola denne kontrolovaná, rovnako ako aj vlhkosť vzduchu. Kŕmidlá aj napájačky boli umiestnené v klietkach s možnosťou voľného prístupu k vode aj ku krmivu. Zvieratá boli kŕmené dvojfázovo, ráno a následne s odstupom 8 hodín, príjem vody bol *ad libitum*. Denná dávka krmiva bola 125 g/nosnica.

Sliepky boli po príchode náhodne rozdelené do 4. experimentálnych skupín, po 24

zvierat v skupine. Každá skupina pozostávala zo 6. replikátov, pričom každý replikát tvorili 4 nosnice. Zvieratá po príchode prijímali iba nesuplementovanú bazálnu diétu (HYD 10) pre chov sliepok na produkciu konzumných vajec, ktorá bola na báze kukurice, sóje a pšenice. Túto diétu prijímali všetky experimentálne skupiny po dobu 3 týždňov. Po skončení tejto adaptačnej periódy začali zvieratá prijímať experimentálne diéty po dobu 8. týždňov, ktoré sa líšili len vo forme pridaného Mn. Experimentálne diéty boli pripravené a miešané v Tatrafat s.r.o., Huncovce. Počas experimentálnej fázy dostávala prvá skupina naďalej nesuplementovanú BD s prirodzeným pozadím Mn v komponentoch kŕmnej zmesi deklarovaných výrobcou 30 mg Mn/kg, nami analyzovaných 46 mg Mn/kg krmiva. Všetky experimentálne skupiny dostávali ekvivalentný prídavok Mn - 120 mg/kg krmiva. Druhá experimentálna skupina dostávala BD suplementovanú anorganickým aditívom - monohydrátom síranu mangánatého, analyzovaný obsah Mn bol 168 mg Mn/kg krmiva. Tretia skupina prijímala BD obohatenú o organické aditívum Mn-proteinát s analyzovaným obsahom Mn 168 mg/kg. Štvrtá experimentálna skupina dostávala organické aditívum Mn-chelát glycínu s analyzovaným obsahom Mn 166 mg/kg krmiva.

Zvieratá boli vo veku 31. týždňov eutanazované, z každého replikátu bola náhodne vybraná jedna nosnica, teda celkovo 6 nosníc z každej experimentálnej skupiny. Krv bola odobratá do heparinizovaných skúmaviek z jugulárnej vény. Následne bola centrifugovaná 10 minút pri 1180 g a bola odobratá plazma na analýzy. Odobraté boli aj vzorky pečene a sérum. Vzorky boli rýchlo zmrazené a odložené na -70°C do doby analyzovania.

Celková aktivita GPx v krvi bola analyzovaná podľa metodiky Paglia a Valentine využitím Ransel kitu (Randox, UK) [14]. Koncentrácia MDA v plazme a pečeni bola meraná modifikovanou fluorometrickou metódou podľa Jo a Ahna [15]. Obsah hemoglobínu (Hb) v krvi a aktivita SOD v erythrocytoch boli analyzované využitím kitov firmy Randox, UK, rovnako ako aj celkový antioxidačný status (TAS) v plazme a aktivita γ -glutamyl transferázy v sére [16,17,18]. Aktivita SOD v pečeni bola stanovená na základe merania inhibície redukcie cytochrómu c využitím xantín/xantínoxidázového $\text{O}_2^{\bullet-}$ generovacieho systému pri 550 nm podľa Flohe a Ottinga [19]. Jedna jednotka aktivity SOD, bola definovaná ako množstvo enzýmu, ktorý spôsobí 50% inhibíciu redukcie cytochrómu c pri testovaných podmienkach. Koncentrácia proteínov v tkanivách bola meraná spektrofotometricky metódou podľa Bradforda využitím bovinného sérového albumínu ako štandardy [20]. Aktivita ALP v plazme bola analyzovaná využitím kitu Biolatest od firmy Lachema podľa Schmidta a kol. [21].

Údaje boli analyzované jednocestnou analýzou variancie (ANOVA) *s post hoc*

Tukeyho porovnávacím posttestom využitím softvéra GraphPad Prism 5. Výsledky sú uvedené ako priemer \pm SEM.

Výsledky a diskusia

Výsledky aktivity SOD, GPx, ako aj celkový antioxidačný status a koncentrácia MDA v plazme a pečeni sú uvedené v Tab.1. Signifikantný nárast aktivity SOD v erythrocytoch sme zaznamenali v skupine, ktorá mala diéty suplementované síranom mangánatým, pričom v pečeni sme nezaznamenali žiadne signifikantné zmeny v aktivite SOD. Signifikantné zvýšenie aktivity GPx v krvi sme zistili opäť v skupine, ktorá mala diéty obohatené o Mn-síran, oproti kontrolnej skupine. Avšak signifikantné zvýšenie celkového antioxidačného statusu bolo zaznamenané v skupine, ktorá dostávala BD obohatenú o Mn-proteinát v porovnaní s kontrolnou skupinou. Koncentrácia MDA v plazme a pečeni nebola signifikantne ovplyvnená príjmom experimentálnych diét.

Tab. 1 Aktivita superoxid dismutázy (SOD) v pečeni a erythrocytoch, aktivita glutathión peroxidázy (GPx) v krvi, celkový antioxidačný status v plazme (TAS), koncentrácia malondialdehydu (MDA) v plazme a v pečeni u nosníč kŕmených diétami suplementovanými rôznymi Mn aditívami (n=6). Výsledky sú udané ako priemer \pm SEM, rozdielne písmená horného indexu v riadkoch predstavujú signifikantný rozdiel medzi skupinami (P<0,05)

	Experimentálne skupiny			
	Bazálna diéta (BD)	BD + síran mangánatý	BD + Mn-proteinát	BD + Mn-chelát glycínu
SOD pečeň (U/mg proteínu)	9,65 \pm 0,55	7,46 \pm 0,43	9,61 \pm 0,64	10,53 \pm 1,28
SOD erythrocyty (U/g Hb)	1405 \pm 36,71 ^a	1602 \pm 50,68 ^b	1535 \pm 47,76 ^{ab}	1439 \pm 30,80 ^{ab}
GPx krv (U/g Hb)	82,97 \pm 2,15 ^a	103,3 \pm 5,37 ^b	88,74 \pm 2,91 ^{ab}	96,07 \pm 6,39 ^{ab}
TAS plazma (mmol/L)	1,02 \pm 0,08 ^a	1,18 \pm 0,07 ^{ab}	1,46 \pm 0,11 ^b	1,23 \pm 0,07 ^{ab}
MDA plazma (μ mol/L)	0,38 \pm 0,02	0,36 \pm 0,03	0,39 \pm 0,02	0,37 \pm 0,02
MDA pečeň (nmol/g proteínu)	50,73 \pm 1,33	51,59 \pm 1,26	53,04 \pm 1,34	50,94 \pm 2,14

Mangán je kľúčovým štruktúrnym komponentom Mn-SOD, ktorý má antioxidačné vlastnosti a je schopný redukovať bunkové poškodenie. SOD v bunke katalyzuje dismutáciu superoxidových aniónov na peroxid vodíka a molekulový kyslík [22]. V našom experimente sme zaznamenali signifikantné zvýšenie aktivity SOD v erythrocytoch v skupine, ktorá dostávala v BD síran mangánatý. Nadmerné množstvo Mn v diéte môže podporovať zvýšenú tvorbu superoxidových aniónov [23]. Avšak v pečeni sme už žiadne signifikantné zmeny v aktivite SOD nezaznamenali.

GPx patrí do skupiny antioxidačných enzýmov a podieľa sa na rozklade peroxidu vodíka na vodu a molekulový kyslík. V skupine, ktorá dostávala prídavok síranu mangánatého sme zaznamenali signifikantné zvýšenie aktivity GPx v krvi, čo by mohlo naznačovať adekvátnu ochranu voči oxidačnému stresu.

V Tab. 2 sú uvedené merania aktivity vybraných enzýmov, ako sú alkalická fosfatáza, γ -glutamyl transferáza.

Tab. 2 Aktivita alkalické fosfatázy (ALP) v plazme, ako aj aktivita γ -glutamyl transferázy (GGT) v sére u nosníc kŕmených diétami suplementovými rôznymi Mn aditívami (n=6). Výsledky sú udané ako priemer \pm SEM, rozdielne písmená horného indexu v riadkoch predstavujú signifikantný rozdiel medzi skupinami (P<0,05)

	Experimentálne skupiny			
	Bazálna diéta (BD)	BD + síran mangánatý	BD + Mn-proteinát	BD + Mn-chelát glycínu
ALP plazma (U/L)	1439 \pm 109,1 ^a	529,7 \pm 68,76 ^b	614,4 \pm 48,11 ^b	623,6 \pm 16,51 ^b
GGT sérum (U/L)	26,06 \pm 1,18	29,40 \pm 2,07	31,01 \pm 1,96	29,53 \pm 1,83

V predkladanej štúdií sme zaznamenali signifikantné zníženie aktivity alkalické fosfatázy (ALP) vo všetkých suplementovaných skupinách oproti kontrolnej skupine. Alkalická fosfatáza je kľúčovým enzýmom pre rast a vývoj. Ovplyvňuje mineralizáciu kostí, ukladanie vápnika do štruktúry kostí a zlepšuje pevnosť kostí. Zníženie aktivity ALP v plazme môže súvisieť so vznikom neželaných interakcií s inými prvkami v gastrointestinálnom trakte. Yuan a kol. zaznamenali tiež signifikantný pokles aktivity ALP v skupinách suplementovaných Mn, avšak odôvodňovali to tým, že pokles aktivity ALP mohol súvisieť s tým, že diéty boli deficientné na Zn [8].

Aktivita GGT nebola signifikantne zmenená príjmom experimentálnym diét. Tento enzým sa podieľa na prenose aminokyselín cez bunkovú membránu a na metabolizme glutathiónu. Aktivita sérovej GGT sa vo veľkej miere využíva ako index integrity pečeneového tkaniva alebo ako marker pečeneovej dysfunkcie. Niektoré štúdie poukazujú na to, že aktivita GGT v sére sa môže používať za včasný marker oxidačného stresu [24].

Záver

Prídavok Mn do diét nosníc môže ovplyvňovať aktivitu antioxidačných enzýmov a nemá vplyv na lipidovú peroxidáciu v plazme a pečeni. Získané výsledky naznačujú pozitívny účinok organickej formy Mn na celkový antioxidačný status nosníc.

Pod'akovanie

Práca bola podporená grantovou úlohou VEGA č. 2/0045/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Erikson K. M., Aschner M. (2003) *Neurochem. Int.* 43, p.475
- [2] Leach R. M., Muenster A. M. (1962) *J. Nutr.* 78, p.51
- [3] Schwartz N. B. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, p.285
- [4] Ho S. Y., Miller W. J., Gentry R. P., et al. (1984) *J. Dairy Sci.* 67, p.1489
- [5] Richards J. D., Zhao J., Harrell R. J., et al. (2010) *Asian Austral. J. Anim. Sci.* 23, p.1527
- [6] NRC (1994) *Nutrient requirement of poultry*, 9th edition, National Academy Press, Washington, DC, p.23
- [7] Yuan J., Xu Z., Huang Ch., et al. (2011) *Anim. Feed Sci. Tech.* 168, p.72
- [8] Mateos G. G., Lazaro R., Astillero J. R., et al. (2005) *Re-defining Mineral Nutrition*, Nottingham University Press, Nottingham. p.41
- [9] Fly A. D., Izquierdo O. A., Lowry K. L., et al. (1989) *Nutr. Res.* 9, p.901
- [10] Henry P. R., Ammerman C. B., Little R. C. (1992) *J. Dairy Sci.* 75, p.3473
- [11] Lu L., Ji C., Luo X. G., et al. (2006) *Anim. Feed Sci. Technol.* 129, p.49
- [12] Baker D. H., Haplin K. M. (1987) *Poult. Sci.* 66, p.1561
- [13] Scheideler S. E. (1991) *Biol. Trace Elem. Res.* 29, p.217
- [14] Paglia D. E., Valentine W. N. (1967) *J. Lab. Med.* 70, p.158
- [15] Jo C., Ahn D. U. (1998) *Poult. Sci.* 77, p.457
- [16] Arthur J. R., Boyne R. (1985) *Life Sci.* 36, p.1569
- [17] Miller N. J., Rice-Evans C., Davies M. J., et al. (1993) *Clin. Sci.* 84, p.407
- [18] Szasz G. (1969) *Clin. Chem.* 15, p.124
- [19] Flohe L., Otting F. (1984) *Methods Enzymol.* 105, p.93
- [20] Bradford M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, p.248
- [21] Schmidt E., Gerhardt W., Henkel E., et al. (1992) *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 30, p.247
- [22] Fridovich, I. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* 64, p.97
- [23] Wang H.W., Cai D. B., Zhao C. L., et al. (2010) *Isr. J. Aquacult. Bamid.* 62(2), p.7884
- [24] Lim J. S., Yang J. H., Chung B. Y., et al. (2004) *Free Radic. Biol. Med.* 37, p.1018

Vplyv glykozylácie na funkciu proteínu CAIX

Magdaléna Vreštiaková, Lucia Csáderová, Silvia Pastoreková

*Slovenská akadémia vied, Virologický ústav, Oddelenie molekulárnej medicíny,
Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika; vrestiakova@bioscience.sk*

Abstract

Carbonic anhydrase IX is a cell surface enzyme regulated by hypoxia and strongly associated with tumor phenotype. It is clinically useful cancer biomarker, prognostic indicator and therapeutic target. CA IX is functionally involved in acidification of extracellular pH, destabilization of cell-cell contacts and cell migration. CA IX molecule contains N-glycosylation site (Asn³⁴⁶) carrying a high mannose sugar chain and an O-glycosylation site (Thr¹¹⁵) modified by glycosaminoglycan chain. As protein glycosylation is an important phenomenon involved in many biological processes including cell adhesion, migration and modulation of immune response, our aim was to investigate the influence of mutations in the CA IX-glycosylation sites on migration, proliferation, adhesion and acidification of extracellular pH in C-33 A cells stably transfected with CA IX and its mutant variants. Our initial results support the idea that glycosylation of CA IX contributes at least to aspect of its function in tumors.

Kľúčové slová: *karbonická anhydráza IX, CA IX, glykozylácia proteínov, glykozylačné mutanty*

Úvod a formulácia cieľa

V procese glykozylácie proteínov vzniká bohatý, rozmanitý a regulovaný súbor N-glykanov, O-glykanov a glykozaminoglykanov viažúcich sa na konzervované motívy aminokyselín proteínu. Glykany sú súčasťou kľúčových biologických procesov vrátane bunkovej adhézie, molekulárneho transportu, aktivácie receptorov, signálnej transdukcie a endocytózy [1]. Nezanedbateľnú úlohu zohrávajú aj pri interakcii hostiteľa s patogénom v priebehu bakteriálnej alebo vírusovej infekcie a v procese iniciácie imunitnej odpovede [2]. Okrem spomenutých funkcií sú glykany v rámci glykoproteínu nevyhnutné pre správne poskladanie molekuly, jej ochranu pred degradáciou a doručenie na cieľové miesto v bunke [3]. Dôležitosť glykozylácie v biologických procesoch bunky zdôrazňuje fakt, že glykozylačné zmeny sú univerzálnymi črtami malígnej transformácie a progresie nádorov [4].

Karbonická anhydráza IX (CA IX) je nádorovo-asociovaný transmembránový proteín, ktorého expresia je indukovaná hypoxiou. Hlavnou funkciou proteínu CA IX je regulácia bunkového pH prostredníctvom vplyvu na pericelulárny metabolizmus CO₂. Katalytická doména CA IX lokalizovaná na extracelulárnej strane bunkového povrchu katalyzuje reverzibilnú reakciu $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ a vďaka následnému transportu bikarbonátových iónov prostredníctvom bikarbonátových transportérov do bunky sa tak podieľa na udržiavaní vnútrobunkového pH_i. Zároveň produkciou protónov prispieva k acidifikácii extracelulárneho mikroprostredia [5]. Okrem regulácie bunkového pH sa CA IX podieľa na destabilizácii E-kadherínom sprostredkovaných medzibunkových adhézných spojení [6], zároveň sa však vyznačuje schopnosťou väzby na povrchové bunkové receptory

[7]. Vďaka schopnosti acidifikácie mikroprostredia, ktorá stimuluje pohyblivosť a invazívnosť nádorových buniek, sa CA IX podieľa aj na zvyšovaní migračnej rýchlosti buniek [8]. Všetky spomenuté vlastnosti sú nevyhnutné pre invazívnosť a metastázovanie malígnych nádorových buniek, ktoré potrebujú prerušiť kontakt s bunkami primárneho nádoru a vytvoriť nové kontakty s bunkami v mieste vzniku sekundárneho nádoru [9].

Molekula CA IX obsahuje N-glykozylačné miesto (Asn³⁴⁶) viažuce glykanovú štruktúru bohatú na manózu a O-glykozylačné miesto (Thr¹¹⁵), ktoré pravdepodobne viaže sulfatovanú štruktúru podobnú keratan sulfátu [10, 11]. Významná úloha glykanov pre správnu funkciu glykoproteínov nás viedla k záujmu o vplyv glykozylácie na funkciu proteínu CA IX. Cieľom našej práce bolo zistiť, akým spôsobom mutácie v glykozylačných miestach CA IX ovplyvnia známe funkcie tohto proteínu – bunkovú adhéziu, migráciu a schopnosť acidifikácie extracelulárneho prostredia v hypoxických podmienkach.

Materiál a metódy

Kultivácia buniek

Ľudská bunková línia C-33 A izolovaná z cervikálneho karcinómu, ktorá neexprimuje CA IX a transfekované deriváty tejto línie boli kultivované v médiu DMEM (Biochrom) s 10 % fetálnym teľacím sérom (fetal calf serum – FCS) pri 37 °C, 5 % CO₂ a 21% O₂.

Transfekcia a selekcia transfekovaných derivátov C-33 A

Bunková línia C-33 A konštitutívne exprimujúca gén CA9 resp. jeho mutantné formy v miestach glykozylácie proteínu CA IX (T115A, N346A) bola pripravená kotransfekciou plazmidu pSG5C-CAIX, pSG5C-T115A resp. pSG5C-N346A s plazmidom pSV2neo v pomere 10:1 s využitím kitu TurboFect (Fermentas). Ako negatívna kontrola boli pripravené bunky nesúce plazmid pSG5C (C-33 A-neo). Transfekované bunky boli vystavené selekcii prostredníctvom antibiotika G418 (900 µg/ml) po dobu dvoch týždňov. Izoláciu magnetickými guľičkami Dynabeads M-450 Tosylactivated (Invitrogen) bola získaná zmes klonov. Expresia CA IX bola overená prostredníctvom FACS a imunofluorescencie (Obr. 1), ktorá zároveň umožnila detekciu lokalizácie CA IX v plazmatickej membráne.

Prolifерácia a migrácia transfekovaných derivátov C-33 A

Na stanovenie schopnosti proliferácie boli transfekované bunkové deriváty založené na platničku „E-plate 16“ s mikrosenzormi inkorporovanými na spodnej časti platničky umožňujúcimi monitorovanie a analýzu buniek v reálnom čase. Podobne na stanovenie schopnosti migrácie boli bunky založené na platničku „CIM-Plate 16“ s mikrosenzormi

inkorporovanými na spodnej časti platničky pod mikroporóznou membránou. Pri migračnom teste bola porovnávaná schopnosť buniek migrovať v bezsérovom médiu v smere atraktanta, ktorým bolo médium s pridaným 10% fetálnym teľacím sérom, so schopnosťou migrácie buniek bez prídania atraktanta. Oba experimenty boli monitorované pomocou prístroja Roche xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) DP.

Adhézia a „spreading“ transfekovaných derivátov C-33 A

Transfekované bunky v počte 1×10^5 na 1 ml DMEM boli založené do 12-jamkovej platničky so sterilným sklíčkom na dne každej jamky. Po 1 resp. 2 hod od založenia boli bunky fixované paraformaldehydom a zafarbené *Coomasie blue*. Pomocou mikroskopu Zeiss, objektívu 20x v prechodovom svetle boli zhotovené obrázky fixovaných buniek. Vyhodnotením fotografií programom ImageJ boli porovnané morfometrické parametre jednotlivých typov transfekovaných buniek v prvotných fázach adhézie a zväčšovania plochy, ktorou bunky adherujú („spreading“). Na experiment boli bunky založené paralelne na dva substráty (čistá sklíčka resp. sklíčka pokryté kolagénom, ktorý je súčasťou extracelulárnej matrix).

Acidifikácia extracelulárneho pH transfekovaných derivátov C-33 A

Schopnosť buniek exprimujúcich CA IX znižovať hladinu extracelulárneho pH bola analyzovaná pomocou prístroja SensorDish Reader (PreSens) umožňujúceho monitorovanie zmeny extracelulárneho pH v reálnom čase. Bunky boli založené na 24-jamkovú platničku s pH optickým senzorom v spodnej časti každej jamky, umiestnené na SensorDish Reader a hladina pH bola monitorovaná v podmienkach hypoxie.

Výsledky a diskusia

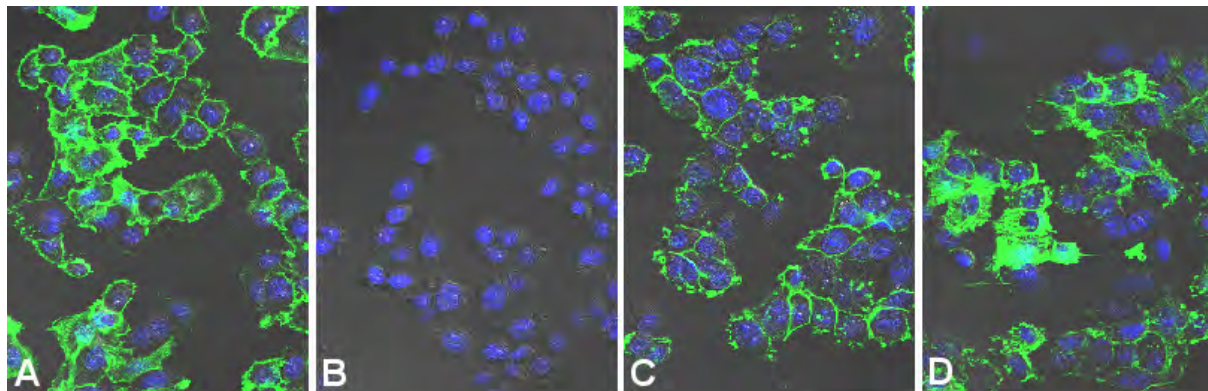
Transfekované bunkové deriváty C-33 A exprimujú CA IX

Expresia CA IX transfekovanými derivátmi C-33 A-CAIX, C-33 A-T115A, C-33 A-N346A, ako aj C-33 A-neo bola overená pomocou prietokovej cytometrie prístrojom Guava easyCyte HT FACS, čím bola dokázaná CA IX pozitivita buniek C-33 A-CAIX, C-33 A-T115A, C-33 A-N346A a CA IX negativita buniek C-33 A-neo (výsledky nie sú uvedené).

CA IX lokalizuje v membráne transfekovaných buniek

Na overenie úspešnosti transfekcie buniek C33 bola konfluentná monovrstva transfekovaných derivátov C-33 A-CAIX, C-33 A-T115A, C-33 A-N346A a C-33 A-neo značená CA IX-špecifickými protilátkami. Proteín CA IX bol u všetkých typov

transfekovaných derivátov lokalizovaný prevažne na plazmatickej membráne v miestach kontaktu s okolitými bunkami (Obr. 1).

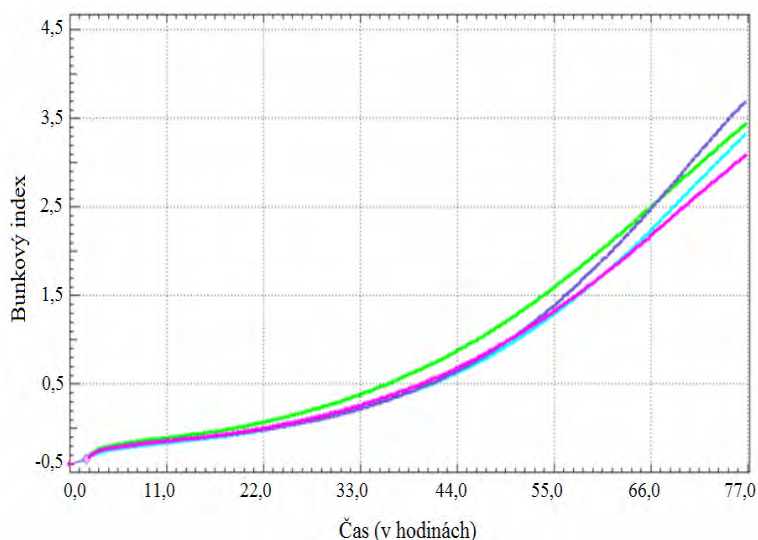


Obr. 1 Lokalizácia proteínu CA IX v bunkách C-33 A stabilne transfekovaných plazmidom pSG5C-CA IX (A), pSG5C-neo (B), pSG5C-T115A (C) a pSG5C-N346A (D). Bunky boli fixované metanolom a značené CA IX-spezifickými protilátkami, bunkové jadrá boli značené DAPI. Proteín CA IX je lokalizovaný prevažne na plazmatickej membráne v mieste kontaktov medzi bunkami, bunky C-33 A-neo CA IX neexprimujú. Obrázky boli zhotovené pomocou konfokálneho mikroskopu Zeiss LSM 510 Meta, objektívom 40x.

Proliférácia a migrácia transfekovaných derivátov buniek C-33 A

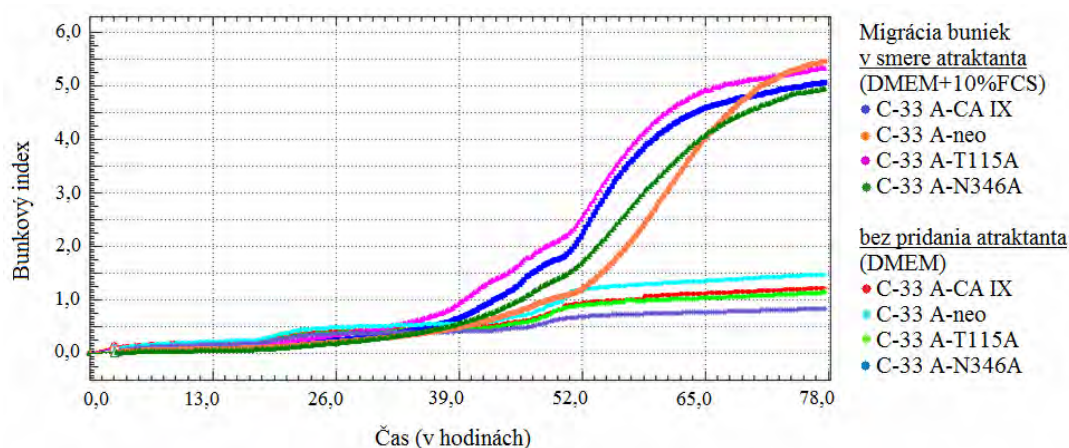
Na monitorovanie schopnosti proliferácie a migrácie buniek C-33 A-CAIX, C-33 A-T115A, C-33 A-N346A a C-33 A-neo bola použitá analýza merania odporu v reálnom čase pomocou prístroja Roche xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) DP. Analýza je založená na monitorovaní zmeny odporu prostredníctvom elektród v spodnej časti platničky. Zmenu odporu ovplyvňuje počet buniek prichytených na elektródy (hodnotenie proliferácie) resp. počet buniek migrujúcich cez mikroporóznú membránu v smere atraktanta (hodnotenie migrácie). Bunky prichytené na povrch elektródového senzora menia lokálne iónové prostredie na rozhraní elektródy a roztoku, čo vedie k zvyšovaniu odporu. So zvyšujúcim sa počtom buniek adherujúcich na elektronické senzory stúpa odpor, ktorého zmena je prístrojom priebežne zaznamenávaná ako „cell-index“ hodnota – bunkový index [12].

Priebežné výsledky testu schopnosti proliferácie buniek C-33 A-CAIX, C-33 A-T115A, C-33 A-N346A a C-33 A-neo naznačujú vyššiu proliferáciu buniek C33 A-T115A v porovnaní s bunkami exprimujúcimi štandardnú formu proteínu CA IX, a naopak, nižšiu proliferáciu buniek C-33 A-N346A v porovnaní s C-33 A-CA IX (Graf 1).



Graf 1 Proliferácia buniek C-33 A-CAIX (tyrkysová), C-33 A-T115A (zelená), C-33 A-N346A (ružová) a C-33 A-neo (modrá) v čase. Bunky boli založené v počte 5×10^3 na jamku platničky E-plate 16. Schopnosť proliferácie bola monitorovaná prístrojom RTCA a vyjadrená ako „cell-index (CI)“ – bezrozmerná veličina vyjadrujúca stav buniek na základe merania relatívnej zmeny odporu, ku ktorej dochádza v prítomnosti resp. neprítomnosti buniek a je zaznamenávaná elektródami v spodnej časti platničky. CI je vyjadrená vzorcom $CI = (Z_i - Z_0)/15$, kde Z_i vyjadruje odpor v individuálnom časovom bode počas experimentu a Z_0 odpor na začiatku experimentu [12].

Analýza migračnej schopnosti buniek taktiež naznačuje vyššiu schopnosť migrácie buniek C-33 A-T115A v porovnaní s bunkami C-33 A-CA IX na rozdiel od nižšej migračnej schopnosti buniek C-33 A-N346A oproti bunkám so štandardnou formou CA IX (Graf 2).



Graf 2 Migrácia buniek C-33 A-CAIX, C-33 A-T115A, C-33 A-N346A a C-33 A-neo v čase. Bunky boli založené v počte 6×10^4 buniek/ml. Schopnosť migrácie bola monitorovaná prístrojom RTCA a vyjadrená ako „cell-index (CI)“. Migrácia bola vyvolaná pridaním atraktanta (médium s 10% FCS) do spodnej platničky, do ktorej bunky z vrhnej platničky rozsuspendované v bezsérovom médiu migrovali cez mikroporóznú membránu s mikrosenzormi umiestnenými pod membránou. Ako kontrola boli použité bunky v bezsérovom médiu, ktorým do spodnej platničky nebol pridaný atraktant.

Predbežné výsledky analýzy acidifikácie extracelulárneho prostredia bunkami C-33 A-CAIX, C-33 A-T115A, C-33 A-N346A a C-33 A-neo sú v súlade s migračnou schopnosťou jednotlivých transfekovaných línií (výsledky nie sú uvedené).

Záver

Nádorovo asociovaný proteín CA IX nie je len objektom základného výskumu, ale pozornosť púta aj z hľadiska možnosti klinického využitia či už ako marker hypoxických solídnych nádorov, prognostický indikátor alebo imunoterapeutický cieľ [13]. Akékoľvek

nové poznatky vrátane významu glykozylácie tohto proteínu sú preto dôležité pre objasnenie celkovej funkcie CA IX a môžu napomôcť jeho terapeutickému využívaniu.

Náš výskum zameraný na vplyv zmeny glykozylácie proteínu CA IX na schopnosť proliferácie, migrácie a acidifikácie extracelulárneho pH buniek C-33 A stabilne transfekovaných plazmidom pSG5C-CA IX resp. pSG5C-T115A a pSG5C-N346A zatiaľ nebol ukončený. Predbežné výsledky však jasne podporujú názor, že glykozylácia je dôležitou súčasťou molekuly CA IX, ktorá ovplyvňuje jej funkčnosť.

Pod'akovanie

Táto štúdia vznikla vďaka podpore v rámci projektu APVV-0658-11 a projektu Vybudovanie kompetenčného centra pre výskum a vývoj v oblasti molekulárnej medicíny s ITMS kódom 26240220071.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Ohtsubo K., Marth J. D. (2006) *Cell*. 126(5), p. 855
- [2] Liang P. H., Wu C. Y., Greenberg W. A., Wong c. H. (2008) In Li M., Song L., Qin X. (2010) *J. Biosci.* 35(4), p. 665
- [3] Altschuler Y., Kinlough C. L., Poland P. A. et al. (2000) *Mol. Biol. Cell*. 11, p. 819
- [4] Varki A., Cummings R. D., Esko J. D. et al. (2009) *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA. Dostupné na internete: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1963/> [Citované: 2.3.2013]
- [5] Švastová, E., Hulíková, A., Rafajová M. et al. (2004) *FEBS Lett.* 577(3), p. 439
- [6] Švastová, E., Žilka, N., Zaťovičová, M. et al. (2003) *Exp. Cell. Res.* 290(2), p. 332
- [7] Závada J., Zavadová Z., Pastorek J. et al. (2000) *Brit. J. Cancer*. 82(11), p. 1808
- [8] Švastová, E., Witariski, W., Csaderová, L. et al. (2012) *S. J. Biol. Chem.* 287(5), p. 3392
- [9] Pastoreková S., Ratcliffe P. J., Pastorek J. (2008) *BJU Int.* 101(4), p. 8
- [10] Pastorek J, Pastoreková S, Callebaut I. et al (1994) *Oncogene* 9, p. 2877
- [11] Hilvo M., Baranauskienė L., Salzano A. M. et al. (2008) *J. Biol. Chem.* 283(41), p. 27799
- [12] Urcan E., Haertel U., Styllou M. et al. (2010) *Dent. Mater.* 26, p. 51
- [13] Pastoreková S., Závada J. (2004) *Cancer Therapy*. 2, p. 245

Koinfekcia MHV-68/H3N2 a jej vplyv na imunitnú odpoveď BALB/c myši

Magdaléna Wágnerová¹, Lucia Ančicová¹, Jana Janulíková², Peter Ditte², Anna Chalupková¹, Zuzana Hrabovská¹, Jana Jarčušková¹, Jela Mistríková^{1,2}

¹ *Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, wagnerovam@fns.uniba.sk*

² *Slovenská akadémia vied, Virologický ústav, Dúbravská cesta 9, 842 45 Bratislava, Slovenská republika*

Abstrakt

Murine gammaherpesvirus 68, member of the gammaherpesvirus family, establishes a long-term latent infection in multiple tissues, including splenocytes, peritoneal cells, and lymph nodes. MHV-68 can also establish a persistent infection in lungs. Within these tissues MHV-68 latency was identified in multiple cell types, including B cells, macrophages, and dendritic cells, with lung epithelium a site of viral persistence. In this study we focused on immunological features of BALB/c mice coinfecting with MHV-68 and influenza A (H3N2). Here we examined freshly isolated splenocytes and lung tissue and to analyze T cell subset - CD4+ and CD8+ and CD19+ B cells, by flow cytometry to characterize immune activation during single MHV-68 or H3N2 infection in comparison with coinfecting BALB/c mice. In lungs, coinfection significantly increased expression of markers CD8 and CD19. These findings indicate that coinfection is associated with hypersensitive reaction of host immune response and high-level herpesviral reactivation.

Kľúčové slová: *coinfection; CD markers; immune response; MHV-68; influenza A (H3N2)*

Úvod a formulácia cieľa

Vírusová infekcia stimuluje mnoho imunitných reakcií na strane hostiteľa. V prvom rade je aktivovaná vrodenná imunitná odpoveď, ktorá zohráva kritickú úlohu v rozvíjaní nasledujúcej získanej imunitnej odpovede [1, 2, 3]. Z hľadiska kontroly vírusovej infekcie je nevyhnutá prítomnosť CD8+, CD4+ T-lymfocytov a ich spolupráca s B-bunkami imunitného systému [4].

Po i.n. infekcii myši MHV-68 vzniká produktívna replikácia vírusu v pľúcach spojená s infiltráciou tkaniva mononukleárnymi a polymorfonukleárnymi bunkami. Počas akútnej fázy narastá počet CD8+ CTL, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu pri odstránení produktívnej infekcie z pľúc [5, 6, 7]. CTL sú potrebné aj pre dlhodobú kontrolu perzistentnej infekcie a ovplyvňujú tiež zvýšenie množstva latentne infikovaných B-lymfocytov v slezine [8, 4]. Štúdie jednoznačne dokazujú antivírusovú aktivitu CD4+ T-lymfocytov počas absencie CD8+ T-lymfocytov alebo B-buniek počas akútnej aj chronickej infekcie MHV-68. Pomocná funkcia nezávislých CD4+ T-lymfocytov má nezastupiteľnú úlohu v kontrole chronickej herpesvírusovej infekcie a latencie [9, 7]. Majú tiež za úlohu poháňať infiltráciu sleziny CD8+ T-lymfocytmi a B-lymfocytmi, podieľajú sa tak na vzniku splenomegálie [10]. CD4+ T-

bunky majú vplyv aj na množstvo latentne infikovaných B-lymfocytov počas počiatkových fáz chronicity, nie však počas dlhodobej latencie. MHV-68 infekcia stimuluje tvorbu širokého spektra Ag-špecifických CD8⁺ T-lymfocytov, ktoré sú nevyhnutné z hľadiska kontroly infekcie, ale nie sú schopné eliminovať perzistenciu [11, 12, 13]. Naproti tomu, CD4⁺ T-lymfocyty a VN Abs sú kritické pre prevenciu reaktivácie vírusu [14, 15]. Aj B-lymfocyty predstavujú jeden z kľúčových prvkov protivírusovej obrany. Najdôležitejšia je ich schopnosť prezentácie antigénu CD8⁺ T-lymfocytom a sekrécia Abs. B-lymfocyty zohrávajú aj úlohu pri kontrole chronicity, pri navodení latencie a následnej reaktivácii vírusu [16].

Cieľom predloženej práce bola experimentálna koinfekcia BALB/c myši MHV-68 a vírusom chrípky H3N2. Interakcia viacerých patogénov môže v hostiteľskom organizme vyvolať viaceré nepredvídateľné imunitné reakcie. Môže dôjsť k indukcii cross-protektie alebo modulácii imunitnej odpovede vedúcej k patologickým zápalovým zmenám. Zamerali sme sa na γ -herpesvírusovú latenciu a následnú akútnu chrípkovú infekciu. Predpokladali sme, že tento model by potenciálne mohol slúžiť na štúdium reaktivácie latencie onkogénneho γ -herpesvírusu v dôsledku koinfekcie iným vírusom.

Materiál a metódy

MHV-68: prototypový myšací herpetický vírus [17].

A/Miss/1/85/M9/E2 (H3N2): chrípkový vírus adaptovaný na myšiach (poskytla RNDr. Eva Varečková, DrSc. z VÚ SAV Bratislava).

BALB/c myši: inbrédna línia laboratórnych myši z chovnej stanice LF MU Brno.

Infekcia myši: navodili sme infekciu MHV-68, následne sme 45 dpi MHV-68 navodili akútnu chrípkovú infekciu. Vytvorili sme 3 skupiny BALB/c myši: MHV-68, H3N2 a MHV-68/H3N2. 3, 6 a 10 dpi H3N2 sme usmrtili a odpitvali 4 ks BALB/c myši z každej pokusnej skupiny.

Spracovanie splenocytov na FACS: sleziny sme homogenizovali pomocou 70 μ m nylonových sítiok (BD Falcon, Cell Strainer) a lyzovali erytrocyty.

Spracovanie pľúc na FACS: po odpitvaní a premytí v PBS na ľade sme pridali kolagenázu 0,02 mg/ml (Roche, Collagenase D) a postupovali rovnako ako pri spracovaní sleziny.

Prietoková cytometria (FACS):

panel použitých Abs – Rat monoclonal to CD3 epsilon PE (abcam), Anti-Mouse CD3c PE (eBioscience), Anti-Mouse CD4 PerCP – Cy 5.5 (eBioscience), Anti-Mouse CD8a/Lyt – 2 – FITC (BECKMAN COULTER), Anti-Mouse CD45 PE (eBioscience), Anti-Mouse CD19

FITC (CD5) (PROIMMUNE)

Izolácia celkovej DNA: s použitím *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega).

nPCR: s použitím *Go Taq Green Master Mix* (Promega).

Primery (Sigma) - **M7F1**- 5'-CTCGAACAACAATCCCCTACTACA-3'
M7R1- 5'-CGTATCCAAAGCAGGGTAGAAA-3'
M7F2- 5'-GCCCAAATGGTGAGAGTGTA-3'
M7R2- 5'-GGTGGGTTTCATCTTCCTGATT-3'

Výsledky a diskusia

V prvom kroku sme sa zamerali na navodenie akútnej infekcie MHV-68 u BALB/c myši. Následne sme 45 dní po infekcii (dpi) navodili u myši chronicky infikovaných MHV-68 akútnu chrípkovú infekciu. Vytvorili sme tak tri skupiny experimentálnych zvierat: myši infikované len herpetickým vírusom MHV-68, myši infikované len chrípkou H3N2 a myši dvojito infikované MHV-68/H3N2. V ďalšom kroku sme 3, 6 a 10 dpi chrípkovým vírusom usmrtili a odpitvali 4 ks BALB/c myši z každej pokusnej skupiny. Pomocou priamej imunofluorescencie sme metódou FACS s použitím komerčných Abs stanovovali percentuálne zastúpenie jednotlivých lymfoidných buniek na základe prítomnosti povrchových CD markerov na splenocytoch a bunkách pľúcneho tkaniva. Okrem toho, že sme sa zamerali na zmeny v percentuálnom zastúpení jednotlivých buniek imunitného systému v dôsledku dvojitej infekcie v porovnaní len so samotnou herpetickou a chrípkovou infekciou, zaujímala nás aj prítomnosť alebo absencia gp150 (M7 MHV-68) v jednotlivých orgánoch v priebehu infekcie.

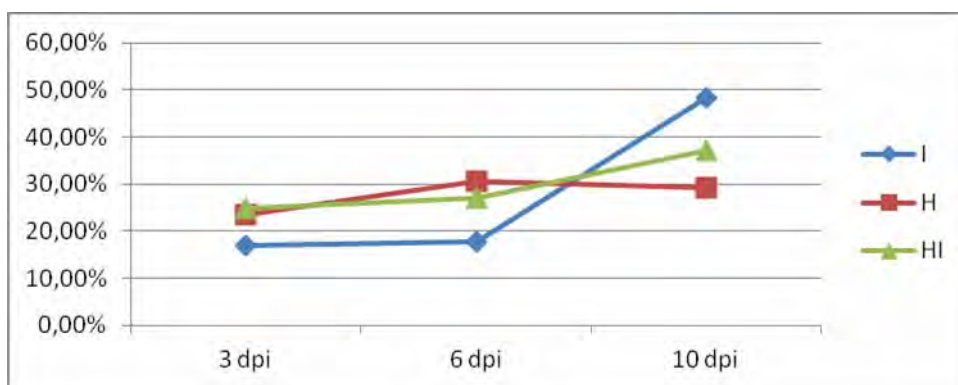
V percentuálnom zastúpení jednotlivých CD markerov na povrchu splenocytov, rovnako ako aj v samotnom priebehu kriviek u všetkých experimentálnych skupín, sme nezaznamenali štatisticky významné odchýlky. Markantnejšie zmeny však bolo možné pozorovať v pľúcnych bunkách. Jednak došlo k rozdielom v počte jednotlivých leukocytov, bol však viditeľný aj odlišný priebeh počas dĺžky trvania infekcie. U dvojito infikovaných myši boli krivky v prospech H3N2 infekcie v porovnaní s MHV-68.

Akútna chrípková infekcia myši latentne infikovaných MHV-68, v porovnaní so samotnou akútnou H3N2 infekciou, spôsobila redukciiu CD8⁺ T-bunkovej odpovede v pľúcach, zodpovednej za viaceré prejavy ochorenia (Obr.1). Vzhľadom na to, že sú CTL nevyhnutné aj pri odstránení produktívnej infekcie z pľúc, spomínaná redukcia nemala pozitívny vplyv na prežívanie dvojito infikovaných zvierat. Napriek subletálnej dávke H3N2 došlo 11-12 dpi k úmrtiu 3 ks experimentálnych myši. Pravdepodobne došlo u MHV-

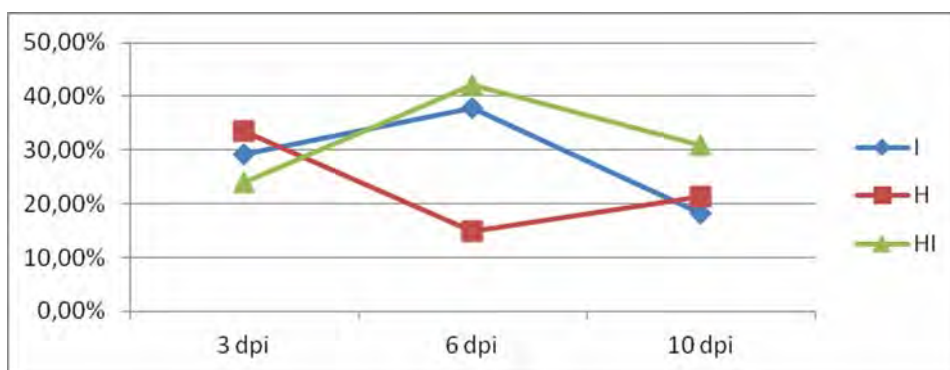
68/H3N2 BALB/c myši k zníženiu cytotoxickej reakcie, k patologickej zápalovej infiltrácii pľúc neutrofilmi a CD19+ B-lymfocytmi (Obr.2).

Počas celej dĺžky trvania infekcie sme v pľúcnom tkanive zaznamenali najvyššie hodnoty CD4+ T-lymfocytov vo všetkých pokusných triedach, avšak s odlišnými priebehmi. U koinfikovaných jedincov sme pozorovali neskorší nástup v porovnaní s izolovanými infekciami a vrchol na 6 dpi (Obr.3). V porovnaní s MHV-68 infekciou došlo k ich poklesu, čo však výrazne neovplyvnilo infiltráciu sleziny B-lymfocytmi ani samotnú tvorbu protilátok, ktoré sú kritické z hľadiska prevencie reaktívácie a neutralizácie vírusu.

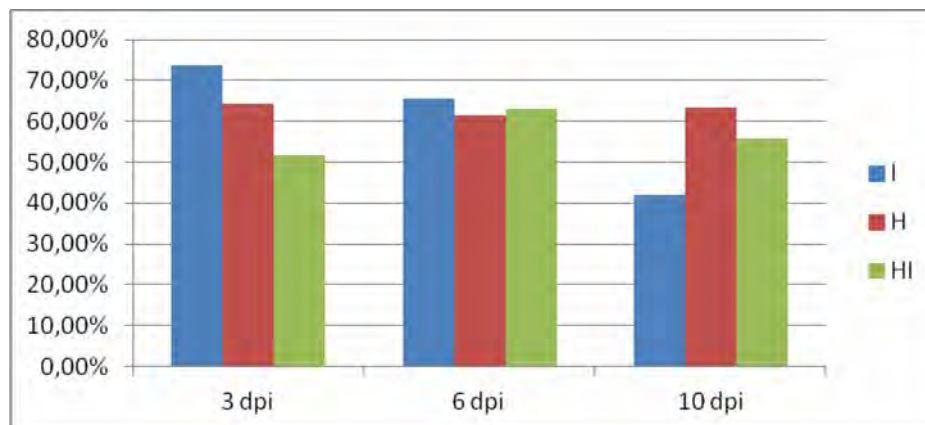
V pľúcach MHV-68/H3N2 myši v porovnaní s MHV-68 infekciou bolo možné pozorovať nárast CD8+ T-bunkovej aj CD19+ B-bunkovej odpovede. S najväčšou pravdepodobnosťou dvojitá vírusová záťaž stimulovala imunitný systém k odstráneniu akútnej chrípky, čím došlo k výraznej reaktívácii herpetického vírusu v bunkách pľúcného tkaniva u 75% vyšetovaných pľúc. Podnetom k reaktívácii mohla byť klonálna expanzia latentne infikovaných B-lymfocytov (Tab.1).



Obr. 1 Percentuálne zastúpenie CD4-/CD8+ T-lymfocytov v pľúcach (I=H3N2, H=MHV-68, HI=MHV-68/H3N2)



Obr. 2 Percentuálne zastúpenie CD45+/CD19+ B-lymfocytov v pľúcach (I=H3N2, H=MHV-68, HI=MHV-68/H3N2)



Obr. 3 Percentuálne zastúpenie CD4+/CD8- T-lymfocytov v pľúcach (I=H3N2, H=MHV-68, HI=MHV-68/H3N2)

Tab. 1 Detekcia gp150 (M7 MHV) v jednotlivých orgánoch

	48 dpi MHV-68, 3 dpi H3N2		51 dpi MHV-68, 6 dpi H3N2		55 dpi MHV-68, 10 dpi H3N2	
	H	HI	H	HI	H	HI
pľúca A	-	+	+	+	+	+
pľúca B	+	+	+	+	-	+
pľúca C	-	+	-	+	-	+
pľúca D	-	+	-	-	-	+
týmus	+	+	+	+	-	+
perit.makrof.	+	+	-	+	-	-
slezina	+	+	+	+	+	+
srdce	+	+	+	+	-	-
pečeň	+	+	+	+	+	-
obličky	+	+	-	+	-	-
tenké črevo	+	+	+	+	+	+
kostná dreň	+	-	+	+	+	-
mozog	+	+	+	+	+	-

H=MHV-68, HI=MHV-68/H3N2, dpi=dni po infekcii

Záver

V experimentálnej skupine MHV-68/H3N2 BALB/c myši, v porovnaní so samotnou H3N2 infekciou, došlo k zníženiu CD8+ cytotoxickej reakcie, k patologickej zápalovej infiltrácii pľúc neutrofilmi a CD19+ B-lymfocytmi. V porovnaní s MHV-68 infekciou došlo u dvojito infikovaných myši k poklesu CD4+ T-lymfocytov, čo však výrazne neovplyvnilo infiltráciu sleziny B-lymfocytmi ani samotnú tvorbu protilátok, ktoré sú kritické z hľadiska prevencie reaktivácie a neutralizácie vírusu. V pľúcach MHV-68/H3N2 myši v porovnaní s MHV-68 infekciou bolo možné pozorovať nárast CD8+ T-bunkovej aj CD19+ B-bunkovej odpovede. S najväčšou pravdepodobnosťou dvojitá vírusová záťaž stimulovala imunitný systém k odstráneniu akútnej chrípky, čím došlo k výraznej reaktivácii herpetického

vírusu v bunkách pľúcneho tkaniva u 75% vyšetovaných pľúc. Podnetom k reaktivácii mohla byť klonálna expanzia latentne infikovaných B-lymfocytov.

PodĎakovanie

Táto práca bola zrealizovaná s finančnou podporou projektov VEGA 1/0185/11, VEGA 1/1340/12, UK/186/2013.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Katze M. G., He Y., Gale M. Jr. (2002) *Nat Rev Immunol.* 2, p. 675
- [2] Mossman K. L., Ashkar A. A. (2005) *Viral Immunol.*, 18, p. 267
- [3] Durand V., Wong S. Y., Tough D. F., et al. (2004) *Immunol Cell Biol.* 82, p. 596
- [4] Tsai Ch.-Y., Hu Z., Zhang W., et al. (2011) *Viral Immunol.* 24(4), p. 273
- [5] Ehtisham S., Sunil-Chandra N. P., Nash A. A. (1993) *J. Virol.* 67, p. 5247
- [6] Nash A. A., Dutia B. M., Stewart J. P., et al. (2001) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 356, p. 569
- [7] Stevenson P. G., Boname J. M., de Lima B., et al. (2002) *Microbes Infect.* 4, p. 1177
- [8] Weck K. E., Barkon M. L., Yoo L. I., et al. (1996) *J. Virol.* 70, p. 6775
- [9] Sparks-Thissen R., Braaten D. C., Kreher S., et al. (2004) *J. Virol.* 78(13), p. 6827
- [10] Usherwood E. J., Ross A. J., Allen D. J., et al. (1996) *J. Gen. Virol.* 77, p. 627
- [11] Cush S. S., Anderson K. M., Ravneberg D. H., et al. (2007) *J. Immunol.* 179, p. 141
- [12] Freeman M. L., Lanzer K. G., Cookenham T., et al. (2010) *J. Virol.* 84, p. 2881
- [13] Fuse S., Obar J. J., Bellfy S., et al. (2006) *J. Virol.* 80, p. 9159
- [14] Cardin R. D., Brooks J. W., Sarawar S. R., et al. (1996) *J. Exp. Med.* 184, p. 863
- [15] Doherty P. C., Topham, D. J., Tripp R. A., et al. (1997) *Immunol. Rev.* 159, p. 105
- [16] Weck K. E., Kim, S. S., Virgin H. W., et al. (1999) *J. Virol.* 73, p. 4651
- [17] Blaškovič D., Stančeková M., Svobodová J., et al. (1980) *Acta Virol.* 24, p. 468

Ovplyvňovanie bachorovej fermentácie, ciliátovej protozoálnej populácie a obsahu mastných kyselín kombináciou chitosanu s olejmi *in vitro*

Monika Wencelová, Zora Váradyová, Katarína Mihaliková, Svetlana Kišidayová, Dušan Jalč

*Slovenská akadémia vied, Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Šoltésovej 4-6,
040 01 Košice, Slovenská republika; wencelova@saske.sk*

Abstrakt

The aim of this *in vitro* study was to determine the effects of chitosan (CH), sunflower (SO) and rapeseed oil (RO) on the fermentation, protozoan ciliate population and fatty acids composition, especially of *trans* vaccenic acid (TVA, t11C18:1) and conjugated linoleic acid (cis9, trans11CLA, c9t11CLA) in rumen fluid. Rumen fluid mixed with McDougall's buffer was added to the fermentation bottles containing three different diets: high fibre (HF), high concentrate (HC) and maize silage (MS). Batch culture fermentations were carried out at 39 °C for 72 h in 2 repeated experiments. The *in vitro* dry matter degradability (IVDMD) of chitosan and some oil treatments in the HF diet decreased significantly in comparison with the control. Chitosan and plant oils have unfavorable effect on the population of rumen cellulolytic ciliate. Plant oil treatments and treatment in combination with CH had impact on TVA concentration, when HF- and HC-diets were used. The concentration of c9 t11CLA was increased in all three diets supplemented with plant oils compared to the control.

KLúčové slová: *chitosan; slnečnicový olej; repkový olej; ciliáty; mastné kyseliny; in vitro.*

Úvod a formulácia cieľa

V posledných rokoch stúpa dopyt po bezpečných živočíšnych produktoch podporujúcich zdravie konzumenta. Preto je potrebné nájsť látky prírodnej povahy, ktoré by pozitívne ovplyvňovali bachorovú fermentáciu, utilizáciu energie, produktivitu a zmiernili by dopad živočíšnej výroby na životné prostredie.

Chitosan (N-acetyl-D-glukozamín) je netoxický, prírodný, biodegradovateľný biopolymér [1] získaný deacetyláciou chitínu, ako základnej zložky ulít kôrovcov [2]. Jeho antimikrobiálne vlastnosti sú široko akceptované [3, 4, 5], navyše nedávne štúdiá naznačujú, že chitosan spolu s repkovým a slnečnicovým semenom, ako zdrojmi tukov, inhibujú bachorovú biohydrogenáciu *in vitro* [2]. Významnými medziproduktmi biohydrogenácie, procesu mikrobiálnej premeny nenasýtených mastných kyselín na nasýtené, je konjugovaná linolová kyselina (CLA) hlavne jej izomér cis9 trans11 CLA (c9,t11CLA) a *trans* vaskénová kyselina (t11C18:1 TVA). Niektoré štúdiá ukazujú, že tak ako baktérie aj bachorové ciliáty hrajú dôležitú úlohu v procese biohydrogenácie [6, 7, 8,] a preto účinok použitia chitosanu samotného alebo v kombinácii so zdrojmi polynenasýtených mastných kyselín (PUFA) môže byť u prežúvavcov diskutabilný, hlavne kvôli jeho antimikrobiálnym vlastnostiam.

Cieľom našej práce bolo zistiť vplyv samotného chitosanu a chitosanu v kombinácii

s rastlinnými olejmi (slniečnicový, repkový) na fermentáciu, ciliátovú populáciu a na zloženie mastných kyselín v bachore prežúvavcov *in vitro*.

Materiál a metódy

Príprava inokula a podmienky *in vitro* fermentácie – bachorový obsah bol získaný od 4 fistulovaných oviec (plemeno – Slovenské merino) pred ranným kŕmením. Kŕmna dávka oviec pozostávala z 960 g sušiny lúčneho sena a 240 g sušiny mletého jačmeňa, rozdelená na dve kŕmenia za deň. Po precedení cez štyri vrstvy gázy bola bachorová tekutina zmiešaná s McDougallovým pufrom [9] v pomere 1:1. Inokulum bolo v množstve 35 ml automaticky dávkané do fermentačných fliaš (NTS-100 ml), ktoré obsahovali substrát. Po prebublani s CO₂ boli fermentačné fľaše uzatvorené a umiestnené do termostatu. *In vitro* inkubácia trvala 72 hod., pri teplote 39 ± 0,5 °C.

Substráty a aditíva – základ vysoko-vláknitej (VV) a vysoko-koncentrátovej (VK) diéty tvorili lúčne seno a jačmeň, ktoré boli zomleté a preosiate cez sitá s veľkosťou 0,15-0,4 mm, následne navážené v množstve 0,25g do jednotlivých fermentačných fliaš. Kukuričná siláž v množstve 1,5 g/ NTS predstavovala tretiu diétu (KS). K týmto substrátom boli pridávané aditíva- slnečnicový (SO) a repkový olej (RO) v množstve 35 g/kg sušiny a chitosan (CH) v množstve 100 mg/l bachorového inokula.

Experiment – pre každú diétu bolo použitých desať fermentačných fliaš ako kontrola (inokulum + substrát), súbežne bol pripravený rovnaký počet fliaš pre VV, VK, KS diétu v kombinácii s každým aditívom - CH, SO, RO a s kombináciou aditív – CH+SO, CH+RO. Slepé vzorky obsahovali iba inokulum bez substrátu a bez aditív.

Chemické analýzy – sušina, popol, acid-detergentná a neutrál-detergentná vlákna, dusík, tuk a dusíkaté látky vo všetkých substrátoch boli stanovené v triplikátoch [10]. Množstvo uvoľneného fermentačného plynu a stráviteľnosť *in vitro* (IVDMD) boli merané fermentačnými technikami [11]. Koncentrácia metánu bola analyzovaná použitím plynového chromatografu Perkin - Elmer Clarus 500 (Perkin - Elmer, Inc. Shelton, Connecticut, USA). Koncentrácia krátkoreťazcových mastných kyselín (SCFA) bola stanovená po 72 hod. inkubácii plynovým chromatografom Perkin - Elmer Clarus 500 s použitím kyseliny krotónovej ako interného štandardu. Koncentrácia vyšších mastných kyselín bola stanovená z lyofilizovaných vzoriek [12]. Počet a druh ciliát sa určoval v duplikátoch mikroskopicky [13]. Namerané hodnoty boli štatisticky vyhodnotené pomocou dvojcestnej analýzy variancie (Graphpad Instat, Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA) a Bonferroniho *post-* testu.

Výsledky a diskusia

Stráviteľnosť *in vitro* a základné fermentačné parametre sú uvedené v tabuľke č.1. Výsledky nášho experimentu ukázali zníženie stráviteľnosti všetkých diét pri kombinácii chitosanu s rastlinnými olejmi, hlavne pri vysoko-koncentrátovej diéte, čo je v súlade s výsledkami, ktoré boli namerané v bachor simulujúcom zariadení - Rusiteku [14]. Koncentrácia celkových krátkoreťazcových mastných kyselín v rámci jednotlivých diét bola variabilná, pravdepodobne ako dôsledok rôzneho počtu a aktivity mikrobiálneho ekosystému v bachovej tekutine. Množstvo uvoľneného fermentačného plynu a koncentrácia metánu neboli štatisticky významné, pravdepodobne pre vyššiu rezistenciu metanogénov k použitým aditívam, v porovnaní s celulolytickými baktériami.

Koncentrácia hlavných sledovaných izomérov nenasýtených mastných kyselín (c9t11CLA a TVA) bola ovplyvnená pri jednotlivých diétach s rastlinnými olejmi ako aj pri kombinácii chitosanu a olejov (tabuľka č.1). Zvýšená koncentrácia TVA bola zaznamenaná hlavne vo vysoko-vláknitej a vysoko-koncentrátovej diéte. Koncentrácia izoméru c9t11CLA bola pozitívne ovplyvnená olejovými aditívami a ich kombináciou s chitosanom vo všetkých diétach. Je zrejmé, že zvýšená koncentrácia TVA a c9t11CLA a znížená koncentrácia kyseliny stearovej v bachorovej tekutine, pri použití slnečnicovej a repkovej diéty môže byť spôsobená vplyvom chitosanu na biohydrogenáciu mastných kyselín [2]. Chitosan pravdepodobne ovplyvňuje rast bachorových mikroorganizmov, ktoré by sa mohli podieľať na lipolyze alebo do záverečnej fázy vytvárania kyseliny steárovej. V našom experimente samotný chitosan neovplyvnil koncentráciu TVA a c9t11CLA, čo môžeme pripísať použitej nižšej dávke chitosanu (100mg/l), typu diéty alebo účinku olejových aditív.

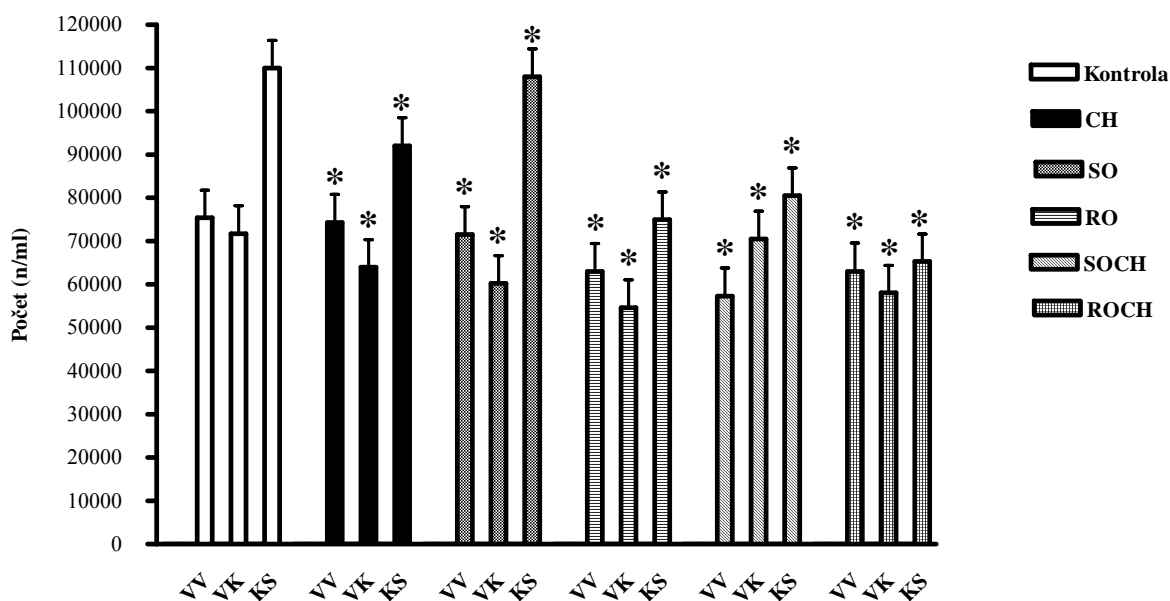
Chitosan samotný, ale aj v kombinácii s rastlinnými olejmi znížil celkový počet ciliát (obr. č.1). Bachorové ciliáty participujú na trávení vlákniny a škrobu a rôzne diéty ovplyvňujú relatívny počet protozoí a baktérií v bachore ako aj rozsah bachorovej fermentácie. [15]. V našom pokuse sme zaznamenali hlavne pokles počtu ciliát *Entodinium spp.* pri všetkých použitých diétach s chitosanom samotným aj v kombinácii s olejmi (obr. č.2). Je pravdepodobné, že medzi celulolytickými a fibrolytickými druhmi ciliát v bachore existuje kompetícia o škrob a menšie množstvo škrobu preferujú hlavne fibrolytické ciliáty [16]. Na druhej strane je známe, že diéty bohaté na zdroje C18 mastných kyselín, ako je napr. slnečnicový olej, môžu viesť k úplnej eliminácii bachorových protozoí [17]. Je zrejmé, že aditíva použité v našom experimente (chitosan a oleje) mali antiprotozoálny efekt, ale potenciováný efekt aditív v našom pokuse bol evidentný iba u kukuričnej siláže.

Tab. 1 Vplyv chitosanu a rastlinných olejov na fermentačné parametre a hlavne izoméry mastných kyselín vo vysoko-vláknitej (VV), vysoko-konzentratovej (VK) diéte a kukuričnej siláži (KS) *in vitro* (n=10)

	Diéta	Kontr	CH	SO	RO	SOCH	ROCH	SEM	A	D	AxD
IVDMD (g/kg sušiny)	VV	631	574 ^b	583 ^a	589	597	547 ^c	10,9			
	VK	761	717 ^a	734 ^b	625 ^c	634 ^c	615 ^c	12,6	*	*	*
	KS	539	532	491 ^a	555	471 ^c	536	11,7			
Plyn (ml/g sušiny)	VV	230	205	200	210	195	200	8,2			
	VK	240	220	200	220	190	205	8,1	*	Ns	Ns
	KS	240	210	210	220	205	210	7,7			
Metán (10 ² ml/ml)	VV	6,13	6,12	4,91	6,14	4,58	6,41	0,587			
	VK	5,44	4,40	6,39	5,28	4,81	6,70 _A	0,689	*	*	*
	KS	10,2	6,04 ^b	9,01	9,61	7,88 ^a	10,8 _C	0,526			
SCFA (mmol/l)	VV	60,0	75,9 ^c	75,0 ^c	67,7	69,8 ^c	68,8 ^c	1,08			
	VK	71,5	66,3 ^c	68,1 ^c	68,4	70,5 _C	69,4 ^a _C	0,64	*	*	*
	KS	87,9	85,0 ^b	104 ^c	62,0 ^c	103 ^c	62,7 ^c	0,89			
Acetát (mol%)	VV	70,4	70,0	69,0	70,0	69,5	70,3	2,98			
	VK	68,3	68,7	67,7	67,8	68,5	68,3	2,23	Ns	Ns	Ns
	KS	66,4	67,0	67,0	66,7	66,5	66,3	1,79			
Propionát (mol%)	VV	17,4	18,1	18,4	18,5	18,5	18,2	1,26			
	VK	18,2	18,3	18,3	19,1	18,3	19,0	1,13	Ns	Ns	Ns
	KS	19,0	18,8	18,7	19,9	19,1	20,7	1,36			
Butyrát (mol %)	VV	7,42	7,18	7,48	7,11	7,43	6,99	0,568			
	VK	8,27	8,15	8,48	8,20	8,29	8,08	0,446	Ns	Ns	Ns
	KS	10,9	10,2	10,0	9,95	10,4	9,46	0,693			
TVA (g/kg MK)	VV	14,4	20,6	136 ^c	141 ^c	155 ^c	137 ^c	3,02			
	VK	32,3	37,7	130 ^c	145 ^c	111 ^c	155 ^c	3,27	*	*	*
	KS	51,1	54,2	57,6	52,3	58,3	55,1	2,96			
CLA (g/kg MK)	VV	0,0	0,0	10,3 ^c	11,8 ^c	13,2 ^c	10,8 ^c	0,968			
	VK	0,0	0,0	19,3 ^c	12,9 ^c	13,7 ^c	14,2 ^c	1,297	*	*	*
	KS	0,0	0,0	6,03 ^c	6,53 ^c	12,0 ^c	7,21 ^c	1,133			

Hodnoty sú priemery meraní (n=10), SEM-štandardná chyba priemeru, D, diéta; CH, chitosan; SO, slnečnicový olej; RO, repkový olej; SOCH chitosan + SO; ROCH, chitosan+ RO; A, aditívum; AxD, interakcia aditíva a diéty; MK, mastné kyseliny; IVDMD, stráviteľnosť *in vitro*; SCFA, krátkoreťazcové mastné kyseliny; TVA, kys. trans-vakcénová; CLA, konjugovaná kys. linolová; Ns, nesignifikantné. (^{a,b,c}) vyjadruje rozdiely skupín od kontroly (P<0,05) a dolný index vyjadruje rozdiely CH vs SOCH a CH vs ROCH (P<0,05).

*P<0,001.



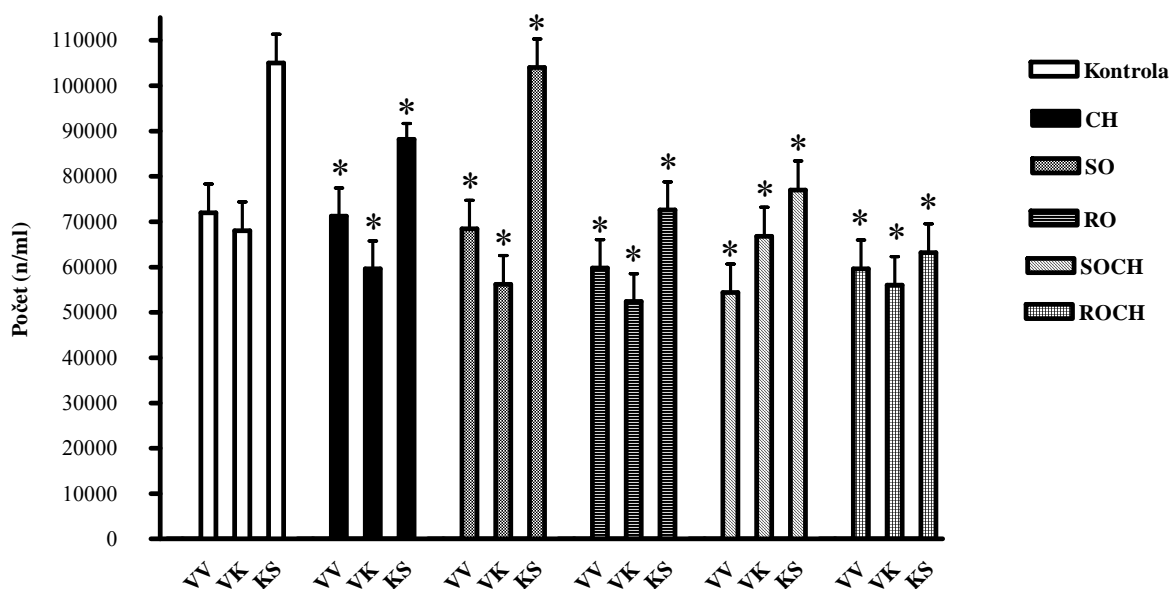
Obr.1 Celkový počet bachorových ciliát

Hodnoty predstavujú priemery meraní (n=10) ± SEM (štandardná chyba priemeru).

Hlavný efekt: Aditívum (A): P<0,001; Diéta (D): P<0,001; AxD: P< 0,001

*P< 0,001 predstavuje rozdiely od kontrol

VV, vysoko - vláknitá diéta; VK, vysoko - koncentrátová diéta; KS, kukuričná siláž; CH, chitosan; SO, sľečnicový olej; RO, repkový olej; SOCH, chitosan+SO; ROCH, chitosan+RO.



Obr.2 Počet Entodinium spp.

Hodnoty predstavujú priemery meraní (n=10) ± SEM (štandardná chyba priemeru)

Hlavný efekt: Aditívum (A): P< 0,001; Diéta (D): P< 0,001; AxD: P< 0,001

* P<0,001 predstavuje rozdiely od kontrol

VV, vysoko - vláknitá diéta; VK, vysoko - koncentrátová diéta; KS, kukuričná siláž; CH, chitosan; SO, sľečnicový olej; RO, repkový olej; SOCH, chitosan+SO; ROCH, chitosan+RO

Záver

Na základe získaných výsledkov môžeme konštatovať, že chitosan samotný znížil stráviteľnosť *in vitro*, produkciu celkových krátkoreťazcových mastných kyselín a nepriaznivo vplýval na celkový počet ciliát a počet ciliát *Entodinium spp.* Pri kombinácii so slnečnicovým a repkovým olejom pozitívne modifikoval koncentráciu izomérov c9t11CLA a TVA v bachorovej tekutine. Chitosan pri použití vhodného zdroja polynenasýtených mastných kyselín môže priaznivo ovplyvňovať proces bachorovej fermentácie.

Pod'akovanie

Tento experiment bol podporovaný Vedeckou grantovou agentúrou Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied VEGA č. 2/0001/11.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Muzzarelli R. (1993) Carbohydr. Polym. 20 (1), p. 7
- [2] Goiri I., Indurain G., Insausti K., et al. (2010) Anim. Feed Sci. Technol. 159, p. 35
- [3] Paik I. (2001) Asian Austral J Anim. 14, p. 191
- [4] Rabea E. I., Badawy M. E. T, Stevens C. V., et al. (2003) Biomacromolecules. 4, p.1457
- [5] Kong M., Chen X. G., Xing K., et al. (2010) Int. J. Food Microbiol. 15, p. 51
- [6] Devillard E., McIntosh F. M., Newbold C. J., et al. (2006) Br. J. Nutr. 96, p. 697
- [7] Or-Rashid M. M., Odongo N. E., McBride B. W. (2007) J. Anim. Sci. 85, p. 1228
- [8] Váradyová Z., Kišidayová S., Siroka P., et al. (2008) Anim. Feed Sci. Technol. 144, p.44
- [9] McDougall E. I., (1948) Biochemical J. 43, p. 99
- [10] AOAC (1990) Assoc. Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA, p. 1230
- [11] Váradyová Z., Baran M., Zeleňák I. (2005) Anim. Feed Sci. Technol. 123-124, p. 81
- [12] Váradyová Z., Kišidayová S., Siroka P., et al. (2007) Czech J. Anim. Sci. 52, p. 399
- [13] Coleman G.S. (1978) Rumen entodiniomorphid protozoa. London Academic Press, p.39
- [14] Goiri I., Garcia-Rodriguez A., Oregui L.M. (2009) Anim. Feed Sci. Technol. 148, p.276
- [15] Michalowski T. (1975) J. Agric. Sci. Camb. 85, p. 151
- [16] Belžecki G., Michalowski T. (2001) J. Anim. Feed Sci. 10, p. 141
- [17] Ivan M., Mir P. S., Mir Z., et al. (2004) Br. J. Nutr. 92, p. 303

2-hydroxy-N-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidy – Potenciální léčiva infekcí MRSA?

Iveta Zadražilová^{1,2}, Karel Pauk³, Aleš Imramovský³, Jiří Hanusek³, Martina Masaříková²,
Alois Čížek², Josef Jampílek¹

¹Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Ústav chemických
léčiv, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, Česká republika; izadrazilova@vfu.cz

²Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinárního lékařství, Ústav
infekčních chorob a mikrobiologie, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, Česká republika

³Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Ústav organické chemie
a technologie, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Česká republika

Abstrakt

Antibacterial resistance is a growing worldwide problem that complicates the treatment of important nosocomial and community-acquired infections. The most common example of clinically relevant multiresistant bacterial pathogen isolated almost all over the world is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Thus, there is an urgent need for new anti-MRSA agents. Salicylanilides seem to be promising candidates of antibacterial agents with a novel mechanism of action. A series of salicylanilide derivatives, diamides, was evaluated for its antibacterial activity against MRSA using the broth dilution micro-method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). Minimum bactericidal concentration (MBC) of diamides was also evaluated. Structure-activity relationship (SAR) of the tested compounds will be discussed.

Klíčová slova: MRSA; diamidy; antibakteriální aktivita; MIC; MBC.

Úvod a formulace cíle

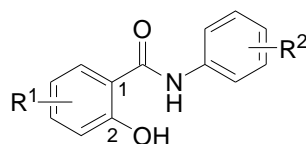
Objev antibakteriálně účinných látek bývá právem řazen mezi jeden z největších mezníků vědy 20. století. Časté užívání antibakteriálních léčiv v humánní i veterinární medicíně, zemědělství či potravinářském průmyslu však vede k selekci mikroorganismů rezistentních k antimikrobiálním látkám. V současné době není výskyt rezistentních patogenů problémem pouze nemocničního prostředí, jako tomu bylo dříve, ale stále častěji se s kolonizací multirezistentními mikroorganismy setkáváme i u ambulantních pacientů bez známých rizikových faktorů pro rozvoj rezistence [1].

Klasickým příkladem multirezistentního kmene je meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA). MRSA byl poprvé popsán v roce 1961 a od té doby se stal jedním z nejobávanějších bakteriálních patogenů izolovaných po celém světě. Přestože byl zpočátku jeho výskyt limitován na nemocniční prostředí, v současné době se MRSA rovněž stává původcem infekcí v komunitě. Infekce vyvolané tímto kmenem bývají i nadále spojené se závažnými klinickými důsledky (selhání léčby, nárůst morbidit a mortality zejména u

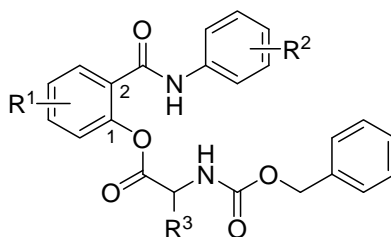
hospitalizovaných pacientů, prodloužení hospitalizace, navýšení léčebných nákladů apod.) [2].

Jedním z klíčových řešení problému bakteriální rezistence může být mimo striktní dodržování zásad racionální antibiotické terapie i syntéza látek s novým mechanismem antibakteriálního účinku [3], která se ale neobejde bez následného zhodnocení biologické aktivity těchto látek, zejména schopnosti inhibovat růst bakteriálních kultur.

Cílem této práce bylo zhodnotit antibakteriální aktivitu nově syntetizovaných látek ze skupiny derivátů salicylanilidů (2-hydroxy-*N*-fenylbenzamidů) proti MRSA. Salicylanilidy **1** (Obr. 1), estery **2** (Obr. 2), ale i jiné deriváty salicylanilidů jsou skupinou aromatických látek s širokým spektrem farmakologických vlastností a atypickým mechanismem účinku [4].

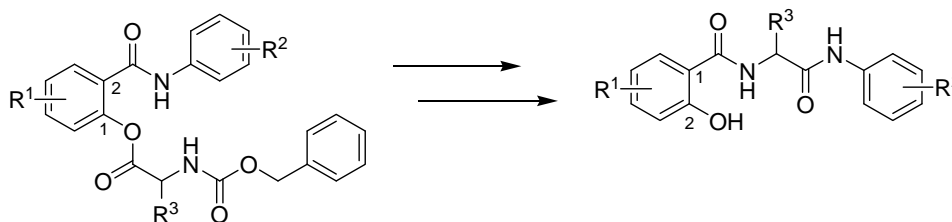


Obr. 1 Obecná struktura salicylanilidů **1**



Obr. 2 Obecná struktura esterů **2**

Předmětem testování byly 2-hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidů (dále diamidy **3a-i**). Tyto látky byly izolovány jako majoritní produkt při deprotekcí amino skupiny esterů **2** (Obr. 3) [5].



Obr. 3 Naznačení vzniku diamidů **3a-i** z esterů aminokyselin a salicylanilidů

Prokázání antibakteriální aktivity diamidů a poznání zákonitostí vztahu mezi jejich strukturou a biologickou aktivitou by mohlo přispět k upřesnění směřování dalšího vývoje nových antibakteriálních léčiv, a tak přispět k rozšíření spektra používaných léčiv.

Materiál a metody

Antibakteriální aktivita 9 diamidů **3a-i** byla otestována proti 4 kmenům rodu *Staphylococcus*, jednalo se o 1 sbírkový kmen *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, který sloužil jako referenční kmen a kontrola kvality testování, a 3 klinické izoláty MRSA, z nichž 2 poskytl SZÚ Praha (MRSA SA 630, MRSA SA 3202) a jeden pocházel z laboratorní sbírky VFU Brno (MRSA 63718). Veškerá stanovení byla provedena triplicitně.

Ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla použita bujonová mikrodiluční metoda. Z 24hodinové kultury bakteriálního kmene bylo připraveno bakteriální inokulum o zákalu, který odpovídal hodnotě 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice. Toto inokulum bylo dále ředěno sterilním Mueller-Hintonovým (MH) bujonem v poměru 1:20, takže konečný počet bakteriálních buněk inokula byl asi $7,5 \times 10^6$ CFU/ml. Suspenze bakteriální kultury v MH bujonu byla rozpipetována do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky. Testované látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a jejich dvojnásobným ředěním v mikrotitrační destičce byla získána požadovaná koncentrace v jednotlivých jamkách (koncentrační řada 256–0,008 $\mu\text{g/ml}$), přičemž koncentrace DMSO nepřesáhla 2,5%. Jako referenční antibakteriální látky byly použity ampicilin (AMP), ciprofloxacin (CPX) a vankomycin (VAN) o koncentrační řadě 16–0,5 $\mu\text{g/ml}$. Každá destička zahrnovala i kontrolu růstu, kontrolu sterility a kontrolu vlivu DMSO na růst bakteriální kultury. Inkubace probíhala staticky 24 hodin při teplotě 37°C. MIC byla definována jako nejnižší koncentrace testované látky, která inhibovala makroskopicky viditelný růst bakterií.

Následnou subkultivací 20 μl z každé jamky destičky po odečtení MIC na Mueller-Hintonův agar (MHA) byla stanovena minimální baktericidní koncentrace (MBC). Inkubace probíhala staticky 24 hodin při teplotě 37°C. MBC byla definována jako nejnižší koncentrace látky, při níž na miskách nebyl patrný růst, případně byly přítomny méně než 3 kolonie.

Výsledky a diskuze

DMSO vykazuje sám o sobě antibakteriální vlastnosti [6]. Proto byl nejprve posouzen vliv tohoto námi použitého rozpouštědla na růst testovaných kultur a bylo zjištěno, že DMSO v koncentraci 2,5% bakteriální růst neovlivňoval.

Naměřené hodnoty MIC a MBC pro 9 látek ze skupiny diamidů **3a-i** uvádí Tab. č. 1.

Tab. 1 Hodnoty MIC a MBC testovaných diamidů

Látka	R ¹	R ²	R ³	MIC [μg/ml]				MBC [μg/ml]			
				<i>S. aureus</i> ATCC 29213	MRSA 63718	MRSA SA 630	MRSA SA 3202	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	MRSA 63718	MRSA SA 630	MRS A SA 3202
3a	5-Cl	4-Me	(<i>S</i>)-CH(CH ₃) ₂	32	>256	>256	32	>256	>256	>256	128
3b	5-Cl	4-OMe	(<i>S</i>)-CH(CH ₃) ₂	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
3c	5-Cl	4-CF ₃	(<i>S</i>)-CH(CH ₃) ₂	2	4	2	2	4	4	4	8
3d	5-Cl	4-Me	(<i>R</i>)-CH ₂ -indolyl	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
3e	4-Cl	3,4-Cl	(<i>S</i>)-CH(CH ₃) ₂	1	2	1	1	2	4	1	4
3f	4-Cl	4-Br	(<i>S</i>)-CH(CH ₃) ₂	4	8	4	4	8	16	8	8
3g	4-Cl	3,4-Cl	(<i>S</i>)-benzyl	0,5	1	1	0,5	1	8	1	8
3h	5-Cl	4-Me	(<i>S</i>)-benzyl	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
3i	5-Cl	4-Me	(<i>S</i>)-CH ₃	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
AMP	–	–	–	0,25	>16	>16	>16	0,25	>16	>16	>16
CPX	–	–	–	0,5	>16	>16	>16	0,5	>16	>16	>16
VAN	–	–	–	1	2	1	1	1	2	1	1

Z celkového počtu 9 diamidů nevykazovalo antibakteriální aktivitu proti MRSA 5 látek (MIC > 256 μg/ml). U 1 látky byla zaznamenána středně silná antibakteriální aktivita (MIC = 4–8 μg/ml) a u zbývajících 3 látek byla pozorována velmi silná antibakteriální aktivita proti MRSA (MIC = 0,5–2 μg/ml). Hodnoty MIC těchto 3 látek byly srovnatelné s hodnotami MIC vankomycinu jako referenční antibakteriální látky. Klinické izoláty MRSA byly nejvíce citlivé k působení látky **3g** (MIC = 0,5–1 μg/ml) a látky **3e** (MIC = 1–2 μg/ml).

Z porovnání hodnot MIC a MBC pro každý bakteriální kmen je zřejmé, že účinek testovaných diamidů byl ve většině případů baktericidní (za baktericidní účinek bylo považováno takové působení testované látky, kdy hodnota MIC byla rovna hodnotě MBC, případně jestliže se hodnota MIC lišila od hodnoty MBC o jedno ředění (MIC = ½ MBC); baktericidní aktivita je v Tab. č. 1 zvýrazněna tučně).

Hodnoty MIC i MBC mezi jednotlivými klinickými izoláty MRSA jsou totožné, případně porovnatelné. Hodnoty MIC i MBC pro jednotlivé klinické izoláty MRSA jsou navíc srovnatelné s hodnotami MIC a MBC pro referenční sbírkový kmen *S. aureus*, z čehož vyplývá, že zde pravděpodobně nedochází ke zkřížené rezistenci se stávajícími antibakteriálními látkami. Zajímavý výsledek v tomto ohledu je však patrný u látky **3a**, pro kterou byl u referenčního kmene a klinického izolátu MRSA SA 3202 zaznamenán středně silný antibakteriální účinek (MIC = 32 µg/ml), kdežto zbývající 2 izoláty MRSA byly vůči působení této látky rezistentní (MIC > 256 µg/ml).

Z výsledků uvedených v tabulce také vyplývá, že pro antibakteriální aktivitu diamidů proti MRSA je výhodná zejména substituce chlorem v pozici C₍₄₎ a dále halogenace v pozici C'₍₄₎ (R₂ = 3,4-Cl, 4-CF₃, 4-Br); jako nejvýhodnější se potom jeví zejména vysoká lipofilita zajištěná disubstitucí chlorem v pozici C'_(3,4). Tyto výsledky tak plně odpovídají předpokladu o nutné přítomnosti halogenu na benzenovém jádře anilinu pro zabezpečení optimální antibakteriální aktivity [7]. Substituce chlorem v pozici C₍₅₎ stejně jako monosubstituce anilinového jádra vedly ke snížení antibakteriální aktivity.

Salicylanilidy jsou považovány za látky s bakteriostatickým účinkem [8], proto bylo zajímavé zjištění, že diamidy působily proti testovaným izolátům většinou baktericidně. Přítomnost amidové vazby (-NHCO-) může být zodpovědná za interakce s celou řadou různých enzymů [9], proto právě přítomnost dvou amidových vazeb by mohla být zodpovědná za baktericidní působení diamidů proti MRSA. Mechanismus účinku salicylanilidů ještě není plně objasněn, avšak bylo např. zjištěno, že salicylanilidy jsou mimo jiné schopny inhibovat transglykosylasy *S. aureus* včetně MRSA. Tyto enzymy se uplatňují v pozdních stádiích syntézy bakteriální buněčné stěny formováním peptidoglykanu a zodpovídají za polymerizaci lipidu II. Celý tento proces se odehrává na vnější straně biomembrány a je následován transpeptidací, tedy tvorbou příčných vazeb mezi řetězci peptidoglykanu [10]. Tato inhibice syntézy bakteriální buněčné stěny by tak mohla být podkladem baktericidního účinku diamidů proti MRSA. Soubor testovaných látek i testovaných bakteriálních kmenů byl však omezený, proto pro zevšeobecnění baktericidního účinku diamidů by bylo nezbytné provést další testování, případně prokázat přesný mechanismus účinku těchto látek.

Závěr

Byla prokázána poměrně silná antibakteriální aktivita vybraných diamidů proti

MRSA, hodnoty MIC aktivních látek se pohybovaly v rozmezí 0,5–8 µg/ml. Pro optimální aktivitu diamidů byla vhodná halogenace anilinového jádra diamidu, a to zejména disubstituce chlorem v pozici C_(3,4). Účinek diamidů byl ve většině případů baktericidní. Na základě výsledků této práce mohou diamidy představovat slibnou skupinu potenciálních léčiv infekcí MRSA, proto by se tyto látky mohly stát východiskem pro další testování (mimo výše zmiňovaný mechanismus účinku dále např. testy cytotoxicity, biologické dostupnosti apod.).

Poděkování

Na tomto místě bychom rádi poděkovali MUDr. Heleně Žemličkové, Ph.D. ze SZÚ Praha za poskytnutí klinických izolátů MRSA.

Práce byla realizována s finanční podporou Interní grantové agentury VFU Brno v rámci projektu 65/2012/FVL. Autoři také děkují za institucionální podporu Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice Ministerstvu školství mládeže a tělovýchovy.

Seznam použité literatury

- [1] Buffet-Bataillon S., Tattevin P., Bonnaure-Mallet M., et al. (2012) *Int. J. Antimicrob. Agents* 39(5), p. 381
- [2] Maltezou H. C., Giamarellou H. (2006) *Int. J. Antimicrob. Agents* 27(2), p. 87
- [3] Bush K., Pucci M. J. (2011) *Biochem. Pharmacol.* 82(11), p. 1528
- [4] Imramovský A., Vinšová J., Monreal Ferriz J., et al. (2009) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19(2), p. 348
- [5] Imramovský A., Vinšová J., Monreal Ferriz J., et al. (2006) *Tetrahedron Lett.* 47 (29), p. 5007
- [6] Basch H., Gadebusch H. H. (1968) *Appl. Microbiol.* 16(12), p. 1953
- [7] Imramovsky A., Pesko M., Kralova K., et al. (2011) *Molecules* 16(3), p. 2414
- [8] Hilliard J. J., Goldschmidt R. M., Licata L., et al. (1999) *Antimicrob. Agents Chemother.* 43(7), p. 1693
- [9] Imramovsky A., Stepankova S., Vanco J., et al. (2012) *Molecules* 17(9), p. 10142
- [10] Cheng T. J. R., Wu Y. T., Yang, S. T., et al. (2010) *Bioorg. Med. Chem.* 18(24), p. 8512

Využitie metódy Multiplex Ligation- dependent Probe Amplification (MLPA) v diagnostike

Martina Zámorová¹, Renata Lukačková²

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

²*Medirex a.s., Galvaniho 17/C, 821 04 Bratislava, Slovenská republika*

Abstrakt

A variety of molecular abnormalities have been demonstrated in leukemia/MDS. These lesions include genetic and chromosomal instability and epigenetic changes. Cytogenetic changes are associated with disease progression. These abnormalities are not well understood. Recent technological advances have led to better insight into the genomic structural variations. The most common copy number changes in MDS (myelodysplastic syndrome) are deletion of chromosome 5 (5q-), monosomy 7 or deletion 7q, trisomy 8, deletion of 20q and isolated loss of Y chromosome. Detailed analysis of these chromosomal imbalances has been improved by the development of molecular technologies, such as Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) and array-based comparative genome hybridization (array-CGH). This article gives an overview of MLPA and their clinical applications in diagnostic. Advantages, limitations and future perspectives of these novel methods are also discussed.

Kľúčové slová: *MLPA; oncology hematologic malignancies*

Úvod a formulácia cieľa

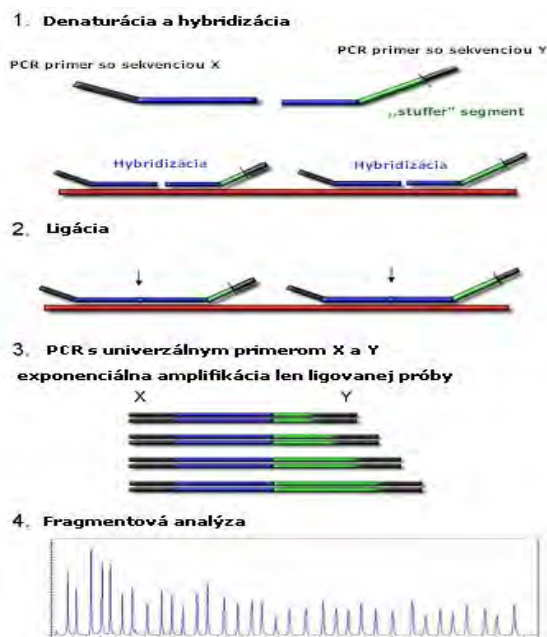
Štruktúrne chromozómové aberácie zohrávajú významnú úlohu pri patogeneze viacerých geneticky podmienených ochorení človeka. U väčšiny týchto ochorení sú prítomné chromozómové abnormality, ktoré nie je možné detegovať bežnými cytogenetickými metódami. Práve vďaka rýchlemu rozvoju a zavádzaniu nových techník molekulárnej cytogenetiky je možné detegovať aj kryptické prestavby chromozómov. Od roku 2002 patrí k takýmto technikám metóda MLPA.

MLPA (Multiplex Ligation-depend Probe Amplification) je multiplexová metóda na stanovenie počtu kópií v jednej reakcii. Využíva až 40-50 prób, každú špecificky sa viažucu k rôznym úsekom DNA [1, 2]. Dokáže kvantifikovať až 50 rôznych sekvencií DNA. Môže detegovať genetické aberácie v prípade 10-20% zastúpenia patologických buniek v testovanej vzorke [3]. Je určená na detekciu malých delécií a amplifikácií, pomocou nej sa dokázu presne stanoviť aj miesta zlomu postihnutých chromozómov. V porovnaní s FISH metódou je cieleňá na veľmi malé sekvencie (50-70 nukleotidov), umožňuje zachytiť jednonukleotidové aberácie, ktoré sú pre FISH veľmi malé. MLPA nie je celogenómovou skriningovou metódou, ale je vhodnou alternatívou array - CGH metódy. MLPA pozostáva zo štyroch základných krokov (Obr. 1). Metóda vyžaduje len veľmi malé množstvo templátovej DNA – 20ng, ktorá

môže byť aj čiastočne degradovaná. Amplifikované produkty každej sondy majú rôznu veľkosť a separujú sa pomocou kapilárnej elektroforézy. Získané výsledné dáta sa vyhodnocujú pomocou komerčne dostupných softvérov a základom je pomer relatívneho množstva amplifikovanej DNA u testovanej vzorky ku kontrolnej vzorke zdravých jedincov [4]. Všeobecne platí, že hodnoty pod 0,7 sú interpretované ako delécie a hodnoty nad 1,3 ako amplifikácie (Tab. 1). V hematológii sa MLPA používa na zistenie zmien počtu kópií a CpG metylácie rôznych génov, charakteristický znak vzniku nádorového bujnenia [5]. Zvyšuje možnosti pre multiplexovú analýzu počtu kópií v rutinnom laboratóriu. MLPA je dôležitou metódou pre potvrdenie patologických výsledkov získaných array - CGH [6]. Metóda MLPA je pomerne novou molekulárno - cytogenetickou metódou, ktorá dokáže detegovať numerické zmeny. Vzorka DNA môže byť rôzneho pôvodu - izolovaná z periférnej krvi, kostnej drene, plodovej vody, choriových klkov.

Princípom MLPA reakcie je hybridizácia MLPA sond k cieľovej sekvencii DNA na základe komplementarity. Každá MLPA sonda je zložená z dvoch oligonukleotidov, jedného krátkeho syntetického oligonukleotidu a jedného dlhého oligonukleotidu pochádzajúceho z fága M13. Krátky syntetický oligonukleotid obsahuje cieľovo špecifickú sekvenciu dlhu 21-30 nt a univerzálny PCR primer X. Dlhý oligonukleotid sa skladá z cieľovo špecifickej sekvencie, sekvencie s variabilnou dĺžkou (stuffer) a univerzálného PCR primeru Y. Po hybridizácii na cieľové miesto sú obidve sondy spojené ligázou. Iba spojené sondy sú po denaturácii amplifikované pomocou klasickej PCR reakcie, použitím dvojice univerzálnych primerov. Namnožené sondy sú rozdelené kapilárnou elektroforézou na základe ich rôznej dĺžky. Analýza dát sa vykonáva pomocou špeciálneho počítačového programu.

Hlavným cieľom predloženej práce je zaviesť metódu MLPA do praxe, porovnať cytogenetické a MLPA nálezy, určiť výhody a nevýhody metódy MLPA pri diagnostike geneticky podmienených ochorení človeka.



Obr. 1 Princíp MLPA reakcie: 1. DNA denaturácia a hybridizácia MLPA sond 2. ligačná reakcia 3. PCR reakcia 4. separácia amplifikovaného produktu kapilárnou elektroforézou, upravené podľa [1].

Tab. 1 Vyhodnocovanie dát - pomer relatívneho množstva amplifikovanej DNA u testovanej vzorky ku kontrolnej vzorke zdravých jedincov, upravené podľa [4].

Stav počtu kópií	Pomer hodnôt
Normálny	0,85 - 1,15
Heterozygotná duplikácia	1,35 - 1,55
Homozygotná duplikácia	1,70 - 2,20
Heterozygotná delécia	0,35 – 0,65
Homozygotná delécia	0
Nejednoznačný	Všetky ostatné hodnoty

Materiál a metódy

MLPA

Metódu MLPA sme si vybrali ako skriningovú metódu, ktorá zachytí v jednej reakcii až 45 chromozómových aberácií. Na vyšetrenie sme použili kit: SALSA MLPA P377 Hematologic Malignancies probemix (MRC-Holland)Obsahuje sondy pre niekoľko génov a chromozómových oblastí , ktoré majú diagnostickú alebo prognosticky významnú úlohu v hematologických malignitách: 2p (*MYCN* a *ALK*), 5q (*MIR145*, *EBF1* a *MIR146A*), 6q, 7p12 (*IKZF1*), 7 q , 8q24 (*MYC*), 9p (*JAK2 V617F* mutácie, *MTAP*, *CDKN2A*, *CDKN2B* a *PAX5*), 10q23 (*PTEN*), 11q23 (*ATM*), 12p (*ETV6*), 12q, 13q (*RBI*, *MIR15A*, *DLEU2*, *DLEU1*), 17p (*TP53*), 17q, Chr 18 a Chr 19, 21q (*RUNX1*).Na analýzu dát sme využili počítačový program Coffalyser.NET™.

Použili sme vyizolovanú DNA z periférnej krvi alebo kostnej drene.

Florescenčná *in situ* hybridizácia

Metódu FISH sme použili na overenie a porovnanie výsledkov, ktoré sme získali pomocou metódy MLPA.

Výsledky a diskusia

Kazuistika :

Žena, narodená v roku 1948, vyšetrená na ÚNV Ružomberok, odd. hematológie. Klinické nálezy: 31.8. 2012: Leu-1,7, ery- 3,52, hyb- 93q/l, htk- 0,31, MCV- 96,5, NS- 0,15, NT- 0,02, Eo- 0,01, Mo- 0,04, Ly- 0,69, mmy- 0,01, promye- 0,05, blasty- 0,08.

Biopsia zo 16.9. 2012: obraz RAEB v transformácii do AML, resp. sekundárna AML v teréne MDS (blastická proliferácia, v množstve min. 30% vykazuje profil: CHAE+, MPO+, CD34 prevažne +).

Myelogram 16.9.2012: euplastická dreň s prevahou elementov bieleho radu so zmnoženými blastami 14,4% a promyelocytmi 30%. Červený rad s megaloblastovými zmenami. Mgg prítomné. Zásobné železo prítomné vo forme početných hrubších granúl. Cytogenetika: KD, 24h. neinformatívna, FISH: KD, v 73% delécia *TP53*. Molekulová analýza: KD, *WT1* pozitívne, NCN: 1,037.

28.9. 2012: MDS typu RAEB- 2, IPSS: vysoké, ECOG skóre: 2

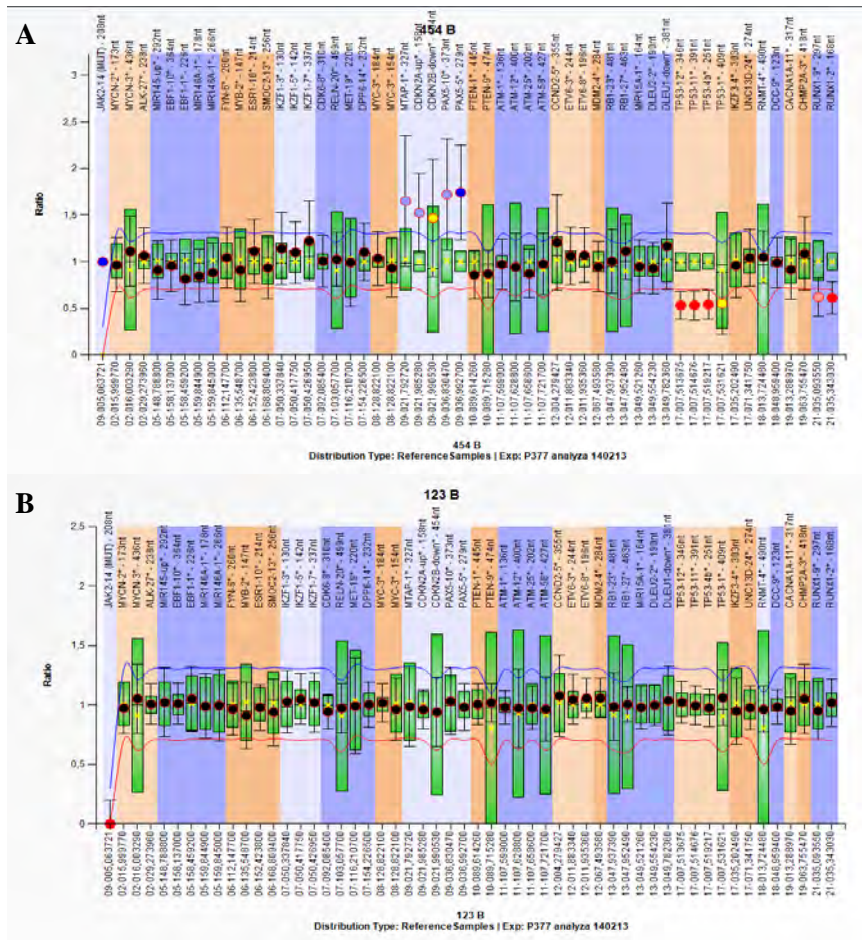
4.10. 2012: 5% blastických buniek myeloidného fenotypu. Trepanobiopsia - obraz ťažkej myelofibrózy s útlmom hemopoézy, bez známkov blastickej transformácie, myeloblasty pod 10%. Cytogenetika: KD, 24h.- neinformatívne, FISH: analyzoval sa chromozóm 17 - negatívne, molekulová analýza: *WT1* pozitívne, NCN: 0,57 (KD po 6. cykloch Vidazy).

16.10. 2012: FC v KD len 5% blastických buniek.

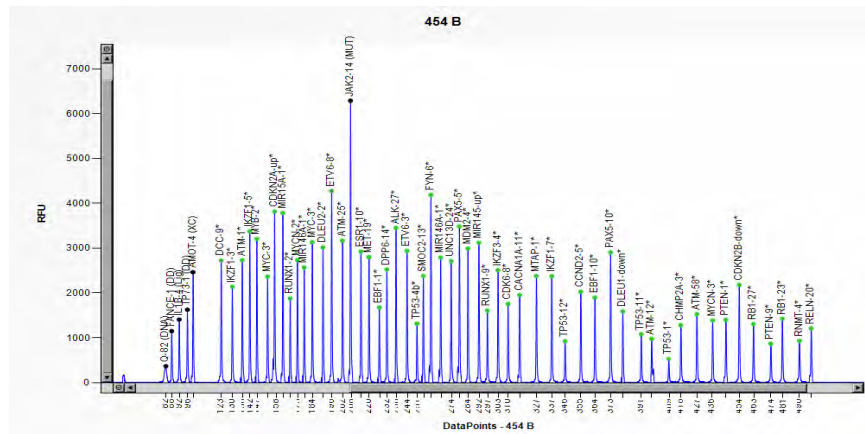
22.10. 2012: FISH - KD, v 77% delécia *TP53*. Molekulová analýza: *WT1* pozitívne, NCN: 5,31. Pacientka sa transformovala do akútnej leukémie, CHT bez efektu, exitus.

Tab. 2 Výsledok MLPA analýzy urobenej dodatočne zo vzorky KD zo 16.9.2012, použitý SALSA MLPA P377.

Oblasť na chromozóme	Gén	Výsledok MLPA
9p21.3	<i>MTAP-I</i>	amplifikácia
9p21.3	<i>CDKN2A-up</i>	amplifikácia
9p21.3	<i>CDKN2B-down</i>	amplifikácia
9p13.2	<i>PAX 5-10</i>	amplifikácia
9p13.2	<i>PAX 5-5</i>	amplifikácia
17p13.1	<i>TP53</i>	delécia
21q22.12	<i>RUNX1</i>	delécia



Ob. 2 Grafy MLPA analýzy A- vzorka pacientky, B- kontrolná vzorka. Výsledkom analýzy je porovnanie vzorky pacienta ku kontrolnej vzorke (zdravej).



Ob. 3 Elektroforetogram MLPA analýzy – výstup z genetického analyzátoru ABI 3500 (vzorka pacienta).

MLPA analýza sa javí ako veľmi vhodná skríningová metódika hlavne u pacientov v pokročilom štádiu myelodysplastického syndrómu, u ktorých dochádza k rýchlemu prechodu do akútnej leukémie. Je dôležité, aby ošetrojúci lekár mal čo najviac vstupných informácií o ochorení svojho pacienta. Na základe genetického vyšetrenia sa rozhodol

o použití vhodnej terapie a zaradil pacienta do prognostickej skupiny. U pacientky, ktorú v práci prezentujeme sa štandardne vyšetrili len najčastejšie sa vyskytujúce aberácie: delécia chromozómu 5, 7 a *TP53* pomocou FISH vyšetrenia. Ak by sme hneď pri vstupnom vyšetrení použili MLPA analýzu, mohli sme odhaliť u pacientky aj iné aberácie, ktoré mohli lekárovi pomôcť bližšie špecifikovať onkohematologické ochorenie. U pacientky bola zistená MLPA analýzou amplifikácia oblasti 9q21, oblasť bohatá na zastúpenie tumor supresorových génov. Druhou aberáciou zistenou iba MLPA technikou bola delécia génu *RUNX1*. *RUNX1* je transkripčný faktor, poškodenie ktorého vedie k poruche krvotvorby. Bodové mutácie *RUNX1* boli nájdené u AML a myelodysplastického syndrómu.

Záver

Vyšetrenie pacientov s onkohematologickými malignitami je v značnej miere obmedzené len na základné, najčastejšie sa vyskytujúce aberácie a preto je potrebné do diagnostiky zavádzať senzitivnejšie a robustnejšie metodiky molekulárnej biológie. Jednou z takýchto metodík je MLPA. Zavedenie tejto modernej technológie významným spôsobom posúva citlivosť určovania genetických zmien, lebo práve použitím MLPA techniky je možné analyzovať niekoľko desiatok génov v jednej reakcii a jej zavedením do praxe sa posunie diagnostika leukémií dopredu.

PodĎakovanie

Ďakujem mojej vedúcej diplomovej práce RNDr. Renate Lukačkovej za pomoc, cenné rady, pripomienky a čas, ktorý mi venovala pri tvorbe tohto článku. Tiež ďakujem kolektívu Oddelenia klinickej genetiky, Medirex a.s. za ich pomoc.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Schouten J. P., McElgunn C. J., Waaijer R., et al. (2002) *Nucleic Acids Res.* 30(12), p. 57
- [2] Schouten J., Galjaard R. J. (2008) *Methods Mol. Biol.* 444, p. 111
- [3] Stevens-Kroef M., Simons A., Gorissen H., et al. (2009) *Cancer Genet. Cytogenet.* 195(2), p. 97
- [4] Abdool A., Donahue A. C., Wohlgenuth J. G., et al. (2010) *PLoS One.* 5(10), p. 15407
- [5] Nygren A. O., Ameziane N., Duarte H. M., et al. (2005) *Nucleic Acids Res.* 33(14), p. 128
- [6] Hills A., Ahn J. W., Donaghue C., et al. (2010) *Mol. Cytogenet.* 3, p. 19

Chorioalantoická membrána prepelice japonskej ako experimentálny model pre štúdium angiogenézy a fotodynamicky aktívnych látok

Monika Záškarová¹, Boris Bilčík¹, Pavel Výboh¹, Ivan Čavarga^{1,2}, Dušan Chorvát³, Alžbeta Chorvátová³, Pavol Miškovský⁴

¹*Slovenská akadémia vied, Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Oddelenie fyziológie a etológie, Moyzesova 61, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovenská republika;*

zaskvarovamonika@gmail.com;

²*Onkologický ústav sv. Alžbety, Heydukova 2157/10, 812 50 Bratislava, Slovenska republika;*

³*Medzinárodné laserové centrum, Oddelenie Biofotoniky, Ilkovičova 3, 841 04 Bratislava, Slovenská republika;*

⁴*Univerzita Pavla Jozefa Šafarika, Ústav fyzikálnych vied, Katedra biofyziky, Šrobárova 2, 041 54 Košice, Slovenska republika*

Abstrakt

Chorioalantoic membrane (CAM) is an extraembryonic membrane of avian embryo. It is an excellent model for the study of tumour angiogenesis and antivascular therapy thanks dense capillary network. It was used to assess the damage to vessels induces by phototherapy. Photodynamic therapy (PDT) using light sensitive compounds - photosensitizers, which cause destruction malignant cells after illuminated. In our study we used PDT to activate the photosensitizer – hypericin (Hyp), which has antiangiogenic effects. Hyp is an extract of plant *Hypericum perforatum*. To assess the effect of Hyp on CAM vasculature we used *ex ovo* CAM of Japanese quail (*Coturnix japonica*). Hyp was applied on a part of CAM surface on embryonic day 8 (2 µg/g). The embryos were incubated for 1 or 5 h. Subsequently CAM with Hyp was illuminated by diode laser (λ-405 nm). We observed changes to vasculature 1 and 24 h after illumination. CAM vasculature damage after PDT ranged from capillary hemorrhage and vanishing to thrombosis. Damage score was higher in group with 5 h incubation compared with 1 h incubation period.

KLúčové slová: Chorioalantoická membrána; Hypericín; Fotodynamická terapia; Angiogenéza.

Úvod a formulovanie cieľa

Chorioalantoická membrána (CAM) je extraembryonálna membrána vtáčieho embrya, ktorá má viacero funkcií počas jeho prenatálneho vývoja. Kurací a menej frekventný prepeličí model CAM je používaný ako *in vivo* testovací systém vďaka jeho nízkym nákladom v porovnaní s celými živými organizmami. Významnú úlohu zohrávajú aj znížené etické požiadavky v porovnaní s inými *in vivo* metódami [1]. Oproti kuracím embryám sa javia embryá prepelice japonskej ako perspektívnejší CAM model vďaka prevažujúcim výhodám ako sú napríklad menšie priestorové nároky na chov a vysoká reprodukčná schopnosť prepelíc.

CAM je tenká a priehľadná membrána s hustou kapilárnou sieťou. Tvorí primárny respiračný orgán vtáčieho embrya. K výmene plynov dochádza prostredníctvom pórov vo vajcovej škrupine a plyny sú rozvádzané za pomoci hustej kapilárnej siete. CAM má tiež význam pri mobilizácii vápnika zo škrupiny a jeho následný metabolizmus [2]. Taktiež

zohráva úlohu pri transporte vody a elektrolytov z alantoickej dutiny [3]. Histologicky sa CAM skladá z troch vrstiev: choria, mezenchýmu a alantoisu. Prostredná vrstva obsahuje veľké cievy, alantoické vény a artérie. Vďaka tomu, že CAM poskytuje relatívne dobre pozorovateľné kapiláry, je výborným modelom pre štúdium angiogenézy, na sledovanie antivaskulárnej terapie (napr.: testovanie novo syntetizovaných antiangiogénnych látok) a v neposlednom rade pre štúdium nádorovej angiogenézy [4].

CAM model sa využíva aj na posúdenie poškodenia vaskulatury vyvolanej fototerapiou. Fotodynamická terapia (PDT) je založená na princípe deštrukcie nádorového tkaniva v dôsledku podania fotodynamicky aktívnej látky – fotosenzibilizátora a následného ožiarenia nádoru svetlom vhodnej vlnovej dĺžky a intenzity [5]. Následne dochádza k tvorbe reaktívnych foriem kyslíka, ktoré spôsobujú deštrukciu malígnych buniek a tkanív. V našom prípade v PDT využívame látku hypericín (Hyp), ktorý po aktivácii svetlom má aj antiangiogénne účinky. Hyp je prírodný extrakt z rastliny *Hypericum perforatum*. Fotoaktivovaný Hyp disponuje antiproliferačnými vlastnosťami a cytotoxickým efektom na viaceré nádorové bunkové línie [6]. Tieto vlastnosti spolu s nízkou toxicitou za tmy, relatívne vysokou selektivitou pre nádorové tkanivá, rýchlym vyplavovaním sa z organizmu a schopnosťou tejto molekuly prechádzať hematoencefalickou bariérou [7], robia z Hyp sľubnú molekulu pre PDT nádorových ochorení [8].

V štúdiu sme použili *ex ovo* CAM model prepelice japonskej. Naším cieľom bolo posúdiť vhodnosť tohto modelu a vplyv fotoaktivovaného Hyp na vaskulaturu CAM.

Materiál a metódy

Hypericín (Calbiochem USA) je chemicky definovaný ako 7,14-dione-1,3,4,6,8,13-hexahydroxy 10,11-dimetyl-fenantrol[1,10,9,8-*opqra*] perylene (Hyp). Jeho spektrálne charakteristiky sme stanovili pomocou klasickej (steady state) a časovo rozlíšenej (time-resolved) fluorescenčnej spektroskopie. Spektrálne analýzy boli urobené pre zásobný roztok Hyp v 100% polyetylénglykole 400 (PEG-400) a terapeutický roztok Hyp v 10% PEG-400 (Sigma Aldrich). Analýzy umožnili posúdiť prítomnosť agregovanej a neagregovanej formy Hyp. Excitácia Hyp sa realizovala diódovým laserom BDL-473 (Becker-Hickl, Nemecko) (excitácia pri 473 nm). Zaznamenané fluorescenčné spektrum roztokov bolo snímané pomocou vláknového spektrofotometra Maya od firmy Ocean Optics (USA). Dohasínanie fluorescencie bolo merané pomocou časovo rozlíšenej fluorescenčnej spektroskopie, konkrétne pomocou časovo korelovaného počítania fotónov (TCSPC). Excitácia Hyp bola vyvolaná laserom s krátkym (pikosekundovým) pulzným režimom. Laser vyvoláva

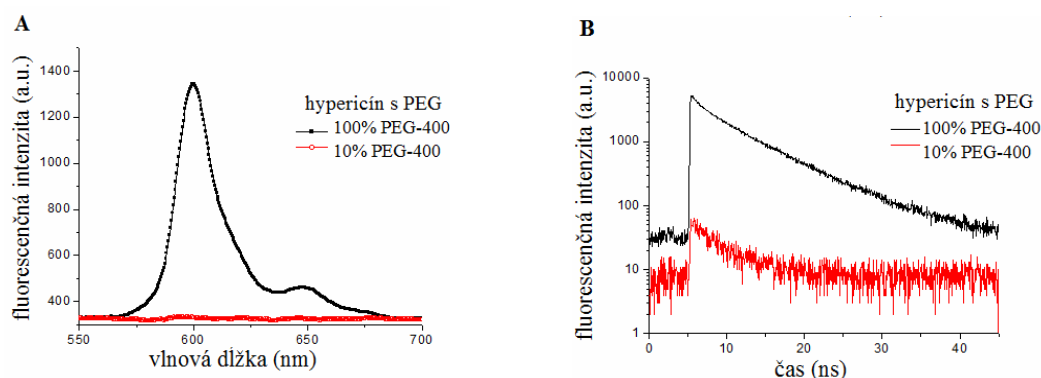
fluorescenčnú emisiu Hyp ktorá dohasína s dobou života v rádoch niekoľkých nanosekúnd. Fluorescencia zo vzorky po prechode 160 nm optickým spektrografom (Oriel M-125, Nemecko) bola zaznamenávaná 16-kanálovým poľom fotonásobičov (PML-SPEC, Becker-Hickl, Nemecko). Fluorescenčné dohasínania Hyp boli merané s časovou bázou 50 ns a integračným časom 120-180 s, pre účely tejto štúdie sme vyhodnocovali dohasínanie zaznamenané detektorom na vlnovej dĺžke v rozsahu ~595-608nm.

Na posúdenie fotodynamického efektu Hyp boli využité embryá prepelice japonskej (*Coturnix japonica*). Oplozené vajíčka z chovnej kolónie na ÚBGŽ SAV boli inkubované pri teplote 37°C a relatívnej vlhkosti 50-60%. Na prípravu *ex ovo* CAM modelu boli vajíčka na ED3 (embryonálny deň) dezinfikované 70% etanolom. V sterilnom laminárnom boxe sa otvorili a embryá preniesli do kultivačných platničiek (TPP, Švajčiarsko) a boli inkubované ďalších 5 dní. Na ED8 sa v časti CAM uložili silikónové krúžky o priemere 6 mm a do nimi vymedzenej plochy (30 μ l) bol aplikovaný terapeutický roztok Hyp. Zásobný roztok Hyp (1mg/ml) bol pripravený v 100% PEG-400 a udržiavaný v tme a teplote -20°C. Terapeutický roztok Hyp bol pripravený na požadovanú koncentráciu v 10% PEG-400. Aplikovaná dávka Hyp prezentovala 2 μ g/g embrya. Priemerná hmotnosť embrya na ED8 je 0,6 g a teda bolo podané 1,2 μ g Hyp/30 μ l 10% PEG-400 (79 μ M) na embryo. Následne embryá boli ponechané v 1 h až 5 h inkubácii. Monitorovali sme fluorescenciu Hyp a jeho penetráciu do tkaniva v hodinových intervaloch. Fluorescencia tkaniva CAM bola snímaná pod modrým excitačným svetlom (UFPh-630-01- Biospec LED lampa) s fotoaparátom (Canon EOS 5D Mark II s Canon MP-E 65 mm f/2.8 makro objektívom). Snímky boli spracované v programe Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc., USA).

Embryá (ED8) použité na sledovanie efektu Hyp po PDT boli inkubované 1 h alebo 5 h po podaní terapeutického roztoku Hyp. Následne bolo miesto s aplikovaným Hyp ožiarené diódovým laserom (Ocean optics, USA) s vlnovou dĺžkou 405 nm, dávkou svetla 16,8 J/cm²; a intenzitou svetla 140 mW/cm². Zmeny vaskulatúry pred a po ožiarení 1 h a 24 h boli snímané fotoaparátom (Canon EOS 5D Mark II s objektívom Canon MP-E 65 mm f/2.8 a kruhovým bleskom Canon MR-14EX). Poškodenie vaskulatúry CAM bolo hodnotené definovaným skóre: 1- žiadna deštrukcia, 2- čiastočné poškodenie kapilár (priemer \leq 10 μ m) a žiadna deštrukcia väčších ciev (priemer \geq 50 μ m), 3- prerušenie, vymiznutie kapilár a trombózy menších ciev 4- poškodenie menších aj väčších ciev s následnou trombózou, 5- úplná deštrukcia ciev, kompletne fototrombózy [9]. Rozdiely medzi skupinami boli testované s Kruskal-Wallis one-way ANOVA a následne bol použitý Student-Newman-Keuls post hoc test (SigmaPlot12, USA).

Výsledky a diskusia

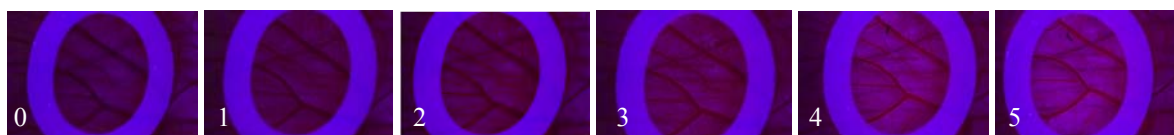
Spektrálne charakteristiky roztokov Hyp pomocou klasickej (steady state) a časovo-rozlišenej (time-resolved) fluorescenčnej spektroskopie boli namerané na posúdenie procesu agregácie a deagregácie látky. Hyp je lipofilná molekula nerozpustná vo vodnom prostredí, kde dominantne agreguje. Spektrálna analýza zásobného roztoku Hyp v 100% PEG-400 preukázala typické fluorescenčné spektrum s maximom pri 600 nm (Obr. 1A). Analýza signalizuje, že Hyp je prevažne v monomérskej forme, v tejto forme je biologicky aktívny. Časovo rozlíšená spektroskopcia zaznamenala bifázické dohasínanie fluorescencie s priemernou životnosťou 5,1 ns (Obr. 1B). Spektrum Hyp v 10% PEG-400 nepreukázalo žiadnu odozvu na excitáciu, nezaznamenali sme žiadny fluorescenčný signál (Obr. 1A). Možno usudzovať, že v tomto roztoku je Hyp dominantne agregovaný. V tejto forme je biologicky neaktívny, nefluoreskuje. Pomocou časovo rozlíšenej spektroskopie sa zaznamenal veľmi slabý signál pri 600 nm s dohasínaním a priemernou životnosťou 4,2 ns (Obr. 1B). Slabo fluoreskujúci Hyp vykazuje minimálnu fototoxicitu, iba fluorescenčná monomérska forma tejto molekuly dokáže vyprodukovať dostatočnú fotodynamickú aktivitu [10].



Obr. 1 Spektrálne analýzy roztokov hypericínu. Klasická (A) a časovo rozlíšená fluorescenčná analýza (B) roztokov hypericínu v 100% a 10% polyetylén glykole 400 (PEG-400)

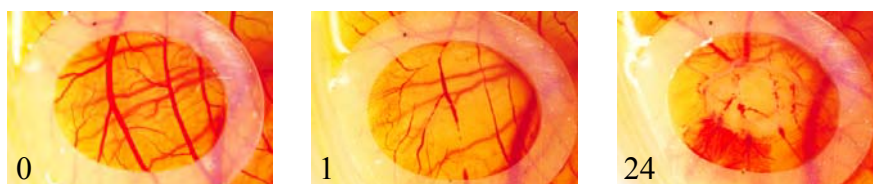
Pri monitorovaní zmien intenzity fluorescencie v čase 0 až 5 h po aplikácii terapeutického roztoku Hyp v 10% PEG-400 sme zreteľne zaznamenali postupné obnovovanie fluorescencie Hyp v tkanive CAM s prevahou na stenách ciev (Obr. 2). Hyp postupne penetroval do tkaniva a nárast intenzity fluorescencie je pravdepodobne spôsobený následnou monomerizáciou agregovaného Hyp. V štúdií Saw a kol. [11] nedetkovali fluorescenciu Hyp v roztoku s 0,05% N-metyl pyrrolidónom avšak intenzita fluorescencie sa zvyšovala až keď sa Hyp nachádzal vo vhodnom prostredí ako sú napr. nádorové bunky.

Vysvetlenie tohto javu môže byť v postupnej monomerizácii agregovaného Hyp v proteínových a lipidických štruktúrach buniek.

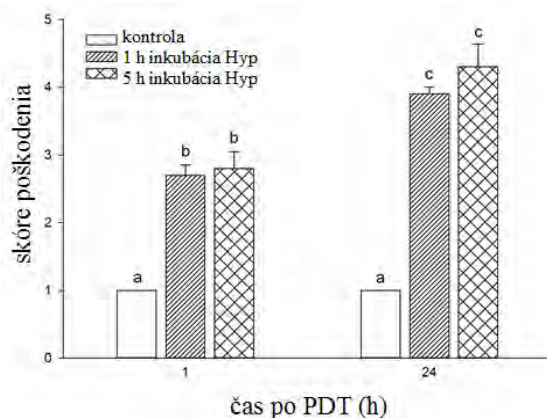


Obr. 2 Nárast intenzity fluorescence v čase 0 až 5 h po aplikácii hypericínu s 10% polyetylén glykolom 400

Rozsah poškodenia ciev CAM po PDT sa pohyboval od krvácania malých kapilár až po prerušenie, trombózu a deštrukciu väčších ciev (Obr. 3). Skóre poškodenia je definované v sekcii materiál a metódy. Zdá sa, že dĺžka inkubácie s terapeutickým roztokom Hyp (1 a 5 h) nezohrávala významnú úlohu pri fotodynamickom poškodení ciev avšak v čase po ožiarení 1 h a 24 h sa zaznamenali významné rozdiely ($p < 0,05$) v stupni poškodenia (Obr. 4). Nezistili sme zhoršenie prežívania terapeutických skupín embryí v porovnaní s kontrolnými skupinami. Poškodenie CAM vaskulatury po PDT bolo popísané aj pri iných štúdiách s Hyp a ďalšími fotosenzibilizérmi [12]. A taktiež poškodenie bolo hodnotené 1 h a 24 h po PDT.



Obr. 3 Fotodynamický efekt hypericínu s 10% polyetylén glykolom 400 na vaskulaturu chorioalantoickej membrány (CAM), pred ožiarení (čas 0), 1 h a 24 h po ožiarení, fotodynamickej terapii (PDT)



Obr. 4 Poškodenie vaskulatury chorioalantoickej membrány 1 h a 24 h po ožiarení laserom (dávka svetla 16,8 J/cm²), po 1 h alebo 5 h inkubácii s hypericínom (Hyp) v 10% PEG-400 (polyetylén glykol 400), skóre poškodenia 1-5 (1 – najlepšie, 5 – najhoršie poškodenie). Rozdielne indexy nad stĺpcami ukazujú významný rozdiel na úrovni $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis one-way ANOVA a Student-Newman-Keuls post hoc test)

Záver

Hypericín po lokálnej aplikácii a excitácii svetlom vlnovej dĺžky 405 nm pôsobí ako silný fotosenzibilizátor. Hyp v 100% PEG-400 vykazuje typické fluorescenčné spektrum s maximom pri 600 nm, pričom Hyp v 10% PEG-400 nepreukázal takmer žiadnu fluorescenciu. Časovo rozlíšená spektroskopia zaznamenala dohasínanie fluorescencie Hyp v 100% PEG-400 s dlhšou dobou životnosti 5,1 ns v porovnaní s 10% PEG-400 (4,1 ns). Po aplikácii Hyp s 10% PEG-400 na CAM sa postupne roztok penetroval do tkaniva s následným zvyšovaním intenzity fluorescencie, pravdepodobne v dôsledku viazania Hyp na tkanivo a zmeny na neagregovanú, aktívnu formu. Rozsah poškodenia ciev CAM po PDT sa pohyboval od krvácania malých kapilár až po prerušenie, trombózu a deštrukciu väčších ciev. Zaznamenali sme významnú deštrukciu tkaniva CAM 1 h po ožiarení, ktorá sa ešte zvýšila 24 h po terapii. CAM prepelice japonskej sa ukazuje ako výborný experimentálny model pre štúdium fotodynamického poškodenia tkanív v podmienkach *in vivo*.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporená grantom APVV-0242-11. Naše poďakovanie patrí p. Helene Rojčíkovej za jej technickú pomoc pri experimentoch.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Zijlstra A., Mikolon D., Stupack D. G. (2006) Angiogenesis assay in the chick. In: Angiogenesis assay, John Wiley & Sons, West Sussex, UK, p. 183
- [2] Tuan R. S., Carson M. J., Jozafiak J. A., et al. (1986) J. Cell. Sci. 82, p.73
- [3] Dunn B. E., Fitzharris T. P. (1987) J. Exp. Zool. Suppl. 57, p. 1
- [4] Vargas A., Zeisser-Labouebe M., et al. (2007) Adv. Drug. Deliv. Rew. 30, p.1162
- [5] Castano A. P., Mroz P., Hamblin M. R. (2005) Photodiagn. Photodyn. Ther. 2, p.1
- [6] Brown S. B., Brown E. A., Walker I. (2004) Lancet Oncol. 5, p.103
- [7] Couldwell W. T., Gopalakrishna R., Hinton D. R. (1994) Neurosurgery 35, p. 705
- [8] Miskovsky P. (2002) Curr. Drug. Targets 3, p. 55
- [9] Ruck A., Bohmler A., Steiner R. (2005) Photodiagn. Photodyn. Ther. 2, p. 79
- [10] Mikes J., Hyzdalova M., Koci L., et al. (2011) Photochem. Photobiol. Sci. 10, p. 626
- [11] Saw C. L., Olivio M., Chin W. W. et al. (2007) J. Photochem. Photobiol B 86, p. 207
- [12] Hammer-Wilson M. J., Akian L., et al. (1999) J. Photochem. Photobiol 53, p. 44

Expresia a funkcia receptorov v *corpora allata* *B. mori*

Alexandra Zibrinová^{1,2}, Ivana Daubnerová^{1,2}, Dušan Žitňan¹, Branislav Bednár¹

¹ Slovenská Akadémia Vied, Ústav zoológie, Oddelenie entomológie, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovenská republika; zibrinova@gmail.com

² Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika

Abstrakt

Insect growth and development are intricately regulated by two hormones- ecdysteroids and juvenile hormones (JH). JH is synthesized in the *corpora allata* (CA) and its production is controlled by many different factors, but their precise roles and mechanism of their action are not fully understood. In this work we described the expression patterns of neuropeptide receptors detected in CA in the silkworm *Bombyx mori*. Some of these receptors are also expressed in the brain SIFamide neurons that are known to regulate insect sexual behaviour. Does this suggest possible link between CA and SIFamide neurons in regulation of reproduction processes? To follow up this hypothesis we utilized transgenic approach to identify promoters specifically active in SIFamide neurons to study their function. Genetic modification of CA and SIFamide cells may lead to a greater understanding of the hormonal basis of the control of insect growth and reproduction.

Keywords: *Bombyx mori*; *corpora allata*; juvenile hormone; neuropeptides; GPCR; SIFamide

Úvod a formulácia cieľa

Corpora allata (CA) zohrávajú dôležitú úlohu v regulácii vývinu, správania a rozmnožovania hmyzu. Tieto endokrinné žľazy sú aj miestom biosyntézy juvenilného hormónu (JH). Aktivita *corpora allata* je pod kontrolou rozličných faktorov, medzi ktoré patria neuropeptidové hormóny pochádzajúce z mozgu, katecholamíny, 20-hydroxyekdyzón, enzýmy katalyzujúce biosyntézu JH a príjem potravy [1].

Juvenilný hormón patrí spolu s ecdysteroidmi k dvom hlavným skupinám nepeptidových hormónov s úlohou v regulácii rastu a vývinu hmyzu. Kým prítomnosť JH v hemolymfe hmyzu umožňuje prechod z jedného larválneho instaru (štádia) do nasledujúceho, jeho absencia vedie k metamorfóze. Juvenilný hormón moduluje aktivitu 20-hydroxyekdyzónu a koordinovaná regulácia jeho syntézy je nevyhnutná pre správny vývin [1]. Aby došlo k metamorfóze, JH musí byť degradovaný [2]. Účinok JH je však pleiotropný, okrem regulácie rastu a vývinu vplýva aj na správanie a rozmnožovanie [3].

Popri *D. melanogaster* je priadka morušová vďaka svojej veľkosti a dostupnosti kompletnej genómovej sekvencie ideálnym modelovým organizmom na štúdium funkcie neuropeptidov a ich receptorov [4]. V komplexe *corpora cardiaca-corpora allata* (CC-CA) *B. mori* bola dokázaná vysoká expresia piatich receptorov typu GPCR: receptor allatostatínu C (ASTC-R), receptor ekdyziotropného hormónu typu A (ETHR-A), dva receptory malého

neuropeptidu F (sNPF) (A10 a A11) a receptor allatotropínu (AT-R) [4]. Prítomnosť týchto receptorov naznačuje, že ich peptidové ligandy by sa mohli podieľať na regulácii tvorby JH, ale ich úloha nie je napriek intenzívnemu výskumu doposiaľ presne známa. Predpokladá sa, že kým ASTC má allatostatickú aktivitu [5], AT stimuluje činnosť CA. sNPF je tvorený v *corpora cardiaca* a jeho produkcia a/alebo vylučovanie je regulované práve allatotropínom. Regulácia biosyntézy JH allatotropínom by teda mohla byť sprostredkovaná sNPF [4]. Sekrécia ETH z endokrinných Inka buniek a ich následné rozpoznanie špecifickým receptorom ETHR iniciuje ekdyziálnu sekvenciu, ktorá vedie k zvrhnutiu starej kutikuly [6], no úloha ETH v regulácii aktivity CA nie je dodnes objasnená.

Neuropeptidy a ostatné peptidové hormóny zohrávajú významnú úlohu vo všetkých štádiách životného cyklu hmyzu a viaceré kontrolujú aj fungovanie CA. Jedným zo spôsobov analýzy fyziologickej funkcie neuropeptidov je práve identifikácia a lokalizácia ich receptorov [4], ktorá môže veľa napovedať o úlohe príslušného ligandu.

V našej práci sme využili poznatky o expresii receptorov v *corpora allata* získaných pomocou RT-PCR [4]. Zmapovali sme presné miesto produkcie týchto receptorov, čo môže pomôcť objasniť úlohu ich ligandov nie len v regulácii činnosti CA a syntézy juvenilného hormónu, ale aj ostatných vývinových procesov. Zároveň sme využili bakulovírusový expresný systém na identifikáciu bunkovo špecifických promótorov, ktoré budú v ďalšej časti práce použité na zacielenie expresie rôznych génov do týchto buniek. Modifikáciou vlastností konkrétnych neurónov chceme jednoznačne potvrdiť funkciu nimi produkovaných neuropeptidov v regulácii vývinu.

Materiál a metódy

Na opísanie miesta expresie receptorov pre neuropeptidy s predpokladanou funkciou v regulácii produkcie juvenilného hormónu sme využili metódu *in situ* hybridizácie s jednovláknovou digoxigenínom značenou *antisense* DNA próbou, komplementárnou k určitej časti cieľovej mRNA. Ako templát na výrobu prób boli použité PCR fragmenty získané amplifikáciou špecifického úseku cieľových cDNA. Pripravené próby slúžili na *in situ* hybridizáciu nervových pások izolovaných z rôznych vývinových štádií *B. mori* [7].

Na zistenie kolokalizácie mRNA receptorov s rôznymi neuropeptidmi sme vzorky imunohistochemicky farbili [7]. K vzorkám boli po *in situ* hybridizácii pridané primárne protilátky proti rozličným neuropeptidom a následne fluorescenčne značené sekundárne protilátky.

Na prípravu rekombinantných bakulovírusov a indukovanie dočasnej expresie

cudzorodých génov v somatických bunkách sme použili komerčne dostupný Bac-to-Bac® bakulovírusový expresný systém. Z genómovej DNA sme pomocou PCR reakcie amplifikovali fragment obsahujúci *upstream* oblasť (potenciálny promótor) želaného génu a spolu s génom pre EGFP sme ho inzerovali do vektora pFAST Bac1. Po transformácii plazmidu do kompetentných buniek *E. coli* kmeňa MAX Efficiency DH10Bac™, ktoré obsahujú bakulovírusovú DNA (bakmid), dochádza miestne špecifickou rekombináciou k preneseniu expresnej kazety z donorového plazmidu do bakmidovej DNA. Rekombinantným vírusom sú infikované permissívne jedince *B. mori*. Po rozšírení bakulovírusu dochádza k expresii markerového génu výlučne v bunkách, v ktorých je promótor aktívny.

Výsledky a diskusia

Opis expresie receptorov pre sNPF (A10,A11), ASTC a SIFamid v rôznych vývinových štádiách u *B. mori*

U všetkých štádií sme expresiu génu pre sNPF receptory detegovali v každom gangliu nervového systému, v mozgu a v *corpora allata* (CA). Bunky exprimujúce sNPF receptory v *protocerebre* mozgu sú dva páry veľkých mediálnych neurónov a tri páry buniek lokalizované centrálné v ich blízkosti.

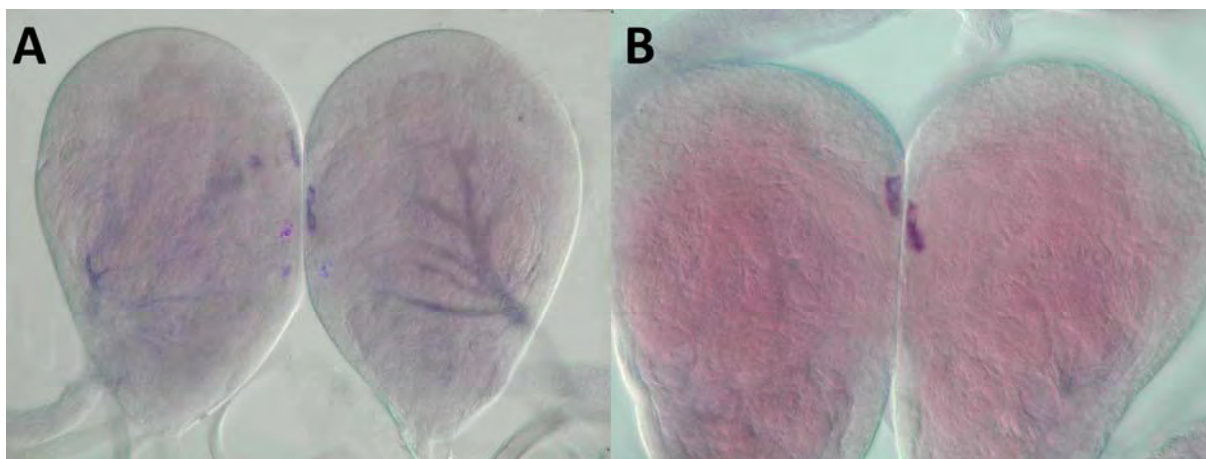
Prítomnosť *A10* transkriptu sme potvrdili v mediálnych neurosekrečných bunkách v mozgu (obr.1A) a v 3 pároch buniek v abdominálnych gangliách. Expresia receptora *A10* sa počas metamorfózy nemení, u farátneho imága aj imága sme prítomnosť *A10* mRNA detegovali v tých istých bunkách, ktoré sa farbili aj u farátnych lariev a kukiel. Podobnú expresiu ako *A10* má aj *All*. *All* transkript sme však okrem toho detegovali aj v CA.

Pri *in situ* hybridizácii so špecifickou *astc-r* próbou sa vo všetkých štádiách farbili malé mediálne bunky vo všetkých gangliách nervového systému. Expresiu génu pre ASTC-R sme detegovali aj v jednom páre veľkých neurosekrečných buniek v mozgu (obr.1B). CA sa ale nečakane zafarbili iba u farátnych kukiel.

Nervové pásy sme na základe výsledkov *in situ* hybridizácie imunohistochemicky farbili protilátkami proti SIFamidu, keďže sa SIFamid exprimuje v štyroch veľkých neurónoch v *pars intercerebralis* mozgu. Pomocou imunohistochemického farbenia sme potvrdili, že neurosekrečné bunky exprimujúce *A10*, *All* a *astc-r* produkujú SIFamid (SIFa). To naznačuje, že SIFamidové neuróny môžu spolu s CA zohrávať kľúčovú úlohu v regulácii larválnej ekdýzie.

Keďže sa nám prítomnosť receptorov exprimovaných v CA podarilo detegovať v SIFamidových bunkách v mozgu, rozhodli sme sa ďalej študovať túto regulačnú dráhu

pomocou *in situ* hybridizácie s próbami špecifickými pre mRNA SIFa receptora. Vo všetkých štádiách sa nám podarilo detegovať expresiu génu pre SIFa receptor jedine v štyroch veľkých neurónoch v AG8 TAG. Prítomnosť SIFa receptora v tomto gangliu sme predpokladali na základe toho, že axóny vychádzajúce zo SIFamidových buniek v mozgu priamo inervujú jedine bunky v TAG.



Obr. 1 *In situ* hybridizácia próbami pre receptory sNPF A10 (A) a ASTC (B). Expresia receptorov bola potvrdená v SIFamidových bunkách v mozgu

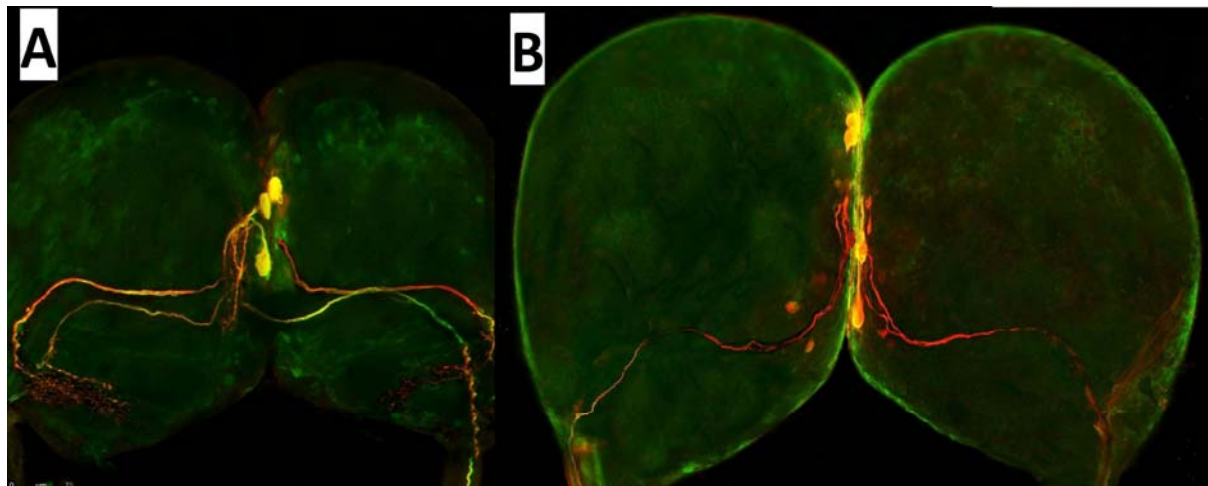
Identifikácia promótorov génov pre SIF- a IMFamid

Identifikácia promótorov génov je účinný spôsob využívaný pre funkčnú analýzu génových produktov. Identifikácia promótoru génu pre SIFamid môže pomôcť pri objasnení funkcie SIFa neurónov a SIFamidu vo vývine *B. mori*.

Donorové plazmidy nesúce gén pre EGFP pod kontrolou predpokladanej regulačnej oblasti *sif-a* génu sme transformovali do buniek *E. coli* MAX Eficiency DH10Bac™ a z rekombinantného bakmidu sme po transfekcii hmyzích buniek (Sf9) pripravili vírus. Po infikovaní lariev takýmto vírusom sme expresiu *egfp* pozorovali výlučne v dvoch pároch veľkých SIFamidových interneurónov v mozgu (obr. 2A). Pre potvrdenie kolokalizácie EGFP a SIFamidu sme nervové pásy imunohistochemicky farbili protilátkou proti SIFamidu a EGFP. Takto zafarbené pásy vykazovali kolokalizáciu EGFP so SIFamidom (obr. 2A). Špecificky sa protilátkami farbili jedine štyri SIFamidové bunky v mozgu a axóny vedúce z týchto buniek do terminálneho abdominálneho ganglia (TAG). Úspešne identifikovaný SIFa promótor bude použitý pri ďalšom výskume úlohy SIFamidu v regulácii vývinu, správania a rozmnožovania *B. mori*.

Rovnakým postupom sa nám podaril identifikovať aj promótor génu pre IMFamid

(obr. 2B).



Obr. 2 Identifikovanie promótorov pre SIFamid (A) a IMFamid (B) Expresia EGFP po infekcii lariev *B. mori* rekombinantnými bakulovírusmi. Na zeleno sa farbja bunky produkujúce EGFP, na červeno bunky produkujúce SIFamid. V mieste kolokalizácie SIFa a GFP dochádza k zafarbeniu buniek na žltó

Záver

Hmyzie *corpora allata* (CA) zohrávajú kľúčovú úlohu v regulácii vývinu, správania a rozmnožovania. CA sú miestom syntézy a vylučovania juvenilného hormónu. Mechanizmy regulácie ich činnosti nie sú doposiaľ známe. V kontrole ich fungovania zohrávajú dôležitú funkciu aj neuropeptidy. Účinným spôsobom objasnenia funkcie neuropeptidov u *B. mori* sa v minulosti ukázalo byť štúdium ich receptorov pomocou RT-PCR, *in situ* hybridizácie a imunohistochemického farbenia.

V tejto práci sa nám podarilo odhaliť kolokalizáciu receptorov exprimovaných v CA *B. mori* so SIFamidom a IMFamidom ako aj ďalšími peptidmi s úlohou v regulácii vývinu. Na základe týchto zistení sme sa preto rozhodli identifikovať promótory génov pre SIF- a IMFamid pomocou rekombinantných bakulovírusov, čo sa nám úspešne podarilo. Cílená modifikácia vlastností buniek exprimujúcich tieto gény v budúcnosti umožní štúdium funkcie ich produktov v regulácii vývinových procesov u *B. mori*.

Pod'akovanie

Práca bola podporená grantom National Institutes of Health USA GM 67310, APVV-51-039105 a VEGA 2/0132/09. Chcela by som poďakovať všetkým, ktorí mi pri tomto výskume a celom štúdiu pomohli, hlavne môjmu školiteľovi RNDr. Dušanovi Žitňanovi, DrSc., Mgr. Ivane Daubnerovej a Mgr. Branislavovi Bednárovi za cenné rady a vytvorenie

kreatívneho a príjemného pracovného prostredia. Taktiež sa chcem poďakovať aj nemým tvorom, ktoré obetovali svoj život v mene poznania.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Ueda, H., Shinoda, T., Hiruma, K. (2009) *J. Insect Physiol.* 55, p.798
- [2] Riddiford, L.M. (1996) *Molecular aspect of juvenile hormone action in insect metamorphosis.* B.G. Academic Press, San Diego, p. 223
- [3] Kinjoh T., Kaneko Y., Itoyama K., et al. (2007) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, p. 808
- [4] Yamanaka N., Yamamoto S, Žitňan D., et al. (2008) *PloS One.* 3, p. 3048
- [5] Veenstra J. A. (2009) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39(3), p.161
- [6] Kingan T. G., Adams M. E. (2000) *J. Exp. Biol.* 203, p.3011
- [7] Kim Y.-J., Žitňan D., Cho K.-H., et al. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, p. 14211

Optimalizácia expresie a purifikácie rekombinantnej alkoholdehydrogenázy

Zuzana Zvadová, Lucia Bocánová, Kristína Jiričková, Diana Hopková, Stanislav Stuchlík,
Pavol Koiš

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15, Bratislava 4, Slovenská republika;
zuzana.zvadova@gmail.com*

Abstract

Unlike organic synthesis, biotechnological methods represent an Eco-friendly, and biologically safe alternative. One of the basic characteristics of the biotech sector is biosynthesis using a well-defined production strain. In our case, we have used the host strain of *Escherichia coli* for the expression of an alcohol dehydrogenase (ADH), originally derived from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. It catalyzes the reversible oxidation of alcohols to aldehydes or ketones. Yeast ADH (yADH) has a number of advantages compared to the ADH from other organisms. One of these is the ability to produce optically pure alcohols, free of racemates, creating opportunities for the cosmetic, pharmaceutical, and food industry. The aim of our work is to optimize the expression, and purification of the ADH protein, which for the industry, is another step forward in biosynthetic procedures.

Key words: *biosynthesis; alcohol dehydrogenase; expression*

Úvod a formulácia cieľa

Príprava vonných látok prostredníctvom ich izolácie z prírodných zdrojov siaha až do antických čias. Prvé zmienky pochádzajú od kňazov, ktorí ich používali na náboženské rituály. Neskôr sa spektrum ich využitia značne rozšírilo a začali sa používať na kuchárske, medicínske, či kozmetické účely a v súčasnosti predstavujú neodmysliteľnú časť týchto priemyselných sektorov [1].

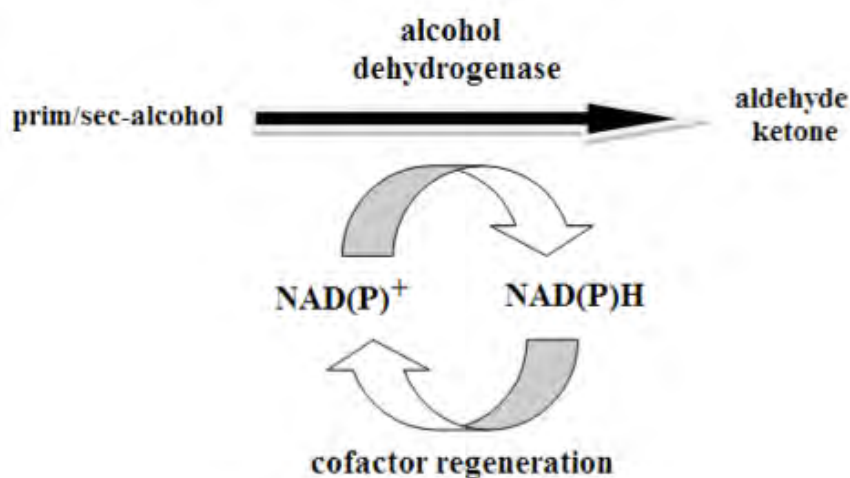
Súčasná výroba prírodných aromatických látok spadá do zorného poľa biotechnológie, ktorá využíva vlastnosti živých mikroorganizmov alebo ich častí na ich produkciu. V praktickom smere zlučuje “príjemné s užitočným” a to v zmysle tom, že finálnym produktom sú vysoko kvalitné látky biologickej povahy, ktorých proces vzniku nemá negatívny vplyv na životné prostredie.

Základným prvkom moderných biotechnologických procesov je práve biokatalýza, v ktorej ide o využívanie biomolekúl v katalýze. Enzýmy, ktoré z biologického hľadiska predstavujú proteíny, sú syntetizované mikroorganizmami, ktoré ich využívajú na katalýzu životne dôležitých funkcií. Napriek tomu, že sú tvorené v organizme, dokážu existovať i mimo neho a to v *in vitro* podmienkach. Ich schopnosť sprostredkovať špecifické chemické transformácie činí to, že sú širokospektrálne využívané v priemysle. Biokatalýza

je teda uskutočniteľná nielen v bunkových systémoch, ale i vo forme izolovaných enzýmov [2].

Izolované enzýmy však predstavujú značné výhody a to vo viacerých smeroch: na prácu s nimi nie sú potrebné zložité postupy a aparatury, sú vysoko špecifické pre vybrané reakcie, ich substrát sa nemusí transportovať cez bunkovú membránu a v neposlednom rade, v jedнокrokových reakciách nedochádza k vedľajším reakciám. Na druhej strane však takéto enzýmy na svoju aktivitu potrebujú často krát nebielkovinové zložky-kofaktory, ktorých regenerácia predstavuje ekonomicky náročný proces [3].

K jednej z takýchto enzymatických skupín patria aj oxidoreduktázy katalyzujúce oxidáciu sekundárnych alkoholov na aldehydy. Do tejto triedy sa radí alkoholdehydrogenáza (E.C.1.1.1.1.), melanoenzým, so systematickým názvom alkohol:NAD⁺-oxidoreduktáza. ADH tvorí veľkú enzýmovú rodinu, ktorú možno rozdeliť do štyroch skupín v závislosti od štruktúry a dĺžky uhlíkového reťazca [4]. Do skupiny so stredne dlhým uhlíkovým reťazcom patrí ADH izolovaná z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, s ktorou sme pracovali.



Obr.1 Alkoholdehydrogenáza oxidujúca alkohol na aldehyd/ ketón, ale pre svoju činnosť potrebuje kofaktor NAD(P)⁺ (prevzaté: Illésová, 2011) [5-6]

Kvasinková ADH (γ ADH) je širokospektrálne využívaná vďaka svojej vlastnosti produkovať opticky čisté alkoholy, čo má okrem potravinárskeho a liehovarenského využitia uplatnenie i vo farmaceutickom a kozmetickom priemysle pri výrobe aromatických látok. Vďaka možnostiam jej nenáročnej nadexpresie, izolácie a optimalizácie týchto procesov, dokážeme redukovať cenu výroby a zároveň zvyšovať kvalitu produktov, čo predstavuje zároveň cieľ tejto práce.

Ďalší krok vylepšenia by predstavoval opakované využívanie aktívnych enzýmov a to formou ich imobilizácie. Tento krok môže slúžiť ako výzva do ďalších optimalizačných krokov súvisiacich s produkciou prírodných látok.

Materiál a metódy

Použité bakteriálne kmene: Na produkciu rekombinantného proteínu sme použili hostiteľské kmene (tab.1).

Tab. 1 Použité bakteriálne kmene

Kmeň E. coli	Genty	Zdroj
XL-1 Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F'proAB lacIq ZΔM15 Tn10 (Tcr)]	Stratagene ®
BL21 (DE3)	F- ompT hsdSB (rB- mB) gal dcm (DE3)	Novagen ®
Rosetta Gami 2 (DE3)	"(ara-leu)7697 "lacX74 "phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F' [lac+ lacIq pro] gor522::Tn10 trxB pRARE2 (CamR, StrR, TetR)	Novagen ®

Použité plazmidy:

Plazmid	Štiepenie	Popis	Zdroj
pET-29b(+)-ADHx	NdeI, XhoI	His-tag na C konci	Utekal, nepublikované
pET-31b(+)-ADH(b)	NdeI, XhoI	His-tag na C konci	Utekal, nepublikované

Použité vektory pET-29b(+) a pET-31b(+) boli od firmy Novagen ®.

Izolácia plazmidovej DNA: Komerčne dostupný kit od firmy Qiagen s názvom QIAprep® Spin Miniprep Kit.

Transformácia kompetentných buniek: Všetky transformácie boli uskutočnené elektroporáciou (2mm kyvety, 2,5 kV, 200 Ω, 25 μF, Bio Rad GenePulser). Po elektroporácii bola zmes ihneď rozriedená v 0,5 ml LB pôdy a kultivovaná pri 37°C na LB agarových platniach s obsahom príslušného antibiotika (0,1 mg/ml).

Indukcia expresia proteínu ADH: Pridáme 0,5 mmol. dm⁻³ IPTG do tekutej bakteriálnej kultúry pri OD₆₀₀ 0,4 – 0,6.

SDS polyakrylamidová elektorforéza: 12% SDS PAGE gél podľa Laemmi a kol., 1970 [7].

Purifikácia proteínu: Vysoko účinná kvapalinová chromatografia FPLC ÄKTA Avan 25 nám slúžila na purifikáciu proteínu. Na purifikáciu sme použili His-Trap FF kolónu s objemom 5 ml.

Purifikačné roztok:

Premývací tlmivý: 50 mmol.dm⁻³ K_xPO₄

50 mmol. dm⁻³ TrisHCl pH= 8
 1 mol NaCl
 Elučný tlmivý: 50 mmol. dm⁻³ TrisHCl (pH= 8)
 1 mol. dm⁻³ NaCl
 500 mmol. dm⁻³ imidazol

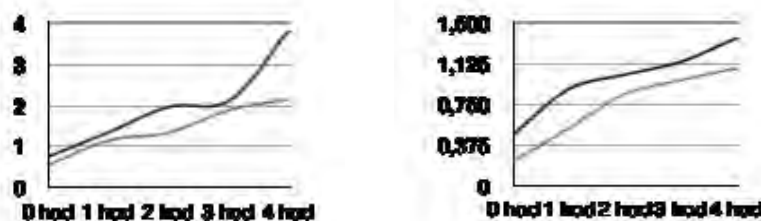
Na rozbitie inklúzných teliesok sme k roztokom pridali 8 mmol. dm⁻³ močovinu. Dialýza prebiehala v dialyzačnom roztoku: 20 mmol. dm⁻³ TrisHCl pH= 8, 10 % glycerol.

Stanovenie koncentrácie: Koncentráciu proteínov sme stanovovali spektrofotometricky Bradfordovou metódou (Bradford reagent, ready-to-use, firma Fermentas) vytvorením kalibračnej krivky s 1 % BSA.

Stanovenie aktivity: Enzymovú aktivitu sme stanovovali prostredníctvom zmien koncentrácie koenzýmu NAD⁺, pretože oxidovaná forma NAD⁺ má pri vlnovej dĺžke 340 nm inú absorbanciu ako jeho redukovaná forma NADH.

Výsledky a diskusia

Kmene *E. coli* Rosetta Gami 2 (DE3) a BL 21 (DE3) sme transformovali plazmidmi pET-31ADHx a pET-29ADH. Pozitívne klony sme inokulovali do štyroch LB médií spolu s príslušným antibiotikom. Kultúry sme inkubovali pri teplote 37°C a 20°C, pokiaľ hustota buniek nedosiahla hodnotu OD₆₀₀ = 0,4- 0,6. Následne sme odobrali neindukovanú vzorku a do kultivačných médií sme pridali IPTG do výslednej koncentrácie 0,5 mmol. dm⁻³ (obr.2).

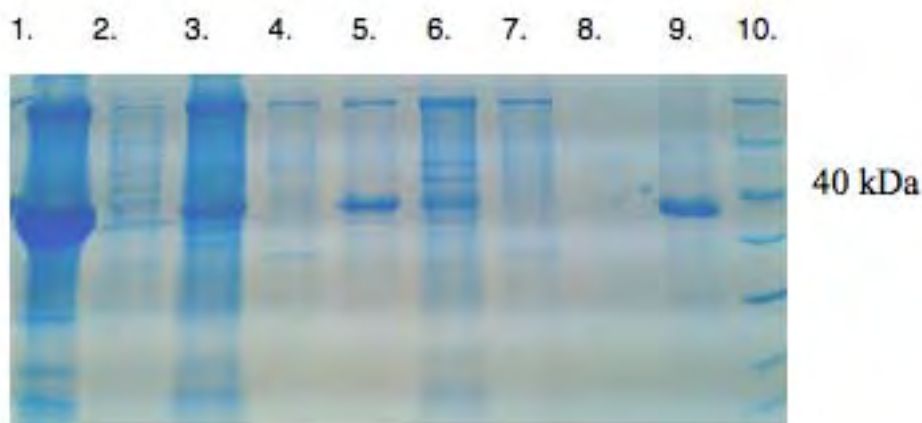


Obr. 2 Priebeh expresie buniek pri rôznych teplotách (červená: 37°C, zelená 20°C)

Expresia trvala 4 hodiny, pričom sme po každej hodine odobrali vzorky a analyzovali na 12 % SDS PAGE. Po expresii sme bunky rozbili pomocou ultrazvuku, sцентрифуговали a rozdelili na pelet a supernatant. Na základe 12% SDS PAGE elektroforetickej separácie sme zistili, že po sonikácii sa náš proteín nachádzal v pelete v

kultúrach BL 21 (DE3) pET-29, kultivovaných pri 37°C a 20°C a u Rosetta Gami 2 (DE3) pET-31, ktoré sme kultivovali pri 37°C. Predpokladáme, že pri týchto kultiváciách dochádzalo ku tvorbe inklúzných teliesok. Pri kultivácii pri 20°C (Rosetta Gami 2 (DE3)) sa rekombinantný proteín nachádzal vo veľkej miere v supernatante.

Pred nanesením peletu na kolónu sme inklúzne telieska rozbíjali 8 mmol. dm⁻³ močovinou. Výsledky z elektroforézy sú uvedené na obrázku 3.



Obr. 3 12% SDS-PAGE s exprimovaným proteínom ADH: dráha č.1: pelet (37°C), dráha 2: supernatant (37°C), dráha 3: pelet (20°C), dráha 4: supernatant (20°C), dráha 5: pelet (37°C) po močovine, dráha 6: pelet (20°C) po močovine, dráha 7: supernatant (20°C) po pridaní 50 mM TrisHCl pH=8 a 1 mol NaCl, dráha 8: supernatant (37°C) peak z chromatografie, dráha 9: pelet (37°C) peak z chromatografie, dráha 10: Ladder (*pozn. molekulová veľkosť ADH je 38 kDa)

Po chromatografii sme vzorky s prídavkom imidazolu a močoviny dialyzovali 24 hodín do dialyzačného roztoku. Po ukončení dialýzy sme merali koncentráciu proteínov Bradfordovou metódou a porovnávali to s koncentráciou lyofilizovanej komerčnej ADH. Koncentrácia proteínu v pelete presahovala koncentráciu lyofilizovanej o 0,166 mg/ml, kým koncentrácia ADH zo supernatantu bola o polovicu menšia.

Aktivitu nami vypurifikovanej ADH sme merali na základe zmien koncentrácie kofaktora NAD⁺ pri vlnovej dĺžke 340 nm, ktorú sme opäť porovnávali s komerčnou. Aktivita lyofilizovanej ADH bola 23 μ kat za prítomnosti koenzýmu β -NAD, pri pH= 7,5. ADH z peletu vo forme inklúzných teliesok nepreukazovala aktivitu, zatiaľ čo ADH zo supernatantu vykazovala aktivitu (výsledky neuvedené).

Záver

Podarilo sa nám dosiahnuť vysokú úroveň expície cieleného proteínu a to pri rôznych teplotách. Zistili sme, že na produkciu rekombinantnej ADH je vhodnejší kmeň Rosetta Gami

2 (DE3), v ktorom sa proteín exprimoval bez tvorby inklúzných teliesok pri 20°C a to v aktívnej forme. Naopak, rekombinantný proteín produkovaný kmeňom BL 21 (DE3) sa tvoril vo forme inklúzných teliesok a po refoldovaní zostal neaktívny. Optimalizáciou expresie a purifikácie tohto enzýmu sa dá doceliť efektívnejšia a ekonomickejšia výroba čistých alkoholov, ktorých využitie spadá do všetkých sfér bielej biotechnológie.

Zoznam použitej literatúry:

- [1] Pybus D. H. (2006) The chemistry of fragrances, p. 1
- [2] Bornscheuer U. T., Huisman G. W., Kazlauskas R. J., et. al. (2012) Nature 85, p. 185
- [3] Carvalho C. C. (2011) Biotechnol. Adv. 29, p. 73
- [4] Kallberg Y., Oppermann U., Jornvall H., et al. (2002) Eur. J. Biochem. 269, p. 4409
- [5] Illésová A. (2011) Oxidoredukčný systém pre enzýmovú konverziu aromatických látok. (Diplomová práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p. 23
- [6] Edegger K., Mang H., Faber K., et. al. (2006) Journal of Molecular Catalysis A: Chemical 251, p. 66
- [7] Laemmli U. K., Molbert E., Showe M., et al. (1970) E. J. Mol. Biol. 49, p. 99

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA



ŠVK
PriF UK
2013

CHÉMIA

ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2013
ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV

Chromatographic determination of BTEX in water samples by Large Volume Injection

Juraj Adamuščin, Alexandra Hengerics Szabó, Peter Podolec, Peter Katora, Dušana Samková

*Comenius University, Faculty of Natural Sciences, Chemical Institute CH-2, Mlynská dolina
SK-842 15 Bratislava, Slovakia; adamuscin@nic.fns.uniba.sk*

Abstract

The analytical methods based on solventless sample preparation techniques for environmental samples are permanently in development. The method avoiding usage of sample preparation is direct aqueous injection (DAI). A simple method of solventless extraction of volatile organic compounds (benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes) from aqueous samples was developed. This method allows direct injection of large volume of water sample into a gas chromatograph using the sorption capacity of the sorbent Chromosorb P NAW applied directly in the injection port of gas chromatograph. The system prevents water penetration into the column, keeping it adsorbed on its surface until the analytes are stripped into the column, and the residual water is purged using split flow. The limits of detection ranging from 0.6 for benzene to 1.1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ for *o*-xylene and limits of quantification ranging 2.0 – 3.6 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ are lower than those reached by gas chromatography with flame ionization detection and direct aqueous injection before.

Key words: *gas chromatography; volatile organic compounds; large volume; direct aqueous injection*

Introduction

The analytical methods based on solventless sample preparation techniques for environmental samples which allow elimination of liquid solvents in the analytical procedures at low concentration levels as well as the reduction of the sample preparation time are permanently in development [1]. The method avoiding usage of sample preparation is direct aqueous injection (DAI) [2-4], DAI presumes analysis of volatile organic compounds in water samples by direct injection of water sample into a chromatographic column. The elimination of sample pre-treatment and pre-concentration steps helps to minimize the losses of volatile analytes as well as the possibility of sample contamination. The major disadvantage is that water is not compatible with stationary phases of capillary columns as well as with FID detector [5-7].

The aim of this work was to develop a new simple method that enables direct injection of large volume of water sample into a gas chromatograph to determine BTEX analytes. The experimental parameters as injection port temperature, water sample injecting volume and concentration of analytes in relationship to stripping efficiency of analytes in time as well as linearity of calibration dependences and limits of detection and quantification were investigated.

Experimental

This method is using the sorption capacity of the sorbent Chromosorb P NAW (60-80 mesh) applied directly in the injection port of gas chromatograph to prevent water from penetrating into a column, by keeping it adsorbed on its surface until the analytes are stripped into the column, and the residual water is purged using split flow (Fig. 1).

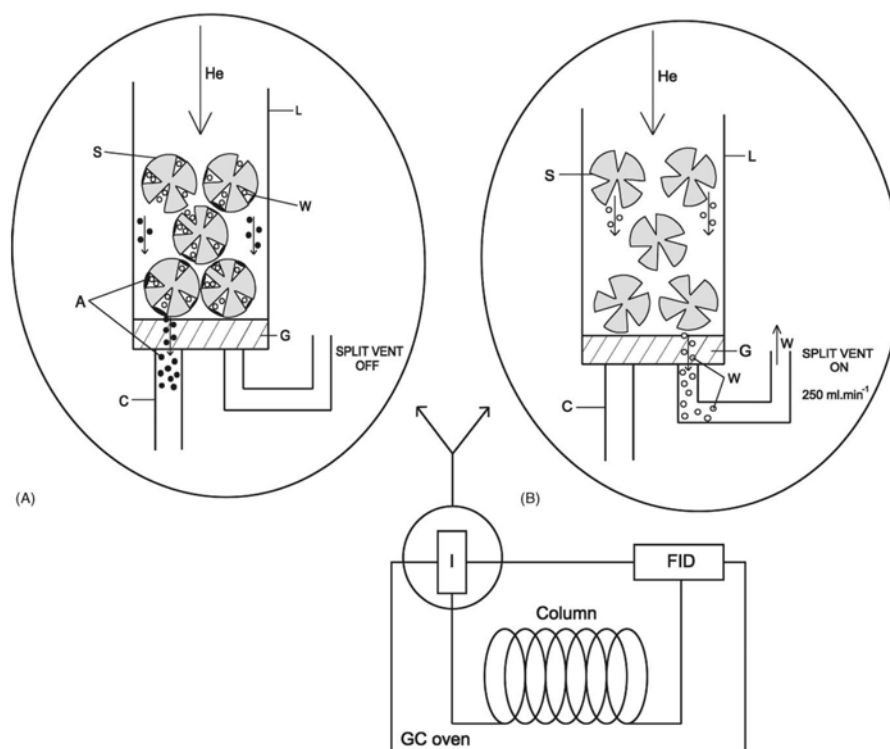


Fig. 1 Scheme of desorption process of large volume direct aqueous injection method. **A**-Stripping of analytes from sorbent material Chromosorb P NAW and their focusing into the capillary column. **B** - Removal of water from injector using split flow. **S** - Chromosorb P NAW, **L** - injection port liner, **W** - water, **A** - analyte, **G** - glass wool, **C** - capillary column, **I** - injection port, **FID** - flame ionization detector.

Using the method of experimental planning according to the Box Hunter plan [8] we investigated the influence of concentration (12.7 - 147 mg.l⁻¹), volume (15.9 – 184.7 µl) and the injection port temperature (53 - 87 °C) on sorption-desorption process. These experiments were performed for benzene and o-xylene, the least and the most sorbed analytes, respectively, using the restrictor (0.3m x 0.1 mm) in splitless mode for 6 minutes, then split mode (250 ml.min⁻¹) and oven temperature of 70 °C. From the obtained chromatograms we determined the time when 95 % of the most sorbed analyte (o-xylene) is stripped into the column. Results were used for optimization test done by MATLAB 5.3 program.

The concentration range of individual BTEX for investigation of calibration dependences was 5 - 5000 µg.l⁻¹ at the sampling volumes 100 and 250 µl, and 50 - 5000 µg.l⁻¹

at the sampling volume 10 μl .

The sampling volume of aqueous samples for determination of detection and quantification limits with concentration of individual BTEX 0.5 - 7 $\mu\text{g.l}^{-1}$ was 250 μl .

The model water sample was prepared by contamination of river water from Danube with gasoline UNI 91 (Slovnaft, Slovakia) at concentration level 1 mg.l^{-1} and the sampling volume was 250 μl .

For analytical separation of desorbed aromatic hydrocarbon standards capillary column DB-I 30 m x 0.32 mm I. D. x 5 μm was employed. Injections were made in the splitless mode for 3 minutes, then split mode (flow rate 250 ml.min^{-1} ; 400 ml.min^{-1} at sampling volume of 250 μl) at injection port temperature 70 $^{\circ}\text{C}$, and oven temperature 20 $^{\circ}\text{C}$ for 3 min, then 20 $^{\circ}\text{C}$ to 120 $^{\circ}\text{C}$ at 50 $^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ the first temperature ramp, and the second temperature ramp from 120 $^{\circ}\text{C}$ to 150 $^{\circ}\text{C}$ at 1.5 $^{\circ}\text{C.min}^{-1}$.

The detection limits (LOD) were calculated using a signal-to-noise ratio of 3:1, the quantification limits (LOQ) using a signal-to-noise ratio of 10:1.

Results and discussion

The optimization test to investigate the influence of analyte concentration (c), sampling volume (V_{inj}) and the injection port temperature (T) on stripping efficiency of benzene and *o*-xylene was performed. The effect of injection port temperature is the most significant. Less significant is the effect of injection volume what can be explained by undercooling of injection port at injection of large sample volume. The concentration of analytes in the range of 12.7 - 147 mg.l^{-1} has no effect on the sorption-desorption process.

According to this optimization the injection port temperature of 70 $^{\circ}\text{C}$ and stripping time of 3 minutes was chosen to reach 95 % recovery of desorbed analytes and minimal penetration of water from injection port to capillary column. To determine the limits of detection and quantification the sampling volume of 250 μl was chosen, the highest volume of water sample retained in the injection port by used amount of Chromosorb P NAW.

The calibration dependences are linear in full concentration range (5 - 5000 $\mu\text{g.l}^{-1}$) at each sampling volume (10, 100 and 250 μl) what indicates high values of coefficients of determination r^2 for all components, ranging from 0.996 to 0.9999. After sampling of higher concentration (5 000 $\mu\text{g.l}^{-1}$) pure water was injected to investigate the memory effect. No peak was detected in the elution area of BTEX.

For large volume direct aqueous injection method, the LOD values of BTEX are from 0.6 to 1.1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ and LOQ values are from 2.0 to 3.6 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Table 1). The progressive trend

(from benzene to *o*-xylene) of these values results from the fact that at 3 minutes stripping time approximately 95 % of injected *o*-xylene mass penetrate to the column from injection port while for benzene it is approximately 98 %.

Table 1 The values of limits of quantification (LOQ) and detection (LOD) for large volume direct aqueous injection method.

Analyte	LOD ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g.l}^{-1}$)
Benzene	0.6	2.0
Toluene	0.9	3.0
Ethylbenzene	0.9	3.0
<i>p</i> -Xylene	1.0	3.3
<i>o</i> -Xylene	1.1	3.6

Reached LOD and LOQ values are lower by two orders than those reached by methods of direct aqueous injection and flame ionization detection before, and are below the normalized quality limit for drinking water (5; 1 000; 700 and 10 000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ for benzene, toluene, ethylbenzene, *m*- and *p*-xylene, *o*-xylene, respectively [9]), which makes this method suitable for monitoring of BTEX in water samples at trace levels.

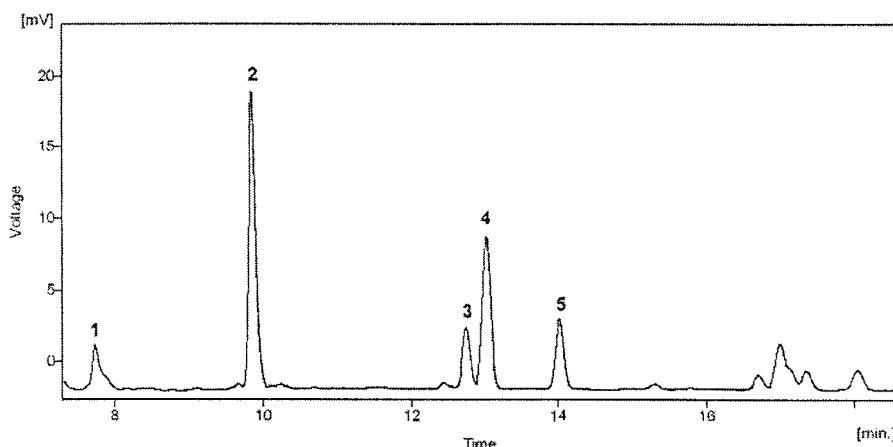


Fig. 2 Chromatogram of water sample contaminated with gasoline at sampling volume 250 μl and gasoline concentration of 1 mg.l^{-1} . 1 - benzene; 2 - toluene; 3 - ethylbenzene; 4 - *p*-, *m*-xylene; 5 - *o*-xylene.

Fig. 2 shows the chromatogram of water sample contaminated with gasoline. Determined concentrations were 8, 45, 16, 35 and 25 $\mu\text{g.l}^{-1}$ for benzene, toluene, ethylbenzene, *m*- and *p*-xylene, *o*-xylene, respectively. After injection of pure river water no peak was detected in the elution area of BTEX.

Conclusions

A new solventless method using Chromosorb P NAW in the liner of injection port as a sorbent material to retain water in the injection port while the BTEX are stripped into the column was developed. This arrangement enables direct injection of large volume of water sample using capillary gas chromatography to determine volatile organic compounds BTEX. The developed large volume direct aqueous injection method is suitable for the analysis of BTEX in drinking and river water samples concerning the reached detection and quantification limits. The main advantages of this method lie mainly in facility, time saving (no enrichment or pre-treatment steps are required) and lower price of analysis in comparison with any other method (purge-and-trap, SPME).

Acknowledgements

The authors thank the Slovak Research and Development Agency (grant No. APVV-0416-10) for the financial support of this research.

References

- [1] Namiesnik J., Wardencki W. (2000) *J. High Resol. Chromatogr.* 23, p. 297
- [2] Gurka D.F., Pyle S.P., Titus R. (1992) *Anal. Chem.* 64, p. 1749
- [3] Zwank L., Schmidt T.C., Haderlein S.B., Berg M. (2002) *Environ. Sci. Technol.* 36, p. 2054
- [4] Golfinopoulos S.K., Lekkas T.D., Nikolaou A.D. (2001) *Chemosphere* 45, p. 275
- [5] Straková M., Matisová E. (1997) *Chem. Listy* 91, p. 330
- [6] Kuráň P., Soják L. (1996) *J. of Chromatogr. A* 733, p. 119
- [7] Sung N.J., Johnson S.I., Zlatkis A., Middleditch B.S. (1988) *J. High Resol. Chromatogr. and Chromatogr. Communi.*, p. 409
- [8] Erfurth H., Just G. (1979) *Modelování a optimalizace chemických procesů*. SNTL, Praha, 47-51.
- [9] BTEX-EnviroTools, [Citované: 18.03.2013]
<<http://www.envirotools.org/factsheets/btex.shtml>>

Štvorjadrové tartarátokomplexy vanádu(V) s chirálnymi kationmi

Peter Antal¹, Peter Schwendt¹, Jozef Tatiersky¹, Róbert Gyepes^{2,3}

¹Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra anorganickej chémie, Mlynská dolina CH2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;

²Univerzita J. Selyeho, Pedagogická fakulta, Bratislavská cesta 3322, 945 01 Komárno, Slovenská republika;

³Ústav fyzikálnej chémie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i., Dolejškova 3, 182 23 Praha 8, Česká republika;
antalp@fns.uniba.sk

Abstract

The compounds $[\text{Fe}(\text{bpy})_3]_2[\text{V}_4\text{O}_8(\text{tart})_2] \cdot 14\text{H}_2\text{O}$ (**I**) and $\text{rac}-[\text{Ni}(\text{bpy})_3]_2[\text{V}_4\text{O}_8(\text{tart})_2] \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (**II**) were prepared by crystallization from the $\text{KVO}_3\text{-H}_4\text{tart-MX} \cdot x\text{H}_2\text{O-bpy-(H}_2\text{O, EtOH, CH}_3\text{CN)}$ [$M = \text{Fe, Ni}$; $X = \text{Cl}^-$, SO_4^{2-} ; $\text{tart} = \text{tartrate}$; $\text{bpy} = 2,2'$ -bipyridine] system. The compounds were characterized by elemental analysis, infrared spectra in solid state and by UV-vis spectroscopy in solution. X-ray analysis revealed the presence of chiral cations and anions in the structure. The crystal structure of both compounds is stabilized by large numbers hydrogen bonds.

Keywords: vanadium(V) tartrato complexes; nickel(II), iron(II); 2,2'-bipyridine; chirality

Úvod a formulácia cieľa

Chiralita je intenzívne študovanou témou v rôznych odboroch chémie. Zvýšená pozornosť sa venuje štúdiu niektorých špecifických vlastností chirálnych látok, ktoré by mohli byť potenciálne využiteľné v praxi – väčšinou ide o organické zlúčeniny využívané v medicíne. V posledných rokoch sa zintenzívil výskum chirálnych koordinačných zlúčenín, lebo mnohé z nich majú významné enantioselektívne katalytické účinky [1], magnetické vlastnosti (chirálné molekulové magnety) [2, 3], elektrické a optické vlastnosti (nelineárne optické materiály) [4, 5, 6, 7] alebo môžu slúžiť ako modelové látky pri štúdiu metaloenzýmov [8, 9].

Vzhľadom na potenciálne možnosti využitia narastá potreba úspešného zvládnutia prípravy chirálnych neracemických koordinačných zlúčenín. Pri syntézach s použitím achirálnych alebo racemických reaktantov vzniká racemát (ekvimolárna zmes oboch enantiomérov). Z racemického roztoku môže látka kryštalizovať ako racemická zlúčenina [10], racemický konglomerát [11, 12], pseudoracemická zlúčenina [13] alebo zmes chirálnej naracemickej a racemickej fázy [14, 15]. Javy súvisiace s kryštalizáciou chirálnych zlúčenín nie sú doteraz dostatočne preštudované.

Cieľom práce bolo preskúmať možnosti prípravy zlúčenín s chirálnym aniónom

$[V_4O_8(tart)_2]^{4-}$ a chirálnym kationom typu $[M(bpy)_3]^{2+}$, kde $M = Fe(II), Co(II), Ni(II), Cu(II)$ a $Zn(II)$. V prípade úspešnej syntézy charakterizovať pripravené látky pomocou chemickej analýzy vybraných prvkov, infračervenou, UV-vis spektroskopiou a RTG štruktúrnou analýzou. Výsledky štruktúrnej umožnia posúdiť spôsob kryštalizácie produktov a stanovenie geometrických informácií (vybrané medzimolekulové vzdialenosti, väzbové uhly, odchýlky atómov od rovín, uhly medzi rovinami, atď.) a sledovanie prítomnosti supramolekulových interakcií.

Materiál a metódy

Syntézy

Pri syntézach boli (okrem KVO_3) použité komerčné chemikálie, ktoré boli použité bez ďalšej úpravy. KVO_3 bol pripravený podľa literatúry.[16] Čistota KVO_3 bola overená pomocou práškovej RTG difrakčnej analýzy.[17]

Pri syntézach boli získané dva kryštalické produkty (**I** a **II**). Látka **I** obsahuje kation $[Fe(bpy)_3]^{2+}$ a látka **II** $[Ni(bpy)_3]^{2+}$. Pokusy o prípravu látok s kationom $[M(bpy)_3]^{2+}$, kde $M = Co(II), Cu(II)$ a $Zn(II)$ boli neúspešné.

Syntéza látky $[Fe(bpy)_3]_2[V_4O_8(tart)_2] \cdot 14H_2O$ (**I**)

KVO_3 (138 mg; 1,00 mmol) bol rozpustený vo vode (10,0 mL) a bola pridaná kyselina (2*R*, 3*R*)-vínna (77 mg; 0,50 mmol). Ku vzniknutému červenému roztoku bol pridaný roztok $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (140 mg; 0,50 mmol), *bpy* 237 mg; 1,50 mmol) v *EtOH* (5,0 mL), CH_3CN (3 mL) a vody (5,0 mL). Vzniknutý tmavočervený roztok sa nechal kryštalizovať pri teplote 5°C. Tmavočervené kryštály boli izolované po jednom týždni a sušené pri teplote 5°C.

Syntéza látky $[Ni(bpy)_3]_2[V_4O_8(tart)_2] \cdot 12H_2O$ (**II**)

KVO_3 (277 mg; 2,00 mmol) bol rozpustený vo vode (15,0 mL) a bola pridaná kyselina *rac*-vínna (301 mg; 2 mmol). Ku vzniknutému červenému roztoku bol pridaný roztok $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (240 mg; 1,00 mmol), *bpy* 470 mg; 3,00 mmol) v *EtOH* (5,0 mL) a vody (10,0 mL). Vznikla oranžová zrazenina, ktorá bola odfiltrovaná. Filtrát sa nechal kryštalizovať pri teplote 5°C. Oranžové kryštály boli izolované po 12 hodinách a sušené pri teplote 5°C.

Metódy a prístroje

Infračervené spektrá boli merané v nujolovej suspenzii na prístroji Nicolet 6700 FTIR.

UV-vis spektrá vodných roztokov látok boli merané na prístroji Jasco V-530 v 1 cm kvetách pri laboratórnej teplote. Elementárna analýza (C, H, N) bola meraná na prístroji Vario MICRO cube (Elementar). Monokryštálové RTG difrakčné záznamy boli merané na prístroji KUMA KM-4 pri teplote 120 K.

Výsledky a diskusia

Syntéza

Z reakčného systému: $KVO_3-H_4tart-MX \cdot xH_2O-bpy-(H_2O, EtOH, CH_3CN)$, kde $M = Fe(II)$ a $Ni(II)$, $X = SO_4^{2-}$ a Cl^- , *tart* = tartarátoligand, *bpy* = 2,2'-bipyridín, boli pripravené dve kryštalické látky (**I** a **II**). Chemickou analýzou látok **I** a **II** boli stanovené hmotnostné zlomky uhlíka, vodíka a dusíka (**Tab. 1**)

Tab. 1 Výsledky chemickej analýzy látok **I** a **II**

Prvok	Látka I		Látka II	
	w_{vyp} [%]	w_{prakt} [%]	w_{vyp} [%]	w_{prakt} [%]
C	42,43	42,83	43,16	43,09
H	4,19	3,87	3,94	4,02
N	8,73	8,62	8,88	8,69

Infračervené spektrá

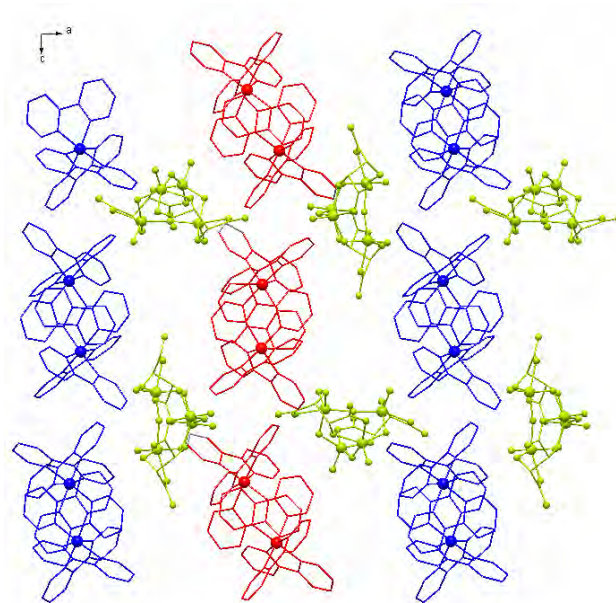
V infračervených spektrách látok **I** a **II** sú prítomné charakteristické pásy valenčných vibrácií väzieb: $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ pri 1600(**I**) a 1616(**II**) cm^{-1} ; $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ pri 1364(**I**) a 1361(**II**) cm^{-1} ; $\nu(\text{C}-\text{O}_h)$ pri 1091, 1072(**I**) a 1087, 1074, 1063 a 1049(**II**) cm^{-1} ; $\nu(\text{V}=\text{O}_t)$ pri 960(**I**) a 956(**II**) cm^{-1} ; $\nu_{\text{as}}(\text{V}-\text{O}-\text{V})$ pri 772(**I**) a 773(**II**) cm^{-1} ; $\nu_{\text{s}}(\text{V}-\text{O}-\text{V})$ pri 659(**I**) a 652(**II**) cm^{-1} a $\nu(\text{V}-\text{O}_{\text{tart}})$ pri 536(**I**) a 551(**II**) cm^{-1} (O_t = atóm kyslíka z väzby $\text{V}=\text{O}$, O_h = atóm kyslíka z hydroxylovej skupiny tartarátoligandu). Pásy zodpovedajúce valenčným vibráciám väzieb $\nu(\text{V}-\text{O}_h)$ sú v spektre látky **II**, teda s racemickým tartarátoligandom, štiepené viac ako v spektre látky **I**, obsahujúcej (2*R*, 3*R*)-tartarátoligand. [18]

Kryštalové štruktúry

Kryštalová štruktúra látky **I** pozostáva z izolovaných aniónov $[\text{V}_4\text{O}_8(\text{tart})_2]^{4-}$, kationov $[\text{Fe}(\text{bpy})_3]^{2+}$ a molekúl $\text{v} \cdot \text{d}$. Štvorjadrový komplexný anión pozostáva z cyklického skeletu $\{\text{V}_4\text{O}_8\}$ a dvoch (2*R*, 3*R*)-tartarátoligandov. Centrálny cyklus $\{\text{V}_4\text{O}_4\}$ aniónu má lodičkovú konformáciu. Atóm vanádu je pentakoordinovaný. Koordinačný polyéder má tvar

deformovanej tetragonálnej pyramídy. Katión $[\text{Fe}(\text{bpy})_3]^{2+}$ má mierne deformovanú oktaedrickú geometriu. V kryštálovej štruktúre látky sa nachádzajú oba enantioméry katiónu.

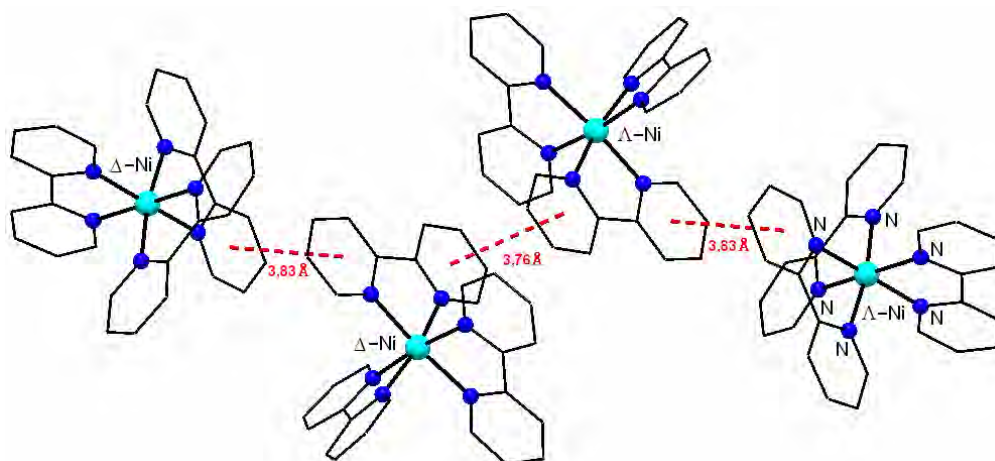
Katióny s rovnakou konfiguráciou sú usporiadané do vrstiev rovnobežných s kryštalografickou rovinou bc (**Obr. 1**).



Obr. 1 Znáoznenie homochirálnych vrstiev katiónov v kryštálovej štruktúre látky **I**. ($1S$ - $[\text{Ni}(\text{bpy})_3]^{2+}$ = červené sfarbenie, $1R$ - $[\text{Ni}(\text{bpy})_3]^{2+}$ = modré sfarbenie, $[\text{V}_4\text{O}_8((2R, 3R)\text{-tart})_2]^{4-}$ = zelené sfarbenie)

Kryštalová štruktúra látky **II** pozostáva z izolovaných aniónov $[\text{V}_4\text{O}_8(\text{tart})_2]^{4-}$, katiónov $[\text{Ni}(\text{bpy})_3]^{2+}$ a molekúl vody. Štvorjadrový anión $[\text{V}_4\text{O}_8(\text{tart})_2]^{4-}$ pozostáva z cyklického skeletu $\{\text{V}_4\text{O}_8\}$ a dvoch tartarátoligandov. V kryštálovej štruktúre látky sú prítomné oba enantioméry aniónu: $[\text{V}_4\text{O}_8((2R, 3R)\text{-tart})_2]^{4-}$ a $[\text{V}_4\text{O}_8((2S, 3S)\text{-tart})_2]^{4-}$. Katión $[\text{Ni}(\text{bpy})_3]^{2+}$ má mierne deformovanú oktaedrickú geometriu. Katióny s rovnakou konfiguráciou sú usporiadané do vrstiev paralelných s kryštalografickou rovinou ab . Vzhľadom na to, že v štruktúre sú prítomné oba enantioméry katiónu ($1S$ - $[\text{Ni}(\text{bpy})_3]^{2+}$ a $1R$ - $[\text{Ni}(\text{bpy})_3]^{2+}$) aj oba enantioméry aniónu ($[\text{V}_4\text{O}_8((2R, 3R)\text{-tart})_2]^{4-}$ a $[\text{V}_4\text{O}_8((2S, 3S)\text{-tart})_2]^{4-}$), látka patrí medzi racemické zlúčeniny.

Kryštalová štruktúra látky **II** je okrem elektrostatickej interakcie stabilizovaná aj vodíkovými väzbami a interakciami π - π . Interakcie π - π pôsobia medzi koordinovanými molekulami bpy viazanými v katiónoch. Do interakcie π - π sa zapája len jedna z troch koordinovaných molekúl bpy , pričom niektoré zapájajú do interakcií oba aromatické systémy a niektoré len jeden. Interakciami π - π sú navzájom pospájané štvorice katiónov (**Obr. 2**).



Obr. 2 Interakcie π - π medzi aromatickými systémami *bpy* ligandov v kryštálovej štruktúre látky **II**. Atómy uhlíka a vodíka sú pre názornosť vynechané.

Záver

Práca bola venovaná príprave a charakterizácii štvorjadrových tartarátokomplexov vanádu(V) s chirálnymi kationmi. Z reakčného systému: $\text{KVO}_3\text{-H}_4\text{tart-MX}\cdot x\text{H}_2\text{O-bpy-(H}_2\text{O, EtOH, CH}_3\text{CN)}$ boli pripravené dve kryštalické látky.

V kryštálovej štruktúre $[\text{Fe}(\text{bpy})_3]_2[\text{V}_4\text{O}_8(\text{tart})_2]\cdot 14\text{H}_2\text{O}$ (**I**) sa nachádzajú oba enantioméry kationu, ale len jeden enantiomér aniónu: $[\text{V}_4\text{O}_8((2R, 3R)\text{tart})_2]^{4-}$. Kryštalová štruktúra je stabilizovaná okrem elektrostatickej interakcie aj vodíkovými väzbami.

Látka $\text{rac-}[\text{Ni}(\text{bpy})_3]_2[\text{V}_4\text{O}_8(\text{tart})_2]\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (**II**) patrí medzi racemické zlúčeniny. V kryštálovej štruktúre sa nachádzajú oba enantioméry aniónu aj kationu. Kryštalová štruktúra je popri elektrostatických interakciách stabilizovaná aj vodíkovými väzbami a interakciami π - π .

Pod'akovanie

Touto cestou by som sa chcel poďakovať RNDr. Kataríne Gáplovskej, CSc. za meranie elementárnej analýzy a všetkým pracovníkom Katedry anorganickej chémie PriF UK za pomoc pri práci. Práca bola podporená Grantom pre doktorandov a mladých vedeckých pracovníkov UK (Grant UK č.: UK/259/2012).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Batter S.R., Robson R. (1998) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37, p. 1460
- [2] Vallejo J., Castro I., Ferrando-Soria J., Déniz-Hernández M.P., Ruiz-Pérez C., Lloret F., et al. (2011) *Inorg. Chem.* 50(6), p.2073
- [3] Decurtins S., Schmalte H.W., Schneuwly P., Ensling J., Gütllich (1994) *J. Am. Chem.*

- Soc. 116, p. 9521
- [4] Martin L., Day P., Horton P., Nakatsuji S., Yamada J., Akutsu H. (2010) *J. Mater. Chem.* 20, p. 2738
- [5] Fang Q., Zhu G., Xue M., Sun J., Sun F., Qiu S. (2006) *Inorg. Chem.* 45, p. 3582
- [6] Coronado E., Galán-Mascarós J., Gómez-García C.J., Murcia-Martínez A., Canadell E. (2004) *Inorg. Chem.* 43, p. 8072
- [7] Martin L., Day P., Nakatsuji S., Yamada J., Akutsu H., Horton P. (2010) *Cryst. Eng. Comm.* 12, p. 1369
- [8] Zhou Z.H., Zhao H., Tsai K.R. (2004) *J. Inorg. Biochem.* 98, p. 1787
- [9] Fernández G., Corbella M., Alfonso M., Stoeckli-Evans H., Castro I. (2004) *Inorg. Chem.* 43, p. 6684
- [10] Chatterjee R., Ali M., Drew M.G.B., Nethaji M., Mondal S., Mukherjee M. (2009) *Trans. Met. Chem.* 34, p. 1
- [11] Breu J., Domel H., Stoll A. (2000) *Eur. J. Inorg. Chem.* p. 2401
- [12] Huang W., Ogawa T. (2006) *Polyhedron* 25, p. 1379
- [13] Kostyanovsky R.G., Lyssenko K.A., Kostyanovsky V.R. (2000) *Mendeleev. Commun.* 10, p. 44
- [14] Lennartson A., Olsson S., Sundberg J., Håkansson M. (2010) *Inorg. Chim. Acta* 363, p. 257
- [15] Masciocchi N., Ardizzoia G.A., Monica G.L., Moret M., Sironi A. (1997) *Inorg. Chem.* 36, p. 449
- [16] Antal P., Tatiersky J., Schwendt P., Žák Z., Gyepes R. (2013) *J. Mol. Struct.* 1032, p. 240
- [17] Morris M.C., et al. (1981) *Standard X-Ray Diffraction Powder Patterns*, Nat. Bur. Stand., Washington, USA, p. 57
- [18] Schwendt P., Tracey A.S., Tatiersky J., Gálíková J., Žák Z. (2007) *Inorg. Chem.* 46, p. 3971

Cladding tube materials for advanced nuclear facilities with closed fuel cycle

Iveta Bartošová

Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta elektrotechniky a informatiky, Ústav jadrového a fyzikálneho inžinierstva, Ilkovičova 3,81219 Bratislava, Slovensko, iveta.bartosova6@gmail.com

Abstract

The paper is aimed on perspective materials for fuel cladding in advanced nuclear reactors. Samples of Eurofer and ODS Eurofer were studied by various techniques such as Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy, Vickers Hardness and Coincidence Doppler Broadening. After studying the samples by these methods, we implanted them by Helium atoms to simulate irradiation damage. Samples were then remeasured by Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy to determine the affect of implantation on its behavior.

Key words: *Gen IV; Oxide dispersion strengthening; fuel cladding; helium implantation*

Introduction

Most worldwide operating commercial nuclear reactors are included in Generation II. The Generation III reactors have just started to be deployed, and Gen III+ reactors are at the advanced level of commercialization. At the present time, Toshiba is the only company building a Generation III (in Japan) and AREVA is the only one building Generation III+ plants, one in Finland and one in northern France. In 2000, the US Department of Energy launched a new program, called Generation IV Initiative, to broaden the opportunity of nuclear energy utilization by making further advances in nuclear energy systems design. Gen IV Initiative is an international effort between ten countries and the European Union. The number of the participating countries is on the rise [1]. This initiative calls for new nuclear energy systems that will significantly improve safety and reliability, sustainability, reactor lifetime (60 years or more), proliferation resistance and profitability, setting them apart from the current nuclear power reactors and a closed fuel cycle therefore producing less nuclear waste. The foremost consideration in the successful development and deployment of Gen IV reactor systems is the performance and reliability issues involving structural materials for both in-core and out-of-core applications. The structural materials need to withstand much higher temperatures, higher neutron doses and extremely corrosive environment, which are beyond the experience of our current nuclear power plants. Materials under active consideration for use in different reactor

components include various ferritic/martensitic (FM) steels, austenitic stainless steels, nickel-base superalloys, oxide dispersion strengthened (ODS) steels, ceramics, composites, etc.

Fuel Cycles and Sustainability

The studies of the Fuel Cycle Crosscut Group are central to the development of systems that encompass complete fuel cycles. They defined four general classes of nuclear fuel cycle, (1) the once-through fuel cycle, (2) a fuel cycle with partial recycle of plutonium, (3) a fuel cycle with full plutonium recycle, and (4) a fuel cycle with full recycle of transuranic elements. Systems that employ a fully closed fuel cycle hold the promise to reduce repository space and performance requirements, although their costs must be held to acceptable levels. These strategies hold the promise to reduce the long-lived radiotoxicity of waste destined for geological repositories by at least an order of magnitude. This is accomplished by recovering most of the heavy long-lived radioactive elements. These reductions and the ability to optimally condition the residual wastes and manage their heat loads permit far more efficient use of limited repository capacity and enhance the overall safety of the final disposal of radioactive wastes.

In the most advanced fuel cycles using fast-spectrum reactors and extensive recycling, it may be possible to reduce the radiotoxicity of all wastes such that the isolation requirements can be reduced by several orders of magnitude (e.g., for a time as low as 1000 years) after discharge from the reactor. Studies also established an understanding of the ability of various reactors to be combined in so-called symbiotic fuel cycles. For example, combinations of thermal reactors and fast reactors are found to work well together. Improvements in the burn-up capability of gas or water-cooled thermal reactors may also contribute to actinide management in a symbiotic system. Thermal systems also have the flexibility to develop features, such as hydrogen production in high-temperature gas reactors or highly economical light water reactors, which are part of an overall system offering a more sustainable future.

Fuel cladding

The cladding is the first safety barrier to prevent radioactivity transfer to the environment. Whether the fuel is UOX (Uranium dioxide), MOX (mixed oxide), metal, ceramic etc. the cladding must ensure safety and prevent damage of the fuel. In Generation II reactors the main cladding material is usually Zircaloy. In advanced nuclear facilities where the temperature

exceeds the usual, more advanced materials will be needed to guarantee nuclear safety. This issue can be solved by utilizing for example FM and ODS steels.

Materials and methods

Series of steel samples from various organizations worldwide were sent to the Institute of Nuclear and Physical Engineering, FEI STU. In this paper I will focus on one FM steel (Eurofer) and one ODS steel (ODS Eurofer). The materials were studied by various techniques like Vickers Hardness, Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy (PALS) and Coincidence Doppler Broadening. After these tests we implanted the samples with helium ions. The implantation simulates irradiation damage, since we do not have access to a reactor for neutron irradiation and the manipulation with the irradiated samples would be complicated.

Experimental

For a better understanding of the purpose of strengthening materials by oxides (ODS) I will compare the material Eurofer (base material) and its ODS version ODS Eurofer. Chemical composition is in Tab. 1.

Tab. 1 Chemical composition of Eurofer and ODS Eurofer [3].

%	Cr	W	Mn	Ta	V	S	Si	N	C	Co	P	Y ₂ O ₃
EURO.	9,25	1,1	0,4	0,07	0,2	0,005	0,04	0,06	0,105	0,006	0,005	-
ODS E.	9,25	1,1	0,4	0,07	0,2	0,005	0,04	0,06	0,105	0,006	0,005	0.3

The measurement was carried out in the Laboratory of Low Temperature Physics, Charles University, Prague. First we made series of Vickers Hardness (HV) test to determine the integrity of the material surface (Fig. 1). HV under different load was basically the same for individual samples however it is evident that ODS Eurofer achieved higher hardness than its base material. Fig. 2 presents HV as a function of annealing temperature. It should be noted that in all graphs the solid lines through the data points are provided solely as eye guide.

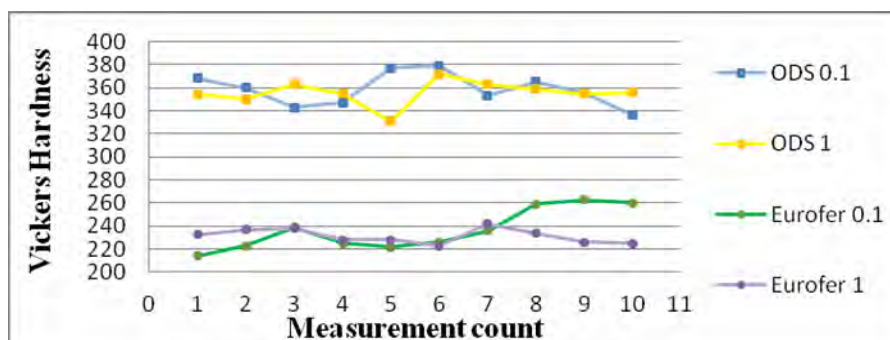


Fig. 1 Vickers Hardness test of Eurofer and ODS eurofer under the load of 980.7mN (0.1 kgf), 9807mN (1 kgf) for 10 s.

As can be seen from Fig. 2 the alloys hardness remains almost constant to 575°C. A slight upraise can be noticed from 575-650 °C. This temperature range corresponds to the diffusion of alloying elements that leads to the precipitation of secondary precipitates. The secondary precipitation can be understood by considering the solubility limits of carbon. The solubility of carbon is less at 600 °C than at 760 °C which is the tempering temperature in ferrite. Hence, the volume fraction of precipitates will be higher at 600 °C as compared to that of 760 °C. When the normalized and tempered steel is treated at 600 °C, the carbon further precipitates as carbides to maintain the solubility limits. After exceeding 700°C, a significant decrease in hardness occurs with a minimum at 800°C. This softening could be due to coarsening of laths and precipitates resulting in the conversion of tempered martensite into coarse grained ferrite. However after 800°C the hardness rapidly increases. This behavior can be explained by an assumption that an annealing temperature of 800°C and subsequent cooling is sufficient to induce a martensitic phase transition. The microstructure is that of as quenched martensite, with thin laths and a high density of dislocation [2]. In the case of ODS Eurofer the results correlate with those of its base material. ODS Eurofer presents a typical morphology of tempered martensite [2]. For the samples heat treated at more than 800°C, the HV also increases although not that significantly as in Eurofer. It is assumed that this is linked with the formation of the as quenched martensite microstructure. In Fig. 3 the results from CDB are presented. The CDB curves pertain to pure annealed iron. Curves for Eurofer show a higher contribution of annihilations with valence electrons with low momentum and lower for annihilations with core electrons with high momentum. The curve is in the area of high momentum ($p > 10 \times 10^{-3} m_0c$) is approximately constant, which shows that a fraction of positrons in Eurofer annihilate trapped in dislocations. The shape of the curves for ODS Eurofer is markedly different. It is significantly lower in the

high momentum area and presents a local minimum at $p \approx 15 \times 10^{-3} m_0c$ and local maximum at $p \approx 25 \times 10^{-3} m_0c$. A similar behavior shows the curve representing pure yttrium. Therefore a considerable amount of positrons annihilate in defects that are surrounded by Y_2O_3 precipitates. It is probable that clusters of vacancies in ODS steels are in the vicinity of Y_2O_3 precipitates. The solid line in Fig. 3 represents 40% contribution of positrons which annihilate with electrons of yttrium atoms. In the high momentum area the curve correlates well with the experiment.

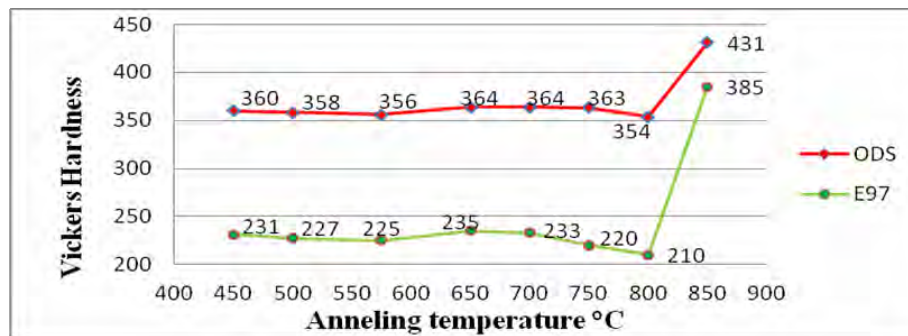


Fig. 2 Vickers hardness as a function of annealing temperature for Eurofer and ODS Eurofer.

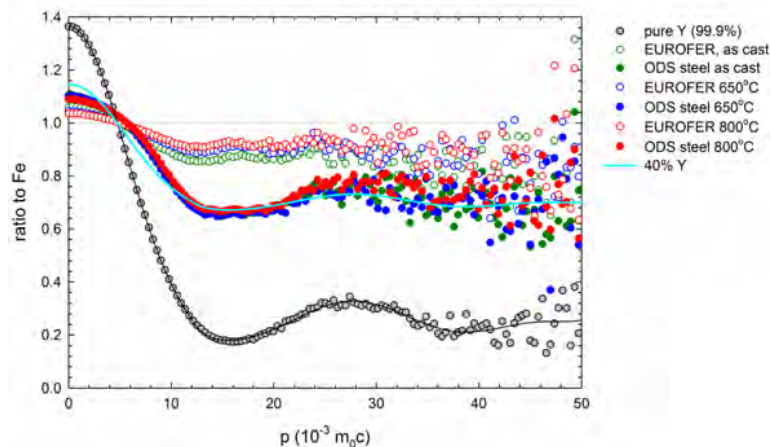


Fig. 3 CDB results of Eurofer and ODS Eurofer as cast, 650°C and 800°C and 40%, 99.9% yttrium.

In Fig. 4 are the results of PALS before and after implantation. Our main interest will be LT2- lifetimes of positrons in defects and their intensities I2. We can observe that in both cases the LT2 is higher in the implanted samples. The I2 decreased also in both cases although in ODS Eurofer the decrease is not that obvious. These results show irradiation induced accumulation of defects in all the implanted samples, which causes strengthening and hardening. Defect growing was proved by the rise of the lifetime of positrons in defects after the implantation. In all cases,

the intensity of positrons in defects decreased after helium implantation, which can indicate distinctive defect merging to the larger ones.

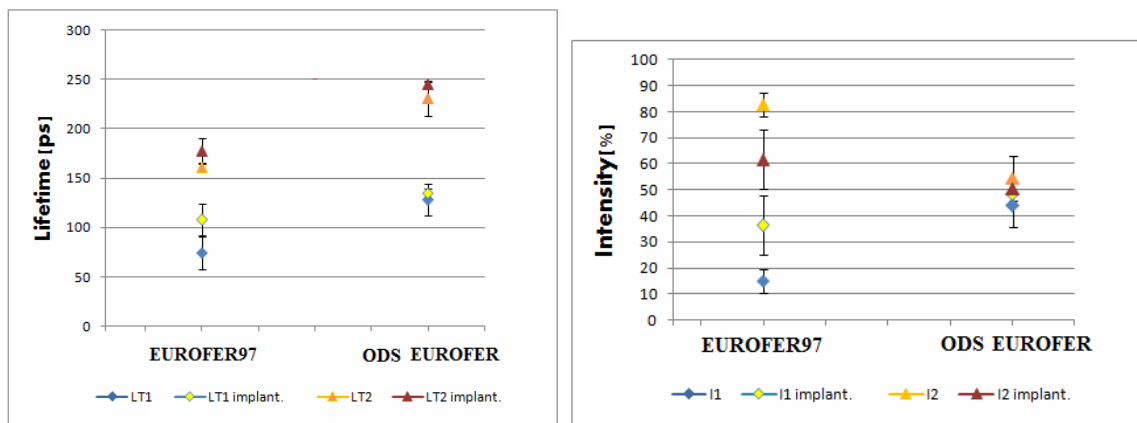


Fig. 4 Results from PALS a) lifetimes of positrons, b) intensities.

Conclusion

The different behavior of ODS steel and its base material were proven by various methods. Vickers Hardness shown significant improvement in the strength of ODS steel. From DCB we can assume that an amount of defects are in the vicinity of Y_2O_3 particles and positrons annihilate with them rather than with grain boundaries. Simulation of irradiation damage showed that after implantation the strength increased due to helium atoms that act as barriers for defect movement. However the ductility decreased and is therefore more brittle.

Acknowledgment

I would like to thank my supervisor Prof. Ing. Slugeň DrSc. and doc. Mgr. Čížek PhD. for advice and support.

References

- [1] Mansur L.K., Rowcliffe A.F., Nanstad R.K. et al. (2004) J. Nucl. Mater. 329, p. 166
- [2] Ramar A., Schäublin R., (2013) J. Nucl. Mater. 323, p. 432
- [3] Zeman A., Debarberis L., Kočík J. et al. (2007) J. Nucl. Mater. 362, p. 259

Charakterizácia génov modifikujúcich sacharidovú zložku polyketidového antibiotika auricínu v kmeni *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239

Carmen Bekeová¹, Renáta Nováková², Alena Reháková², Ján Kormanec²

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra biochémie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika,

² Slovenská akadémia vied, Ústav molekulárnej biológie, Oddelenie génovej expresie, Dubravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovenská republika;
carmen.bekeova@gmail.com

Abstract

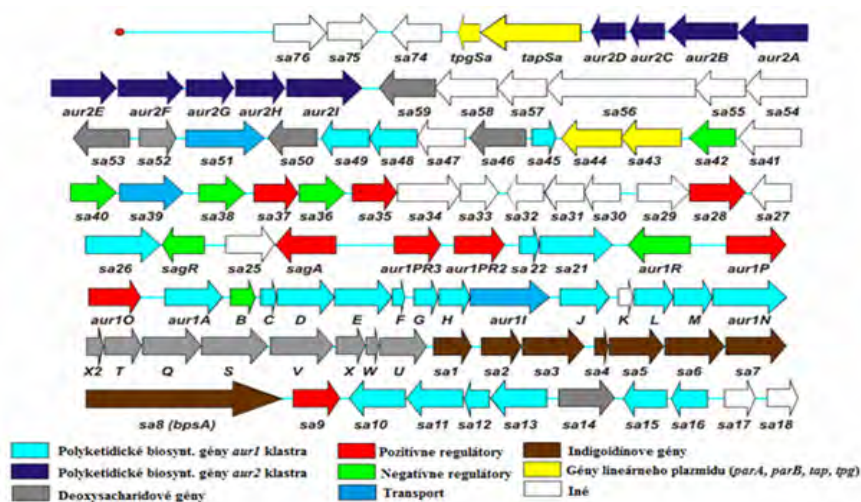
Streptomyces aureofaciens CCM 3239 belongs to the main producers of bioactive natural products. Their morphological as well as physiological differentiation involves the production of secondary metabolites, characterized by structural diversity, including antibacterial, anticancer and other type of compounds. In this strain gene cluster *aur1*, which is responsible for the production of secondary metabolite auricin was identified. The presence of aminoglycoside was described in auricin as a single representative from the group of angucycline. The aim of this paper is to clarify the function of two genes that encode the expected NDP-N-aminohexose dimethyltransferase (*sa52*) and NDP-hexose aminotransferase (*sa59*), which play a role in the biosynthesis of the antibiotic auricin. We disrupted these genes and studied their relationship to the production of auricin. Mutant $\Delta sa52$ showed considerably reduced production of the compound similar to auricin in which methyl groups have been removed. In the mutant $\Delta sa59$ no auricin activity was found.

Keywords: *auricin, Streptomyces, deoxyhexoses, polyketides.*

Úvod a formulácia cieľa

Streptomycéty patriace do čelade *Streptomycetaceae* a do radu *Actinomycetales* sú gram pozitívne pôdne baktérie [1]. Vyvinuli sa približne pred 450 miliónmi rokmi ako rozvetvené filamentárne organizmy [2], z ktorých väčšina žije v pôde ako saprofitický organizmus. Veľké zastúpenie rodu *Streptomyces* umožňuje syntézu rozmanitých sekundárnych metabolitov s rôznymi aktivitami [1].

Streptomycéty sú zaujímavými mikroorganizmami nielen z hľadiska morfolologickej, ale aj fyziologickej diferenciacie, ktorá zahŕňa produkciu sekundárnych metabolitov vrátane antibiotík a bioaktívnych zlúčenín [3]. Polyketidy reprezentujú veľkú, rozšírenú triedu antibiotík, sú syntetizované kondenzačnými reakciami za pomoci enzýmu polyketid syntázy [4]. Do triedy polyketidov patrí aj skupina angucyklínov so zástupcami, ako urdamycín, landomycín a jadomycín, ktoré na seba podobajú polyketidovou štruktúrou, ale je značný rozdiel v ich oligosacharidovej zložke [5]. Sú zaujímavé svojimi vlastnosťami, predovšetkým vďaka široko spektrálnym biologickým aktivitám [6]. Do tejto skupiny je zaradený aj sekundárny metabolit produkovaný *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239 [7]. V tomto kmeni bol identifikovaný a sekvenovaný klaster génov PKS *aur1* (**Obr. 1**), ktorý je zodpovedný za biosyntézu auricínu [8].



Obr. 1 Organizácia klastra *aur1*, zodpovedného za syntézu auricínu a okolitých oblastí (obsahujúci klaster *aur2* a gény pre syntézu indigoidínu) v *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239.

Sekvenčné analýzy potvrdili nielen prítomnosť biosyntetických génov, ale aj génov zúčastňujúcich sa pri biosyntéze sacharidovej skupiny auricínu [9]. Ako u jediného zastupiteľa angucyklínov, u auricínu bola opísaná prítomnosť aminoglykozidu. Aj z tohto hľadiska môžeme auricín považovať za látku so zaujímavou štruktúrou. Fragmentačná analýza vzoriek auricínu skutočne odhalila prítomnosť jediného iónu s $m/z = 142,1239$, ktorý by mohol prislúchať cukru dimethylaminodeoxyhexóze [7]. Táto dimethylaminodeoxyhexóza bola identifikovaná, ako forozamín s $m/z \approx 142,1$, ktorá sa nachádza už v charakterizovanom spektre butenyl-spinozýnu [10].

S cieľom získania bližších informácií ohľadom štruktúry auricínu a hlavne jej sacharidovej zložky sme rozrušením bližšie charakterizovali dva gény *sa52* a *sa59*, ktoré kódujú NDP-aminohexóza N-dimetyltransferázu a NDP-hexóza aminotransferázu nachádzajúcich sa na génovom klasteri *aur1* vo vzťahu k produkcii auricínu zo *S. aureofaciens* CCM 3239.

Materiál a metódy

Pri rozrušení génov sme postupovali podľa protokolu: Gust B., Kieser T. and Chater K. F., 2002, REDIRECT technology: PCR- targeting system in *Streptomyces coelicolor* [11].

Pri analýze produkcií auricínu sme postupovali podľa Nováková a kol., 2011 [12]. Pričom po etylacetátovej extrakcii na analýzu sme využívali metódy tenkovrstvovej chromatografie, kvapalinovej chromatografie a biochromatografie.

Do 50 ml BENNET média sme naočkovali spóry divého typu *S. aureofaciens* CCM 3239 a mutantných kmeňov vo výslednej koncentrácii 5×10^8 CFU/ml, ktoré rástli pri stálom

miešani (270 rpm, 28 °C). Vo vopred určených časových intervaloch sme odoberali 5 ml kultúry, ktoré sme prefiltrovali. Po filtrácii sme upravili objem filtrátu na 4 ml, následne sme 2x extrahovali 10 min s rovnakým objemom etylacetátu. Po odobratí organickej fázy sme vzorky vákuovo evaporovali do sucha. Pelety sme rozpustili v 1,2 ml 96 % etanolu, preniesli sme do skúmaviek a vysušili na vákuovej sušičke. Vzorky sme uchovávali pri -20 °C.

Z extraktu získané pelety sme rozpustili v 100 µl 96 % etanolu. Na TLC analýzu sme použili 1 µl a 10 µl alikvoty nakvapkané na silikagelové platničky, vyvíjané v zmesi butanolu sýteného s vodou. Vysušené TLC platničky sme umiestnili na veľkú LB platňu a následne sme ju preliali 30 ml Top agarom (LB), ktorý obsahoval 250 µl čerstvej nočnej kultúry *Bacillus subtilis* (OD₆₀₀=1.6). Preliatý chromatogram sme inkubovali cez noc pri 37 °C.

Po rozpustení peletu získaného pri extrakcii v 100 µl 96 % etanolu sme 20 µl vzorky použili na HPLC analýzu. Vzorku sme injektovali na kolónu reverznej fázy OmmiSpher 5 C₁₈ (5 µm, 250 x 4.6 mm) a analyzovali na HPLC systéme Varian ProStar s ProStar 325 UV-VIS detektorom. Využívali sme lineárny gradient voda (s 0,5 % kyselinou octovou) a acetonitril. Program zahŕňal nasledujúce kroky: 30 min 20-100 % acetonitril, 30 min 100 % acetonitril, 1 min 100-20 % acetonitril, 9 min 20 % acetonitril pri prietokovej rýchlosti 1 ml.min⁻¹ a detekcii pri 254 nm. Pri takýchto podmienkach auricin je eluovaný s retenčným časom 9,3 min [12].

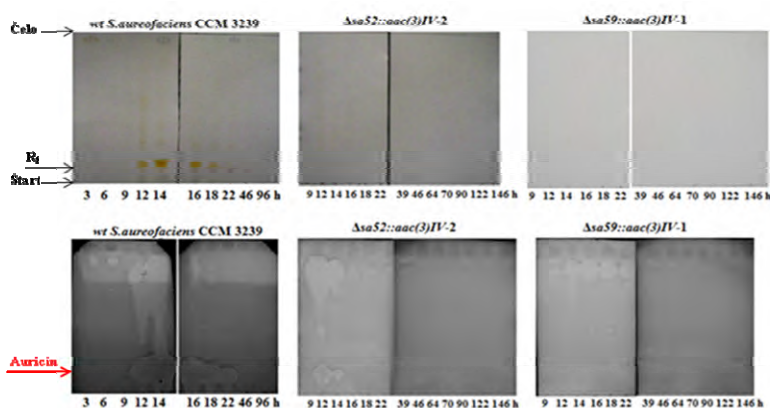
Výsledky a diskusia

Z literatúry je známe, že cukry sa bežne vyskytujú ako súčasť bioaktívnych prírodných produktov ako sú antimikrobiálne látky a protinádorové lieky a často sú rozhodujúce pre činnosť týchto zlúčenín. V dôsledku rozmanitosti štruktúr deoxycukrov, ktoré boli nájdené v prírode a ich významu pre prírodnú bioaktivitu, sa veľa úsilia venovalo objasneniu ich biosyntetických dráh [13].

Forozamín je deoxycukor, ktorý sa našiel v štruktúrach mnohých prírodných produktov. Z literatúry je známe, že päť génov *spnO*, *N*, *Q*, *R* a *S* zo spinozínového biosyntetického klastra zo *Saccharopolyspora spinosa* je zahrnutých do premeny deoxyglukózy na forozamín. *SpnR* a *spnS* gény boli predikované ako gény zodpovedné za premenu deoxyglukózy na aminodeoxyglukózu (*spnR*) a aminodeoxyglukózy na dimetylaminodeoxyglukózu (*spnS*) [13]. Predbežná analýza našich proteínových produktov génov *sa52* a *sa59* z *aur1* klastra zo *S. aureofaciens* CCM 3239 po porovnaní s databázou NCBI/BLAST ukázala, že tieto gény vykazujú veľkú podobnosť s génmi *spnR* a *spnS* zo *S. spinosa*, ktoré sú zahrnuté do premeny deoxyglukózy na forozamín.

Aromatické polyketidy baktérií väčšinou obsahujú deoxycukry. Ich vznik ako aj pripojenie je najčastejšie katalyzované enzýmami ako sú glykozyltransferázy. Metyltransferázy zase prenášajú aktivovanú metylovú skupinu na uhlík, dusík alebo kyslík pričom využívajú kofaktor S-adenozyl-L metionín [14]. Aminoglykozidy sú tvorené z keto cukrov transaminačnými reakciami katalyzovanými amiotransferázami [15].

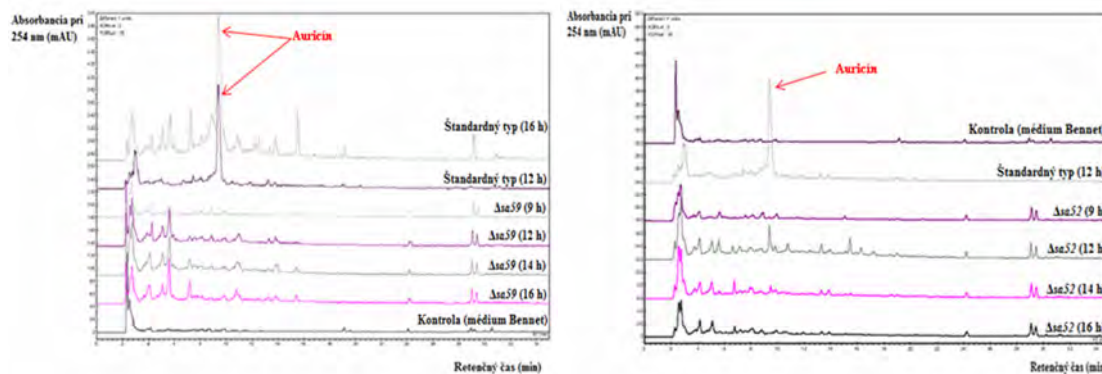
Pomocou biochromatografie sme skúmali úlohu študovaných génov pri produkcii polyketidového antibiotika auricínu. Pri testoch sme používali mutantné kmene s rozrušenými génmi *sa52* a *sa59*, nahradené apramycínovou kazetou. Pri TLC analýze sme porovnávali produkciu auricínu v štandardnom type *S. aureofaciens* CCM 3239 a vo vybraných typoch mutantov $\Delta sa52::aac(3)IV-2$ a $\Delta sa59::aac(3)IV-1$. Študovali sme aj aktivitu auricínu voči gram pozitívnej baktérie *Bacillus subtilis* v štandardnom type *S. aureofaciens* CCM 3239 a v mutantných kmeňoch $\Delta sa52::aac(3)IV-2$ a $\Delta sa59::aac(3)IV-1$ (**Obr. 2**). Po biochromatografickej analýze auricín má v danom TLC systéme R_f hodnotu 0,13; ktorá zodpovedá škvvrne inhibovaného rastu *B. subtilis* [16].



Obr. 2 TLC a biochromatografická analýza extraktov zo štandardného typu *S. aureofaciens* CCM 3239 a mutantných kmeňov $\Delta sa52::aac(3)IV-2$ a $\Delta sa59::aac(3)IV-1$ kultivovaných v tekutom médiu Bennet. Pri biochromatografii TLC platničky boli preliaté s *B. subtilis*. Inhibičná zóna s $R_f = 0,13$ zodpovedá auricínu v štandardnom type *S. aureofaciens* CCM 3239 [16], ktorá chýba u mutantu $\Delta sa59::aac(3)IV-1$, a je značne redukovaná u mutantu $\Delta sa52::aac(3)IV-2$. Pričom R_f je retardačný faktor – pomer vzdialenosti stredu škvvrny od štartu a vzdialenosti čela mobilnej fázy od štartu.

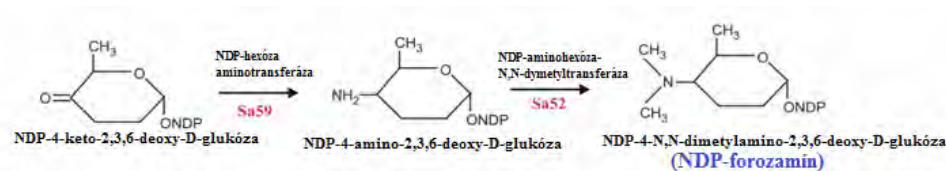
V prípade mutantu $\Delta sa52$ dochádza k značne redukovanej produkcii látky podobnej auricínu (auricín bez dvoch metylov na sacharidovej zložke) iba v 12 a 14 hodine, na základe čoho predpokladáme, že dimetyltransferáza nie je esenciálna pri produkcii auricínu. Pri mutantnom kmeni $\Delta sa59$ sa nezaznamenala žiadna aktivita auricínu. Z čoho vyplýva, že sa nedochádza k produkcii auricínu, na základe čoho predpokladáme, že aminotransferáza by mohla byť esenciálna pri produkcii antibiotika.

Produkcii auricínu sme kvantifikovali pomocou HPLC na reverznej fáze. Používali sme extrakty z 9, 12, 14 a 16 hod. mutantov $\Delta sa52$ a $\Delta sa59$. Výsledky sme porovnali s extraktmi z divého typu z 12 hod. pri $\Delta sa52$ 12 a 16 hod. pri $\Delta sa59$ (**Obr. 3**). Aurícín je eluovaný v použítom systéme hodnotou R_t 9,3 [12]. Výsledky HPLC analýzy potvrdili získané výsledky z TLC analýzy.



Obr. 3 Výsledky HPLC analýzy zo vzoriek izolovaných zo štandardného typu *S. aureofaciens* CCM3239 a mutantov mutantných kmeňov $\Delta sa52::aac(3)IV-2$ a $\Delta sa59::aac(3)IV-1$. Na osi x je znázornený retenčný čas v min a na osi y absorbancia pri 254 nm. Na grafe sú znázornené jednotlivé vzorky s inou farbou, nad každým chromatogramom je napísaný názov vzorky a hodina odobratia extraktu.

Vzniknuté zlúčeniny sme izolovali pomocou HPLC a následne analyzovali hmotnostnou spektrometriou. Podľa výsledkov dimetyltransferáza metyluje aminoskupinu na sacharidovej časti auricínu (**Obr. 4**).



Obr. 4 Čiastočná schéma premeny deoxyhexózy na forozamín, premena deoxyglukózy na aminodeoxyglukózu a aminodeoxyglukózy na dimetylamino-deoxyglukózu.

Záver

Rozrušením génu *sa52*, kódujúceho NDP-aminohexóza N-dimetyltransferázu nedochádza k metylácii amino skupiny sacharidovej zložky auricínu. Táto zmena neruší, ale iba znižuje jeho aktivitu..

Rozušením génu *sa59*, kódujúceho NDP-hexóza aminotransferázu, sa pravdepodobne nenasyntetizuje dimetylamín na cukornú zložku auricínu. Táto zmena zruší aktivitu auricínu.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporená riešením grantu APVV-0203-11.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Hopwood D. A. (2007) *Streptomyces* in nature and medicine: The antibiotic makers. Oxford University Press, Inc., Madison Avenue, New York, USA, p. 8
- [2] Chater K. F. (2006) *Phil. Trans. R. Soc. B* 361, p. 761
- [3] Demain A. L. (1999) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, p. 455
- [4] Kwan D. H. and Schulz F. (2011) *Molecules* 16, p. 6092
- [5] Kharel M. K., Pahari P., Shepherd M. D., Tibrewal N., Nybo S. E., Shaaban K. A. and Rohr J. (2012) *Nat. Prod. Rep.* 29, p. 264
- [6] Rohr J. and Thiericke R. (1992) *Nat. Prod. Rep.* 9, p. 103
- [7] Kutaš, P. (2011) Molekulárna charakterizácia regulácie a biosyntézy polyketidového antibiotika auricínu v kmeni *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239. (Dizertačná práca), Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p. 61
- [8] Nováková R., Bistáková J., Homérová D., Řežuchová B., Kormanec J. (2002) *Gene* 297, p. 197
- [9] Nováková R., Kniršchová R., Farkašovský M., Fecková L., Reháková A., Mingyár E., Kormanec J. (2013) *FEMS Microbiol. Lett.* in press
- [10] Lewer P., Hahn D. R., Karr L. L., Duebelbeis D. O., Gilbert J. R., Crouse G. D., Worden T., Sperk T. C., Edwards P. M. R., Graupner P. R. (2009) *Bioorg. Med. Chem.* 17, p. 4185
- [11] Gust B., Kieser T. and Chater K. F. (2002) REDIRECT technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*. Norwich: Jhon Innes Center, Norwich Research Park, Colney, UK, p. 1
- [12] Nováková R., Reháková A., Kutaš P., Fecková L. and Kormanec J. (2011) *Microbiology* 157, p. 1629
- [13] Hong L., Zhao Z., Melançon III C. E., Zhang H. and Liu Hw. (2008) *J. Am. Chem. Soc.* 130(14), p. 4954
- [14] Hertweck C., Luzhetsky A., Rebets Y., and Bechtold A. (2007) *Nat. Prod. Rep.* 24, p. 162
- [15] Nedal, A., Zotchev, S. B. (2004) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, p. 7
- [16] Nováková R., Kutaš P., Fecková L., Kormanec J. (2010) *Microbiology* 156, p. 2374

Analýza proteínov elektroforetickými fokusačnými technikami s hmotnostne spektrometrickou detekciou

Nikoleta Biherczová, Jozef Marák

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
biherczova@fns.uniba.sk*

Abstract

The aim of this work was on-line coupling of mass spectrometry (MS) with electrophoretic focusing techniques for the analysis of proteins. Electrophoretic focusing techniques were selected for the separation proteins, like transferrin, lysozyme and myoglobin, present in complex biological matrices (human saliva and urine) from interfering matrix components. Capillary isoelectric focusing (CIEF) in on-line coupling with MS was chosen as the electrophoretic focusing technique.

Kľúčové slová: *proteíny; on line spojenie CIEF-MS; off-line spojenie pITP-MS, komplexné vzorky*

Úvod a formulácia cieľa

V poslednej dobe sa veľký dôraz kladie na detekciu konkrétnych proteínov v rôznych telesných tekutinách, keďže často slúžia ako diagnostické markery pri viacerých ochoreniach. Nízke koncentračné úrovne týchto proteínov vyžadujú použitie veľmi citlivých a selektívnych analytických techník. Zároveň je stále väčší záujem o analytické techniky, ktoré poskytujú spoľahlivé výsledky za relatívne krátky čas a s minimálnou spotrebou vzorky. Výhodným riešením tohto problému je spájanie vhodnej separačnej techniky s vysoko citlivou a selektívnou detekčnou technikou ako je hmotnostná spektrometria (MS).

Analýza ľudských proteínov v biologických vzorkách je veľmi náročná (bio)analytická úloha, kde hlavným problémom je zložitosť vzorky z hľadiska počtu komponentov ako aj ich veľmi rozdielnych koncentrácií, kde koncentračné rozdiely predstavujú 10-12 dekadických poriadkov. Preto stanovenie proteínov v komplexných vzorkách často vyžaduje zakoncentrovanie a použitie rozličných predúpravných techník [1]. Kapilárne elektroforetické techniky sú vhodné techniky pre klinickú analýzu, pretože poskytujú možnosť súčasnej kvalitatívnej aj kvantitatívnej analýzy vzoriek biologického pôvodu [2].

Vysoká separačná účinnosť, krátky čas analýzy, nízka spotreba vzorky a elektrolytov, to sú všeobecné charakteristiky CE. Kombinácia týchto charakteristík s vysokou citlivosťou a štruktúrnymi informáciami, ktoré poskytuje MS, robí techniky CE-MS atraktívnymi aj z hľadiska analýzy proteínov [3]. S využitím CE-MS na analýzu proteínov sa zaoberá viac

publikácií od rôznych autorov. Nesbitt a kol. [4] uvádza vo svojom prehľadovom článku informácie o súčasných aplikáciách týkajúcich sa CE-MS analýzy proteínov.

Izoelektrická fokusácia (IEF) je jednou zo štyroch základných elektroforetických techník, ktorá sa vyznačuje vysokou rozlišovacou schopnosťou a je najviac využívaná práve na analýzu amfotérnych látok prítomných vo vzorkách biologického pôvodu, ako sú napríklad peptidy a proteíny. Analyty sa delia v pH gradiente vytvorenom amfolytmi v elektrickom poli na základe svojich rozdielnych pI hodnôt. IEF je možné vykonávať v géle, a taktiež vo voľnom roztoku v kapilárach. Nespornou výhodou CE metód je možnosť relatívne ľahkej automatizácie a on-line detekcie separovaných zložiek [2]. V súčasnosti stále rastie rozsah použitia IEF, nakoľko v spojení s inými technikami, ako sú napríklad kvapalinová chromatografia alebo hmotnostná spektrometria, je možné zlepšiť separačnú a detekčnú účinnosť celého analytického postupu.

Napriek vyššie spomínaným výhodám nie je spojenie CIEF-MS rutinne používanou analytickou technikou. Ako ukázali Thang a kol. [5], nosné amfolyty majú často za následok zníženie intenzity iónov proteínov pri MS detekcii. Okrem toho amfolyty kvôli svojmu neprchavému charakteru a vysokej koncentrácii počas separácie ľahko zanášajú sprejovacia ihlu v MS, čo následne vedie k celkovému znečisteniu celého MS prístroja.

Z uvedeného rozboru je zrejماً dvojaká a antagonistická rola nosných amfolytov v spojení CIEF-MS. Na jednej strane sú nevyhnutné z hľadiska dosiahnutia požadovanej separačnej účinnosti v samotnej CIEF, ale na druhej strane výrazne negatívne ovplyvňujú MS detekciu.

Cieľom predloženej práce bolo

- realizovať on-line prepojenie CIEF-MS vhodné na analýzu proteínov
- overiť základné analytické parametre CIEF separácie v spojení s hmotnostne spektrometrickou detekciou.

Materiál a metódy

Na elektroforetické separácie proteínov sa používala kapilárna izoelektrická fokusácia v on-line spojení s MS. CIEF merania sa uskutočnili pomocou prístroja Agilent HP 3D (Waldbronn, Nemecko), ktorý bol pomocou ESI rozhrania pripojený k hmotnostnému spektrometru Agilent LC/MSD Trap XCT Plus (Agilent Technologies, Nemecko).

Elektroforetické separácie sa uskutočňovali s použitím nepokrytých kremenných kapilár s vnútorným priemerom 50 μ m, ktorých dĺžka sa pohybovala od 50 do 80cm

(Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA). Efektívna dĺžka kapiláry bola v každom prípade menšia o 8,5cm (kvôli UV detektoru). Ďalšie merania sa uskutočnili pomocou kapilár pokrytých polyvinyl alkoholom (PVA) (Agilent Technologies, Nemecko) s vnútorným priemerom 50 μ m a dĺžkou 124cm. Napätie vložené na kapiláru sa pohybovalo medzi 200-300V/cm. Teplota kapilárnej kazety bola udržiavaná pri konštantnej teplote 25°C. Elektroforeogramy sa vyhodnocovali pomocou programu ChemStation 7.01 (Agilent). Elektrokinetická mobilizácia zón k detektoru počas CIEF separácie sa realizovala buď pomocou elektroosmotického toku (nepokryté kapiláry) alebo použitím tlaku (50mbar) na začiatok kapiláry.

Elektroforetický analyzátor bol pripojený k hmotnostne spektrometrickému detektoru Agilent LC/MSD Trap XCT Plus (Agilent Technologies, Nemecko), ktorý disponuje iónovou pascou. On-line spojenie bolo zabezpečené prostredníctvom elektrosprejového rozhrania (ESI). Ako podporná tieniaca kvapalina sa používala zmes metanolu a vody v pomere 80:20 s obsahom 1% (v/v) kyseliny mravčej. Napätie vkladané na sprejovacu kapiláru bolo 3kV, použitý sušiaci plyn bol dusík s prietokom 4 l/min a teplotou 300°C. Hmotnostný spektrometer pracoval v pozitívnom móde ionizácie a v závislosti od analyzovaných molekúl v skenovacím rozsahu 300-2500m/z resp. 500-4000m/z.

Na prípravu roztokov boli použité chemikálie analytickej čistoty. Na hmotnostne spektrometrické meranie boli použité chemikálie MS čistoty, ako boli voda použitá na prípravu roztokov (LC-MS CHROMASOLV®; Sigma-Aldrich, Buchs, Švajčiarsko), metanol (LC-MS CHROMASOLV®; Sigma-Aldrich, Buchs, Švajčiarsko) a kyselina mravčia (puriss. p.a. Eluent additive for LC-MS; Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko). Roztoky analytu a katolytu boli pripravené z kyseliny mravčej s koncentráciou 0,05 mol/L a z hydroxidu sodného (ACS reagent, 28,0–30,0%; Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko) s koncentráciou 0,1 mol/L.

1% roztok amfolytov sa pripravil zo 40% zásobného roztoku amfolytov (Ampholine, LKB, Bromma, Švédsko) riedením destilovanou vodou. Štandardy proteínov boli zaobstarané od firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemecko) a Renal (Budapešť, Maďarsko).

Zásobne roztoky ako aj štandardy proteínov boli skladované v chladničke pri max. 8°C a nie viac ako dva dni.

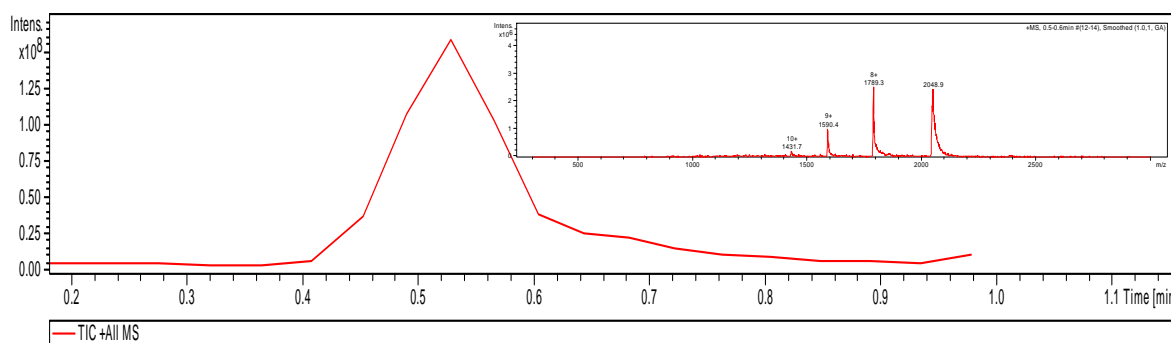
Výsledky a diskusia

Kapilárna izoelektrická fokusácia bola zvolená ako separačná technika pred MS analýzou. Počas CIEF meraní, ktoré boli realizované na komerčnom elektroforetickom

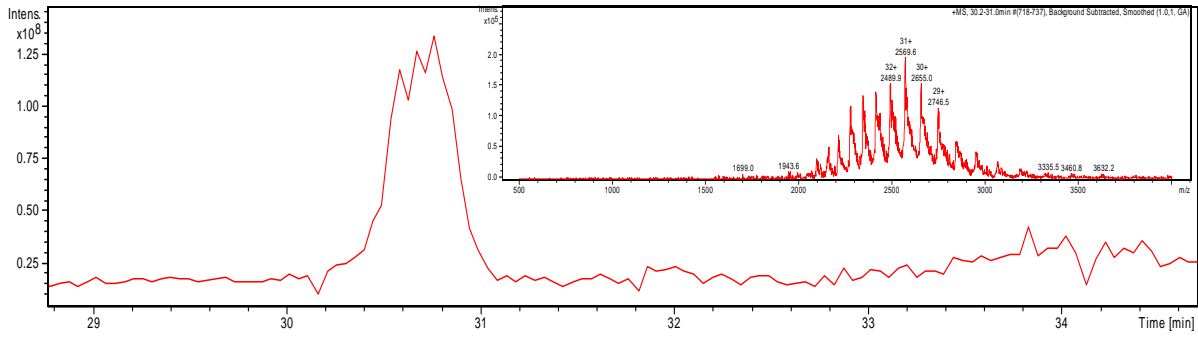
analyzátoře, bol použitý nový, tzv. „sekvenčný mód“ injektovania, keď na rozdiel od „konvenčnej CIEF“ bola zóna vzorky injektovaná medzi zóny amfolytov a nie ako zmesná zóna amfolyt – vzorka. Na Obr. 1 je znázornený TIC záznam a zároveň aj dekonvoluované hmotnostné spektrum štandardu lyzozýmu, kde vidíme tiež charakteristické píky daného proteínu. Na Obr.2 je uvedený taktiež TIC záznam a dekonvoluované hmotnostné spektrum štandardu transferínu . Na ďalšom obrázku (Obr.3) je znázornený TIC záznam a dekonvoluované hmotnostné spektrum myoglobínu s charakteristickými píkami pre tento proteín.

Na Obr. 4A je znázornený TIC záznam lyzozýmu a transferínu po izoelektrickej fokusácii. Lyzozým na zázname je dobre viditeľný, kým transferín nevytvára intenzívny pík. Tento jav je pravdepodobne spôsobený nadmernou ionizáciou použitých amfolytov a poukazuje na to, že napriek tomu, že koncentrácia amfolytov nebola vysoká, potlačila ionizáciu transferínu. Na zázname 4B je vidieť hmotnostné spektrum štandardu lyzozýmu po dekonvolúcii a na obrázku 4C hmotnostné spektrum štandardu transferínu po dekonvolúcii. Ako je zrejmé z obrázkov 4A a 4C, hmotnostné spektrá získané po CIEF separácii sú menej ostré ako referenčné spektrá s priamym injektovaním, ale aj napriek tomu sú viditeľné charakteristické znaky obidvoch proteínov. Obrázok 5A znázorňuje TIC záznam lyzozýmu s myoglobínom po izoelektrickej fokusácii. Uvedený záznam taktiež dokazuje rušivý vplyv amfolytov, nakoľko dekonvoluované hmotnostné spektrá oboch proteínov (obrázky 5B a 5C) síce vykazujú typické znaky referenčných hmotnostných spektier, píky sú však viac rozštiepené.

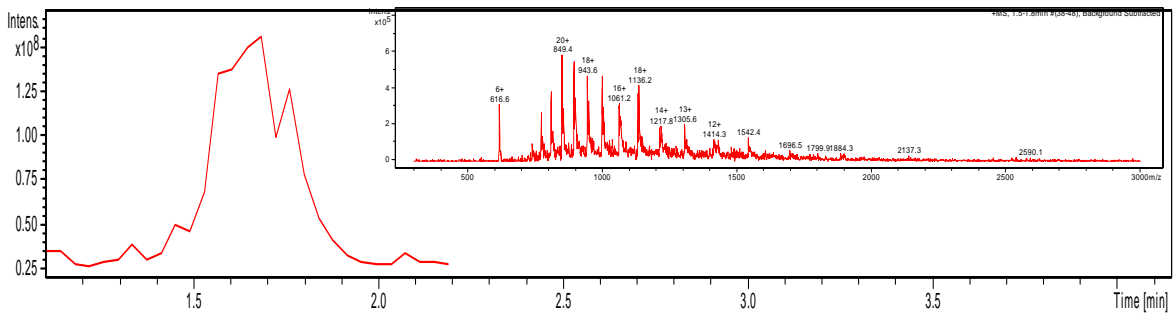
Doposiaľ dosiahnuté výsledky jasne poukazujú na fakt, že on-line spojenie zatiaľ nie je rutinne používanou technikou, nakoľko CE stupeň má určité nedokonalosti. Ako už bolo spomenuté, nosné amfolyty majú veľmi často za následok potlačenie ionizácie proteínov. Hoci sú nevyhnutné z hľadiska dosiahnutia úspešnej samotnej CIEF separácie, na druhej strane ale silne, väčšinou negatívne ovplyvňujú následnú MS detekciu.



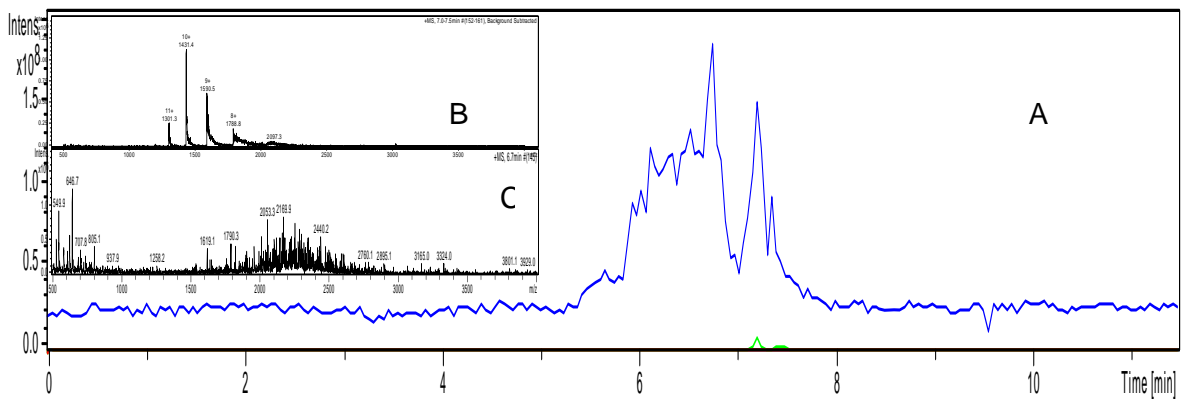
Obr. 1 TIC záznam a hmotnostné spektrum po dekonvolúcii štandardu lyzozýmu



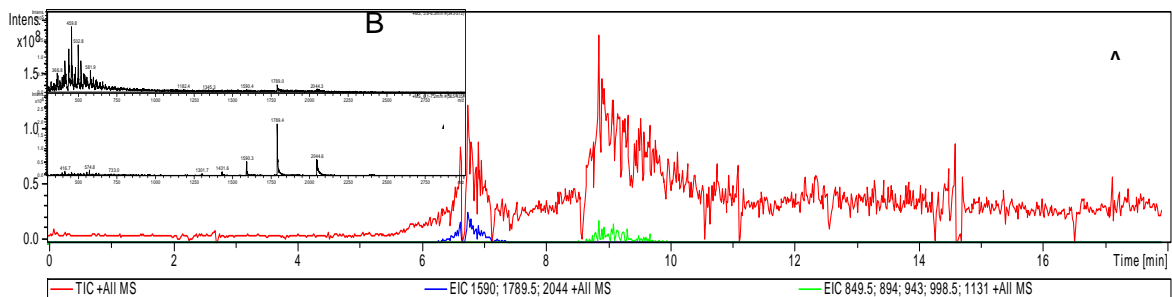
Obr.2 TIC záznam a hmotnostné spektrum po dekonvolúcii štandardu transferínu



Obr.3 TIC záznam a hmotnostné spektrum po dekonvolúcii štandardu myoglobínu



Obr. 4 TIC záznam z CEIEF zmesi štandardu lyzozýmu a transferínu (A), hmotnostné spektrá po dekonvolúcii B – lyzozým, C – transferín



Obr. 5 TIC záznam CEIEF zmesi lyzozýmu a myoglobínu (A), hmotnostné spektrá po dekonvolúcii B – myoglobín, C – Lyzozým

Záver

Predložená práca bola zameraná na vývoj nových analytických prístupov na analýzu a identifikáciu proteínov prítomných v komplexných biologických maticiach s využitím elektroforetických a hmotnostne-spektrometrických metód. Úspešnosť CIEF ako predseparačnej techniky pred samotnou MS analýzou sa potvrdila, aj keď separačný systém zatiaľ nebol optimalizovaný. V budúcnosti sa plánuje optimalizácia celého separačného systému za účelom dosiahnutia čo najlepšej separácie pomocou CIEF.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla za finančnej podpory Agentúry na podporu výskumu a vývoja (projekt VVCE-0070-07 a projekt APVV-0583-11), grantu VEGA 1/1305/12 a grantu Univerzity Komenského v Bratislave (UK/435/2012).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Govorukhina N. I., et al. (2003) J. Chromatogr. A. 1009(1-2), p. 171
- [2] Kilár, F., Végvári Á., Mód, A. (1998) J. Chromatogr. A. 813(2), p. 349
- [3] Armenta Blanco, J. M. (2006) Capillary Electrophoresis of Proteins with Selective On-line Affinity Monoliths (Dissertation thesis) Department of Chemistry and Biochemistry, Brigham Young University, p. 27
- [4] Nesbitt, Ch. A., Zhang, H., Yeung, K. K.C. (2008) Anal. Chim. Acta 327 (1), p. 3
- [5] Tang, Q., Harrata, A. K., Lee, C. S. (1997) Anal. Chem., 69(1), p. 3177

Rapid determination of ^{90}Sr in urine samples using AnaLig[®] Sr-01

Ján Bilohuščin, Silvia Dulanská, Veronika Gardoňová

*Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra jadrovej chémie a rádioekológie,
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; jbilohuscin@gmail.com*

Abstract

This work describes the use of IBC's AnaLig[®] Sr-01 molecular recognition technology product to effectively and selectively pre-concentrate, separate and recover strontium from urine samples. This method uses two-stage columns separation consisting of two different commercial products Eichrom's Pre-filter Material and AnaLig[®] Sr-01 column from IBC Advanced Technologies. This method does not involve co-precipitation of strontium as phosphates and oxalates from urine samples. The new rapid method separates strontium-90 with high chemical recovery.

Keywords: *Urine analysis; Bioassay; Pre-concentration; Strontium-90.*

Introduction and goal

Chemical elements present in various biological matrices can be basically grouped into three categories: major elements consisting of carbon, hydrogen, nitrogen, and oxygen; minor elements comprising calcium, chlorine, magnesium, phosphorous, potassium, and sodium; and trace elements encompassing the remainder [1]. Elements such as uranium, thorium, transuranics and fission products released from nuclear reactors form a group called radioactive contaminants. Radionuclides can gain access to the interior of the body by ingestion, inhalation, through wounds or by absorption through skin [2]. The fate of the radionuclides in the body is governed by the following factors: permeability, ligand exchange, transport, assimilation, storage, excretion [1].

Soluble materials such as $^{137}\text{CsCl}$, $^{90}\text{SrCl}_2$ are quickly absorbed into the blood stream. Factors that can influence the in-vivo solubility of an internally deposited radionuclide include its elemental chemistry, chemical form, surface area, and specific activity. Bioassay is the determination of the kind, quantity, location, and/or retention of radionuclides in the body. Bioassay methods are used to estimate the body-burden of radionuclides and their distribution among different organs due to internal radiation exposure. The two main types of bioassay measurements are: In-vivo measurements (Whole Body Counting) and In-vitro measurements (Analysis of Urine, feces, blood, breath etc.).

The average daily excretion of urine for normal adult is ~ 1400 ml (normal range is 600 - 2000 ml). Urine analyses can be used to assess the performance of the radiation

protection control practices. The separation methods used for estimation of radionuclides in urine are often time consuming and of lower sensitivity. The determination of low levels of actinides and strontium in biological samples require lengthy and tedious chemical processes, which include pre-concentration of samples, radiochemical separation and source preparation. In recent years, many studies have applied extraction chromatography to radionuclide isolation from urine samples [3-7].

The procedure described by Alvarez and Navaro [8] notably improves conventional methods, especially concerning the time needed. The combination of anion-exchange chromatography and Eichrom extraction-chromatography columns (for americium and strontium separation) allows sequential isolation of these radionuclides in the same sample. Maxwell and col. describes [9] the use of calcium phosphate precipitation to pre-concentrate actinides and ^{90}Sr in NRIP 2006 urine and water samples, but in 2007 a new rapid column separation method was applied directly to the NRIP 2007 emergency urine sample, with only minimal sample preparation to reduce preparation time [10]. The raw urine was acidified and passed directly through the stacked resin columns containing TEVA+ TRU + Sr-Resins to separate the actinides and ^{90}Sr from the NRIP urine sample more quickly. This approach works well for small volume of urine samples (20 ml) which are expected during an emergency response event. Monitoring of internal contamination of nuclear power plants' employees is necessary because of the performance of radiation protection principles, which are ordered by laws of Slovak Republic and emerge from international recommendations (ICRP, IAEA) [11].

Our published papers describe the use of IBC's AnaLig[®] Sr01 molecular recognition technology product to effectively and selectively pre-concentrate, separate and recover strontium from radioactive waste samples [12-14]. The goal of our work was to test using of AnaLig[®] Sr01 gel for strontium separation from urine matrix.

Materials and Methods

The resins employed in this work: AnaLig[®] Sr01 gel (60–100 mesh) was supplied by IBC Advanced Technologies, Inc and Eichrom's Pre-filter (100-150 μm particle size) material available from Eichrom Technologies, Inc. All other chemicals used were commonly available analytical grade acids and chemicals.

Urine samples used in this work were from healthy adult donors collected by the Department of Nuclear Chemistry (Comenius University). Tracer solution of ^{85}Sr was added to each analyzed urine sample.

The preparation of urine samples requires a concentration step before radiochemical separation. Acidity of urine sample, before strontium separation, was adjusted with nitric acid (65%) to give a final concentration approximately 2M. First we tested the separation of strontium on AnaLig[®]Sr-01 with different volumes of analyzed urine samples. Efficiency of separation was monitored by using ⁸⁵Sr tracer (514 keV). The urine samples were loaded on 1.5 g of AnaLig[®]Sr-01 column (long 15cm and 1.5cm wide). Each column was washed with 2x 20 ml of 1M HNO₃, 2ml of deionized water and then Sr was eluted with 20 ml of 0.05M Na₄EDTA [12-14].

Eichrom's Pre-filter Material is an uncoated, inert polymeric support and can be used to remove trace amounts of organic compounds from aqueous solutions [15]. An Eichrom's Pre-filter Material was used to remove organics from the urine sample. First we loaded acidified urine samples onto 3 g of Pre-filter Material. The 20 ml columns with 3 g Pre-filter Material were conditioned with 10 ml of 2M HNO₃. Acidified urine samples (in 2M HNO₃) were loaded onto the Pre-filter Material column at the flow rate approximately 3-5 ml.min⁻¹. After passing through the Pre-filter Material column urine samples were loaded onto AnaLig[®]Sr-01 column (1.5g AnaLig[®]Sr-01, column - long 15cm and 1.5cm wide) conditioned with 10 ml of 2M HNO₃. Each column was washed with 2x 20 ml of 2M HNO₃ and 5 ml of deionized water. Strontium was eluted with 20 ml of 0.05 M Na₄EDTA (or 0.05M EDTA pH=9-10) [12]. Final fractions were measured on an HPGE detector for ⁸⁵Sr recoveries at 514 keV line.

Results and Discussion

In our previous works [12-14] we used AnaLig[®]Sr-01 product to effectively and selectively pre-concentrate, separate and recover strontium from radioactive waste samples. In this work we tried to use this molecular recognition product for effective separation of strontium from urine samples. The main goal of this work was to test the feasibility of using AnaLig[®] Sr-01 gel for analysis of ⁹⁰Sr in urine samples. Urine samples were processed and analyzed as described above in the experimental part of this paper.

First we tested separation of ⁹⁰Sr only on AnaLig[®]Sr-01. After acidification of urine sample with HNO₃, the urine color changed from yellow to black. The AnaLig[®]Sr-01 column after passing of the sample remained black as well. The first results (see Table 1) showed that ⁸⁵Sr recoveries were only 50 - 88%, for the different volumes of urine samples (50 ml, 75 ml, 100 ml and 150 ml). The reason for the low ⁸⁵Sr recovery could be presence of organic

compounds in urine. We decided to use Eichrom's Pre-filter material before the separation of strontium on AnaLig[®]Sr-01.

Table 1 Recoveries (%) of ⁸⁵Sr in urine sample obtained by AnaLig[®]Sr-01method

No. of sample	1	2	3	4
V of samples (ml)	50	75	100	150
R(⁸⁵ Sr) ± U (%)	88.1 ± 4.1	66.0 ± 3.6	60.2 ± 3.1	52.2 ± 2.8

For experiments with Pre-filter Material we used different volumes of urine samples (25 ml – 500 ml) and the same conditions were maintained. After passing through Pre-filter Material column, color of urine samples changed back to yellow (organic compounds were retained on the column). These urine samples were next loaded onto AnaLig[®]Sr-01 column. The results showed that chemical recoveries were from 60 - 100% (Table 2), what could be now considered as good separation with good recovery.

Table 2 Recoveries (%) of ⁸⁵Sr in urine samples obtained by Eichrom's Pre-Filter Material and AnaLig[®]Sr-01method

Volume of urine sample (ml)	R(⁸⁵ Sr) ± U (%)
25	100.0 ± 5.0
50	100.0 ± 5.0
100	93.2 ± 4.7
120	94.0 ± 4.8
160	84.1 ± 4.2
200	84.3 ± 4.6
300	74.1 ± 3.8
400	74.3 ± 3.9
500	60.2 ± 3.1

All biological samples are also subject to deterioration by bacteriological action that may interfere with subsequent analysis. In many dosimetry evaluations, the quantity of radioactive material excreted per 24 hours is required and is obtained by collecting a 24-hour urine sample. When samples are kept longer than one day, they should be refrigerated, acidified to minimize precipitation, or have a preservative added to prevent bacterial growth. Similarly, the monitoring of ⁹⁰Sr internal contamination of employees in NPP Jaslovske Bohunice requires that urine has to be collected during 24 hours, start and end sampling date

and time is recorded. For the analysis is 25 ml of urine from collected sample taken and strontium-90 is determined by using Sulkowitch reagent [11].

Determination of ^{90}Sr using AnaLig[®]Sr-01 can be used for collected 24 hour urine samples as well. Aliquot of sample (100–250 ml) was taken, acidified and analyzed as is described above in the experimental part of this paper in the procedure for Pre-filter Material and AnaLig[®]Sr-01. Strontium samples were counted repeatedly by Cerenkov counting over a two-week period to monitor the ingrowth of ^{90}Y on TRI CARB 2900 TR (PerkinElmer). The results present minimum detectable activities (MDA) for ^{90}Sr achieved with this procedure about 0.12 Bq/l. MDA was calculated using the Currie calculation [16].

Conclusion

We used different commercial products AnaLig[®]Sr-01 and Eichrom's Pre-filter Material for determination of ^{90}Sr in urine samples. By eliminating the calcium phosphate or oxalate precipitation and the ashing steps to remove residual organics, the analysis time was reduced significantly. Time of ^{90}Sr separation was approximately 2.5-3.0 hour for 500 ml of urine sample. AnaLig[®] Sr-01 method allows fast and efficient separation of strontium-90.

The new method for urine analysis developed in the laboratory of Nuclear Chemistry of Comenius University (Slovakia) is a rapid and efficient method for the analysis of ^{90}Sr suitable for internal contamination monitoring in NPP Jaslovské Bohunice.

References

- [1] Venketesh Iyengar, G. (1989) *Elemental Analysis of Biological Systems: Biomedical, environmental, compositional, and methodological aspects of trace elements* Vol. 1., CRC Press Inc., Boca Raton, USA, p. 4
- [2] *Use of Bioassay Procedures for Assessment of Internal Radionuclide Deposition* (1987)., NCRP Report No.87, Bethesda, Maryland, p.62
- [3] Horwitz E.P., Dietz M.L., Nelson D.M., et al. (1990) *Analyt. Chim. Acta*, p. 238.
- [4] Dietz M.L., Horwitz E.P., (1991) *Hlth Phys.* 61, p. 871
- [5] Harduin J.C., Peleau B., Piechowski J. (1993) *Radioprot* 28, p. 291
- [6] Horwitz E.P. (1993) *Analyt. Chim. Acta* 281, p. 361
- [7] Prasad M.V.R., Surya Narayana D.S., Jeevanram R.K., Sundararajan A.R. (1991) *Review of literature on Bioassay Methods for Estimating Radionuclides in Urine*, Indira Gandhi Centre for Atomic Research, Mumbai, India, p. 22

- [8] Alvarez A., Navaro N. (1996) Appl. Radiat. Isot. 47(9/10), p. 869
- [9] Maxwell III S. L., Culligan B. K., (2009) J. Radioanal. Nucl. Chem. 279, p. 105
- [10] Maxwell S. L, (2008) J. Radioanal. Nucl. Chem 275, p. 497
- [11] Čajkovičová A. (2012) Monitorovanie vnútorného ožiarenia pracovníkov jadrovej elektrárne rádioaktívnymi nuklidmi – trícium, stronciom-90 a plutóniom-239. (Rigorózna práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p. 38
- [12] Dulanska S., Remenec B., Matel L., et al. (2011) J Radioanal Nucl Chem 288, p. 705
- [13] Remenec B., Dulanská S., Paučová V., et al (2011) J Radioanal Nucl Chem 290, p. 403
- [14] Ometáková J., Dulanská S., Mátel L., et al. (2011) J Radioanal Nucl Chem 290(2), p. 319
- [15] Eichrom Industries Inc., [Accessed: 02 May 2012].
<<http://www.eichrom.com/products/info/prefilter.cfm>>.
- [16] Currie L.L. (1968) Analyt. Chem. 40, p. 586

Rezonančný prenos energie v systémoch vrstevnatý kremičitan/kyanínové farbivá

Peter Boháč¹, Adriana Czímerová¹, Juraj Bujdák¹

¹ Ústav anorganickej chémie SAV, Dúbravská cesta č. 9, 845 36 Bratislava, Slovenská republika

Abstrakt

Resonance energy transfer (RET) is of high interest for both the basic research and practical applications. It is a phenomenon of radiationless transmission of energy between donor and acceptor molecules. In this study single- and two-step (RET) was investigated between cyanine dye cations (NK1, NK2, NK3) in colloids of layered silicate, saponite. In these systems the molecules played role of the energy donors (NK1) or energy acceptors (NK2, NK3) or both (NK2). The adsorption and formation of various types of dye species was studied using visible spectroscopy. The absorption spectroscopy did not detect any significant molecular aggregation of the dyes at the surface of saponite particles. Both the single- and two-step RET were detected in saponite dispersion. Effects of various parameters on the efficiency of the RET process, such as dye concentrations, saponite properties the distances between co-adsorbed dye cations were found to be essential.

KLúčové slová: Rezonančný prenos energie; vrstevnaté kremičitany; kyanínové farbivá.

Úvod

Hybridné materiály na báze organických farbív a vrstevnatých materiálov, napríklad smektitov, predstavujú veľmi zaujímavé materiály s perspektívou ich využitia vo fotochémií [1 – 3]. Výnimočnosť smektitov vyplýva z ich fyzikálnych a chemických vlastností, ako sú vysoký merný povrch, schopnosť výmeny iónov, napučovanie, sorpčné a katalytické vlastnosti. Základnú štruktúrnú jednotku smektitov tvorí vrstva, ktorá pozostáva z dvoch nepretržitých sietí tetraédrov, medzi ktorými je sendvičovo uložená jedna nekonečná sieť oktaédrov [4]. V dôsledku neekvivalentných substitúcií centrálnych atómov v polyédroch vzniká nábojová nevyváženosť, ktorá vedie k celkovému zápornému náboju vrstiev. Záporný náboj kompenzujú hydratované katióny, ktoré vyplňajú priestor medzi vrstvami.

Záporný náboj vrstiev spolu so schopnosťou výmeny katiónov a napučovaním sú kľúčovými parametrami, ktoré ovplyvňujú interakcie s rôznymi organickými katiónmi [4]. Adsorpcia katiónových farbív na povrchu ílových minerálov prebieha mechanizmom iónovej výmeny. Okrem príťažlivých elektrostatických síl adsorpciu ovplyvňuje aj molekulová agregácia farbív, čo sa odzrkadľuje na významných zmenách optických vlastností farbív [5].

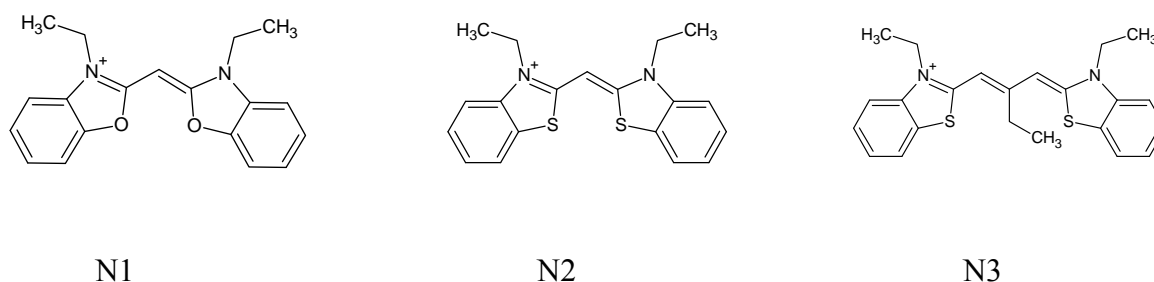
Interkalácia alebo ko-adsorpcia dvoch, resp. troch rôznych katiónových farbív vedie ku komplexným zmenám vlastností sústavy. V prípade, že dve rôzne molekuly farbiva sú v dostatočnej vzdialenosti, môže po excitácii jednej z nich nastať rezonančný prenos energie (RET) [6]. V takomto systéme jedna molekula farbiva vystupuje ako donor a druhá ako

akceptor energie. Ak sa v blízkosti donora nenachádza vhodný akceptor energie, elektróny sa vracajú späť pomocou radiačného alebo ne-radiačného procesu na základnú energetickú hladinu [7]. Prenos energie vedie k zníženiu emisie a redukcii dób života excitovaných stavov molekúl donora, ako aj a k zvýšeniu emisie molekúl akceptora [6].

Hlavným cieľom práce bolo štúdium jedno-, resp. dvojstupňového prenosu energie medzi tromi kyanínovými farbivami na povrchu koloidných častíc syntetického saponitu. Práca nadväzuje na skoršie práce, najmä na dvojstupňový prenos energie realizovaný v sústave tenkého filmu smektitu s interkalovanými laserovými farbivami [8].

Materiál a metódy

V tejto práci bol použitý syntetický saponit Sumecton Kunimine Ind. Co (Sum) s kationóvymennou kapacitou (KVK) $0.87 \pm 0.05 \text{ mmol g}^{-1}$ [10]. Ako kationové farbivá boli použité farbivá zo skupiny kyanínov, NK 863 (označenie: N1), NK 88 (označenie: N2) a NK 737 (označenie: N3) čistoty 99 % od fi. Sigma Aldrich, ktorých molekulová štruktúra je zobrazená na obr. 1. Smektit ani kyanínové farbivá neboli pred použitím upravované.



Obr. 1 Molekulová štruktúra farbív N1, N2, N3.

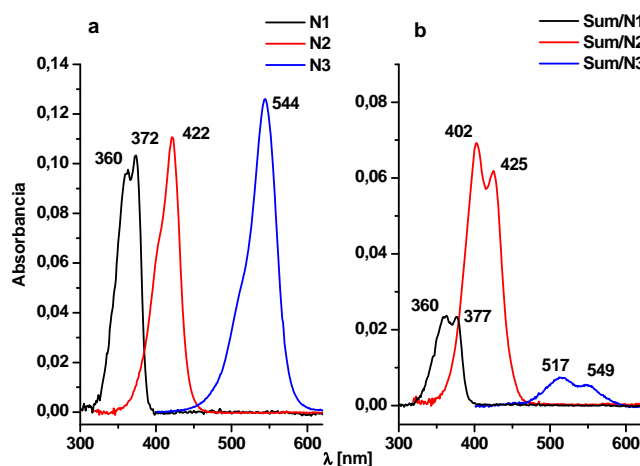
Zmiešaním zložiek sa získala finálna koncentrácia farbív $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ v koloide saponitu a pomer zložiek 0.05 mmol.g^{-1} . Takto boli pripravené koloidné systémy s jedným (Sum/N1, Sum/N2, Sum/N3), dvomi, (Sum/N12, Sum/N13 a Sum/N23) a tromi farbivami (Sum/N123).

Absorpčné spektrá všetkých pripravených systémov boli namerané na spektrofotometri Varian, (CARY 100). Emisné spektrá koloidných systémov boli namerané na fluorescenčnom spektrofotometri FluoroLog (Horiba, Jobin Yvon). Exitácia pri vlnovej dĺžke 370 nm bola vybraná pre selektívnu exitáciu N1 kationov.

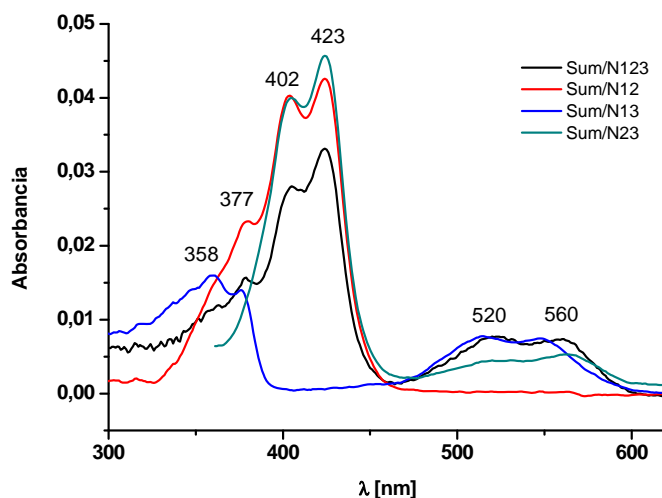
Výsledky a diskusia

Absorpčné spektrá kyanínových farbív v disperzii saponitu

Na obr. 2 sú znázornené absorpčné spektrá roztokov a koloidov sústav kyanínových farbív. Zmeny na absorpčných spektrách v prítomnosti Sum (Obr. 2b) oproti roztokom v etanole (Obr. 2a) nastali v prípadoch farbív N2 a N3. Pás prislúchajúci monomérom N2 pri 425 nm sa znížil a došlo k zvýšeniu pásu prislúchajúceho dimérom pri 402 nm. Podobná zmena nastala aj v prípade farbiva N3. Zmeny sú pravdepodobne dôsledkom molekulovej agregácie farbív v koloidných sústavách [11]. Dimerizácia N2 a N3 bola dokázaná aj v dvoj- a trojzložkových sústavách (Obr. 3). Podľa nameraných absorpčných spektier možno konštatovať, že vo všetkých koloidných systémoch agregácia farbív bola nízka.

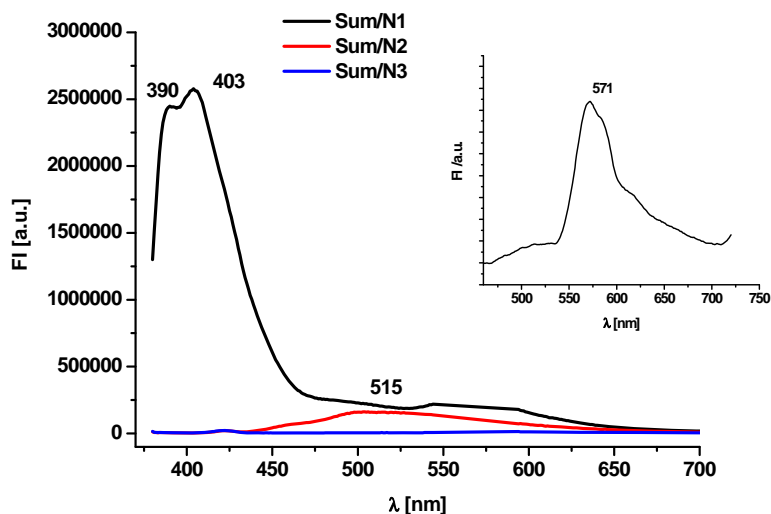


Obr. 2 Absorpčné spektrá farbív N1, N2, N3 vo vode (a) a v disperzii Sum (b) namerané 1 minútu po pridaní farbiva.



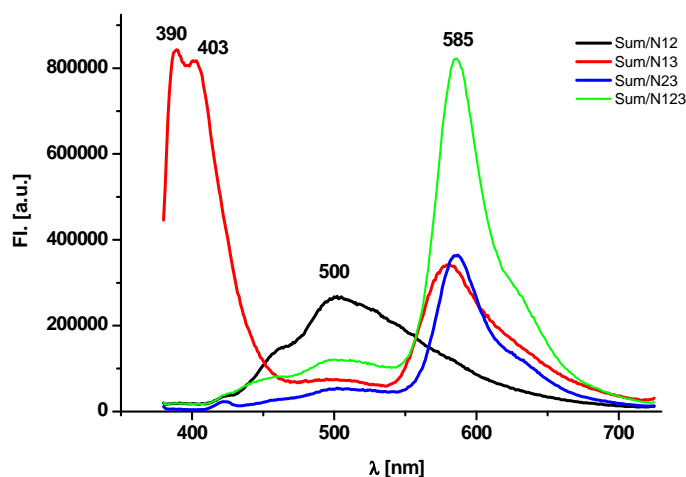
Obr.3 Absorpčné spektrá zmiešaných systémov skladajúcich sa z N1, N2, N3 v disperzii Sum.

Fluorescenčné spektrá kyanínových farbív v disperzii saponitu



Obr. 4 Emisné spektrá kationových farbív N1 (čierna krivka), N2 (červená krivka) a N3 modrá krivka) v disperzii Sum. Excitácia pri 370 nm. Vo vnútri obrázku je vložené emisné spektrum farbiva N3 v disperzii Sum po excitácii 450 nm.

Na obr. 4 sú znázornené emisné spektrá jednoduchých sústav kationových farbív v disperzii Sum. Emisné spektrá boli merané po excitácii, ktorá je selektívna pre N1 (370 nm). Nepatrná emisia bola zaznamenaná v sústave N2/Sum a takmer žiadna v sústave N3/Sum. (Obr. 4). Vo vloženom obrázku je znázornené emisné spektrum tohto systému po excitácii 450 nm s výraznou emisiou pri maxime 571 nm.



Obr.5 Emisné spektrá zmiešaných systémov skladajúcich sa z farbív N1, N2 resp. N3 v disperzii Sum.

Emisné spektrá disperzií Sum, ktoré obsahujú dve farbivá sú znázornené na Obr. 5. Pre N13/Sum sme zaznamenali dva výrazné emisné pásy, rozštiepený pás pri 390 a 403 nm, prislúchajúci monomérom farbiva N1 a menej intenzívny pás pri 585 nm monomérov N3.

Prekryv emisného spektra donora a absorpčného spektra akceptora energie je v prípade farbív N1 a N3 relatívne malý. Iná situácia nastala v emisných spektrách sústav N12/Sum a N23/Sum. Pozoroval sa prenos energie a emisia z molekúl akceptorov energie: N2, resp. N3.

Na obr. 5 je aj emisné spektrum sústavy N123/Sum. Pozorovali sa veľmi málo intenzívne pásy N1 a N2 približne pri 450 a 500 nm. Emisia bola významne zvýšená pre farbivo N3 pri 585 nm. Táto zmena dokazuje prenos energie z molekúl N1 cez N2 až na molekuly farbiva N3. V dôsledku prenosu energie dochádzalo k výraznému zníženiu až k vymiznutiu fluorescenčnej emisie molekúl N1 ako aj N2.

Záver

V tejto štúdií sme sa venovali rezonančnému prenosu energie troch kyanínových farbív v koloidoch saponitu. Absorpčná spektroskopia potvrdila len nízku agregáciu farbív. Fluorescenčnou spektroskopiou bol dokázaný rezonančný prenos energie v koloidoch Sum tak v prípade sústav s dvomi farbivami ako aj dvojstupňový proces v prípade sústav s tromi farbivami. Prenos energie v koloidných sústavách nastáva v dôsledku koncentrácie molekúl farbív na povrchu častíc smektitu a prekryvu emisného spektra donora a absorpčného spektra akceptora energie.

Pod'akovanie:

Táto práca vznikla na základe podpory projektov zo slovenskej grantovej agentúry Vega (2/0107/3) a APVV (0291-11). Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt „Centrum pre materiály, vrstvy a systémy pre aplikácie a chemické procesy v extrémnych podmienkach – Etapa II“ ITMS 26240120021, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Schulz-Ekloff G., Wöhrle G., Van Duffel B., et al. (2002) Micropore. Mesopor. Mater. 51, p.91
- [2] Sanchez C., Lebeau B., Chaput F., et al. (2003) Adv. Mater. 15(23), p.1969
- [3] Sanchez C., Julian B., Belleville P., et al. (2005) J. Mater. Chem. 15(35/36), p. 3559
- [4] Mermut A.R. (1994) Layer Charge Characteristics of 2:1 Silicate Clay Minerals CMS Workshop Lectures. The Clay Minerals Society, Boulder, Colorado, p. 48
- [5] Bujdák J., Iyi N., Fujita T. (2002) Clay Miner. 37(1), p. 121

- [6] Lakowicz J.R. (1983) Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press, New York, USA, p. 446
- [7] Selvin P.R. (2000) Nat. Struct. Biol. 7(9), p. 730
- [8] Bujdák J., Czímerová A., López Arbeloa F. J. (2011) Colloid Interface Sci. 364(2), p. 497
- [9] BioTek [Citované: 16. 2. 2013]
<http://www.biotek.com/resources/articles/fluorescence-resonance-energy-transfer.html>
- [10] Czímerová A., Bujdák J., Dohrmann R. (2006) Appl. Clay Sci. 34(1-4), p. 2
- [11] Czímerová A., Iyi N., Bujdák J. (2008) J. Colloid Interface Sci. 320(1), p. 140
- [12] Sasai R., Iyi N., Fujita T., et al. (2004) Langmuir. 20(11), p. 4715
- [13] Czímerová A., Bujdák J., Iyi N. (2007) J. Photochem. Photobiol., A .187(2-3), p. 160

Extrakcia využívajúca micely pre selektívnu separáciu a nakoncentrovanie antimónu(III) z prírodných vôd pred jeho stanovením metódou atómovej absorpčnej spektrometrie s elektrotermickou atomizáciou

Katarína Boriová, Ingrid Hagarová

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Ústav laboratórneho výskumu geomateriálov, Mlynská dolina G, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
katarina.boriova@gmail.com*

Abstrakt

In this work, preconcentration methodology utilizing the cloud point phenomenon is described for the selective determination of ultratrace Sb(III) by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). The method employs the formation of Sb(III) complex with ammonium pyrolydinedithiocarbamate (APDC), which is subsequently entrapped in the micelles of the non-ionic surfactant Triton X-114. The surfactant micelles, after their dilution to an acidified methanolic solution, are injected into the electrothermal atomizer. All experimental parameters were studied systematically to achieve a maximal preconcentration factor for Sb(III). Total inorganic antimony (Sb(III)+Sb(V)) was determined after reduction of Sb(V) to Sb(III) with L-cysteine. The accuracy of the optimized method was checked by the certified reference material (CRM) for trace elements in lake water TMDA-61. Finally, the method was applied to the analysis of natural water samples.

KLúčové slová: extrakcia s využitím teploty zákalu micelárnych roztokov; antimón; ETAAS; vody

Úvod a formulácia cieľa

V prírodných vodách sa antimón nachádza na (ultra)stopových úrovniach predovšetkým vo forme dvoch anorganických oxyaniónov ako antimoničnan Sb(V) a antimonitan Sb(III) [1, 2, 3]. Stanovenie (ultra)stopových koncentrácií týchto anorganických foriem vyžaduje spojenie separačno-prekoncentračného postupu s vhodne zvolenou detekčnou metódou. Často využívané sú spojenia vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) s atómovou absorpčnou spektrometriou s technikou generovania hydridov (HG-AAS), atómovou fluorescenčnou spektrometriou s technikou generovania hydridov (HG-AFS), atómovou emisnou spektrometriou s indukčne viazanou plazmou (ICP-AES) alebo hmotnostnou spektrometriou s indukčne viazanou plazmou (ICP-MS) [3]. Časová náročnosť a vysoké operačné náklady väčšiny uvedených spojení vedú k snahám navrhnúť účinné a jednoduché separačno-prekoncentračné postupy v kombinácii s dostupnou detekčnou metódou využívanou v mnohých laboratóriách. K takýmto detekčným metódam patrí atómová absorpčná spektrometria s elektrotermickou atomizáciou (ETAAS). Zo separačných metód zaznamenáva v poslednom období značné využitie pri separácii kovov extrakcia s využitím teploty zákalu micelárnych roztokov (CPE) [4].

Cieľom tejto práce je vypracovať CPE postup na selektívnu separáciu a

prekoncentráciu Sb(III) pred jeho stanovením metódou ETAAS v prírodných vodách. Pri CPE separácii a prekoncentracii Sb(III) je prvým krokom vytvorenie vhodného hydrofóbného komplexu sledovaného analytu, ktorý je následne zachytený v hydrofóbnom jadre micely [4, 5]. Aby došlo ku kvantitatívnej separácii a boli dosiahnuté vysoké prekoncentračné faktory pre nasledujúce stanovenie, je nutné zvoliť pre vypracovávaný postup vhodné chelatačné činidlo a tenzid, a následne optimalizovať všetky experimentálne parametre (koncentráciu chelatačného činidla a tenzidu, pH roztoku, teplotu a čas inkubácie, separáciu fáz, ako aj výber činidla a jeho koncentrácie na riedenie tenzidom obohatenej fázy).

Materiál a metódy

Na stanovenie antimónu bol použitý atómový absorpčný spektrometer Perkin-Elmer 3030 (Überlingen, Nemecko) s elektrotermickým atomizátorom HGA 600 v spojení s automatickým podávačom vzoriek AS-70. Pre korekciu pozadia bol použitý korektor pozadia využívajúci Zeemanov jav. Ako ochranný plyn bol použitý argón s prietokom 250 ml/min pri všetkých krokoch teplotného programu, okrem atomizácie (v tomto kroku bol prietok argónu 0 ml/min). Merania boli robené na pyrolytických grafitových kvetách firmy Perkin-Elmer. Dávkované objemy vzoriek boli 20 μ l, dávkované objemy modifikátora Pd(NO₃)₂ boli 10 μ l. Pre vyhodnotenie boli použité plochy pík. Ako zdroj žiarenia bola použitá EDL výbojka pre Sb (Perkin-Elmer) pracujúca pri 8 W. Zvolená vlnová dĺžka bola 217,6 nm a šírka štrbiny bola 0,7 nm. Po optimalizácii teplotného programu boli nastavené nasledovné teploty: sušenie pri 110 °C, pyrolýza pri 1200 °C, atomizácia pri 2500 °C a čistenie pri 2550 °C.

Termostatovaný vodný kúpeľ VL-12 (Kavalier, Sázava, Česká republika), mechanická trepačka LT2 (Kavalier, Sázava, Česká republika), analytické váhy Sartorius 1702 (Göttingen, Nemecko), pH meter MS-31 (Praha, Česká republika) a centrifúga MPW-360 (Mechanika precyzyjna, Varšava, Poľsko) boli použité pri extrakčných postupoch a príprave vzoriek.

Všetky použité chemikálie boli čistoty p.a. Všetky roztoky boli pripravované v deionizovanej vode. Neiónový tenzid Triton X-114 (TX-114), chelatačné činidlo pyrolidín ditiokarbamát amónny (APDC), vínan antimonito draselný a hexahydroxy antimoničan draselný boli od firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemecko). Kyselina dusičná a hydroxid sodný použité na úpravu pH modelových roztokov a vzoriek boli od firmy Merck (Darmstadt, Nemecko). Všetky pripravené zásobné roztoky boli uskladnené v polyetylénových nádobách pri teplote 4 °C. Dusičnan paládnatý (s koncentráciou Pd 10 g/l) (Merck) bol po vhodnom

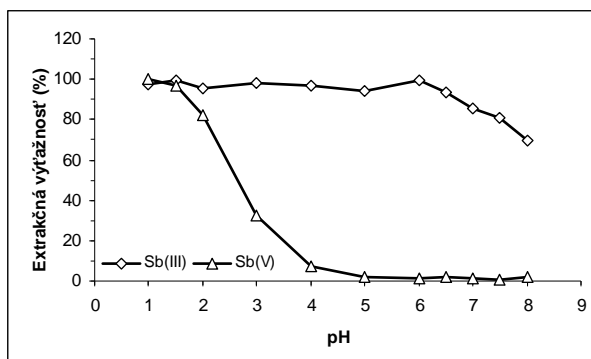
nariedení 0,2 % (v/v) HNO₃ použitý ako chemický modifikátor. Metanol (Merck) bol použitý na prípravu riediaceho činidla pre tenzidom obohatenú fázu. Certifikovaný referenčný materiál (CRM) pre stopové prvky v jazernej vode TMDA-61 (Water Research Institute, Burlington, Kanada) bol použitý na kontrolu spoľahlivosti navrhnutého extrakčného postupu.

Vody z domácich studní odobraté v Komárne (V1-V5) boli použité ako reálne vzorky pre selektívne stanovenie Sb(III). Vzorky boli filtrované ihneď po odbere a použité pre vypracovaný CPE postup v ten istý deň.

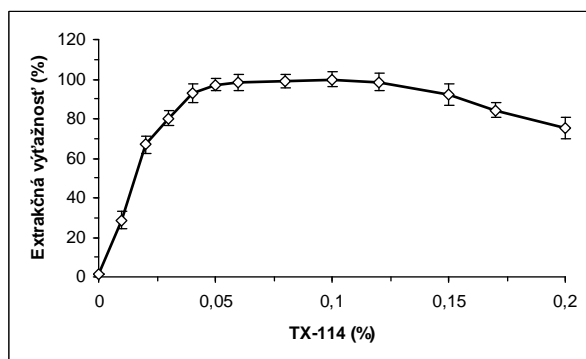
Výsledky a diskusia

Princíp CPE spočíva v pridaní tenzidu k vodnému roztoku (pričom jeho koncentrácia musí byť vyššia ako kritická micelárna koncentrácia, aby dochádzalo k vzniku miciel) a následnom zahriatí nad určitú teplotu (ktorá je charakteristická pre každý tenzid). Takýto roztok sa stáva zakaleným v dôsledku preskupenia micelotvorných zložiek a vzniku ďalšej fázy. Jedna fáza tzv. tenzidom obohatená, obsahuje hydrofóbne a nepolárne zlúčeniny zachytené v nepolárnych jadrách miciel a druhá tzv. vodná fáza, obsahuje tenzid s koncentráciou blízkou kritickej micelárnej koncentrácii. V prípade kovov, ktoré sú v roztokoch prítomné najčastejšie vo svojich iónových formách je prvým krokom pri využití CPE postupu vytvorenie vhodného hydrofóbného komplexu sledovaného kovu, ktorý môže byť následne zachytený v hydrofóbnom jadre micely. V našom prípade sme použili ako chelatačné činidlo APDC a ako extrakčné činidlo neiónový tenzid TX-114. Urýchlenie fázovej separácie možno doceliť centrifugáciou. Pre dokonalejšiu separáciu tenzidom obohatenej fázy (pohybuje sa v stovkách mikrolitrov) od vodnej fázy je výhodné zvýšiť jej viskozitu. Vhodné je použiť ľadový kúpeľ. Nasleduje odstránenie vodnej fázy, najčastejšie dekantáciou. Pre optimálne dávkovanie tenzidom obohatenej fázy do zvoleného detektora je potrebné použiť vhodné činidlo na riedenie tejto vysoko viskózneho fázy.

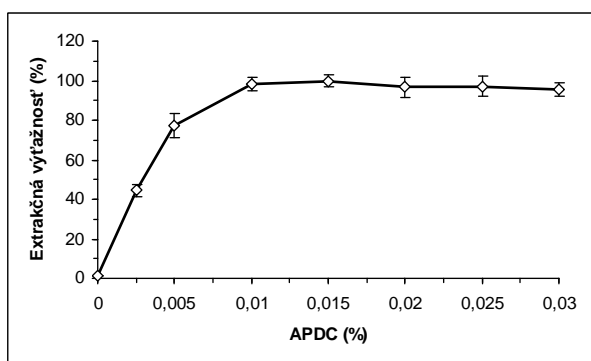
Z nameraných závislostí uvedených na Obr. 1-8 boli zvolené nasledujúce experimentálne podmienky pre selektívnu separáciu a nakoncentrovanie Sb(III). Optimálne pH: $5,5 \pm 0,1$ (Obr. 1), optimálna koncentrácia neiónového tenzidu TX-114: 0,08 % (Obr. 2), optimálna koncentrácia chelatačného činidla APDC: 0,02 % (Obr. 3), inkubačná teplota potrebná na vytvorenie zákalu: 45 °C (Obr. 4), čas inkubácie: 5 min (Obr. 5), čas centrifugácie (pri 4000 rpm): 5 min (Obr. 6), koncentrácia NaCl: 0 % (Obr. 7) a koncentrácia HNO₃ v metanole: 0,2 mol/l (Obr. 8). Zvýšenie viskozity tenzidom obohatenej fázy bolo robené v ľadovom kúpeli po dobu 10 min. Vodná fáza bola odstránená dekantáciou.



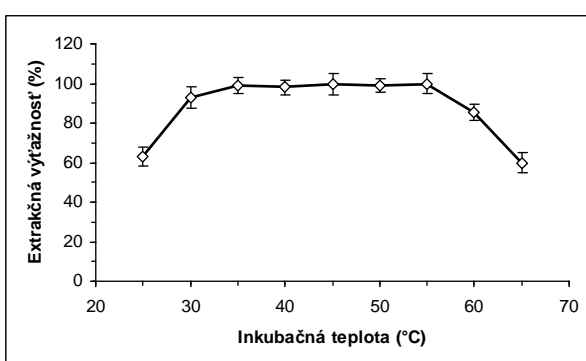
Obr. 1 Vplyv pH na extrakciu Sb(III) a Sb(V)
Sb(III)



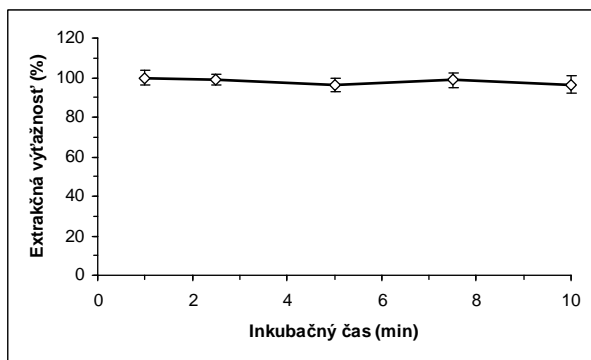
Obr. 2 Vplyv koncentrácie TX-114 na extrakciu



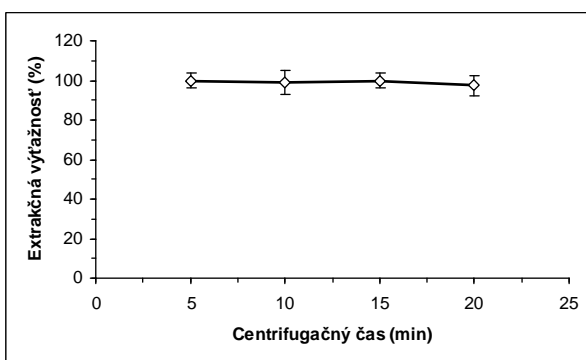
Obr. 3 Vplyv koncentrácie APDC na extrakciu Sb(III)
Sb(III)



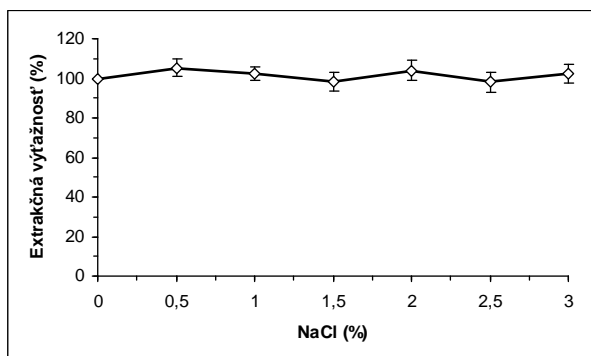
Obr. 4 Vplyv inkubačnej teploty na extrakciu



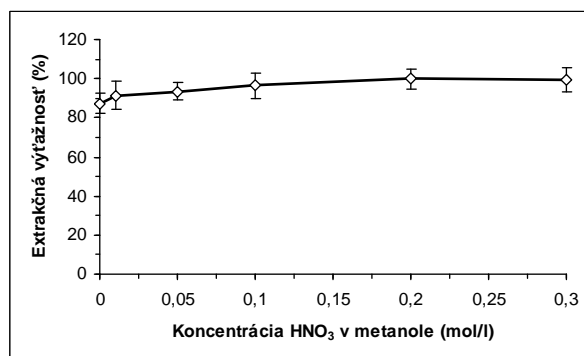
Obr. 5 Vplyv času inkubácie na extrakciu Sb(III)



Obr. 6 Vplyv času centrifugácie na extrakciu Sb(III)



Obr. 7 Vplyv koncentrácie NaCl na extrakciu Sb(III)



Obr. 8 Vplyv metanolickej HNO₃ na extrakciu Sb(III)

Zoptimalizovaný CPE postup bol použitý na selektívne stanovenie Sb(III) vo vzorkách vôd (V1-V5) z domácich studní z Komárna. Získané výsledky sú uvedené v Tab. 1. Po pridaní 0,50 µg/l Sb(III) k týmto vzorkám boli vypočítané extrakčné výťažnosti, ktoré sa pohybovali v rozmedzí 92 – 107 %. Spoľahlivosť navrhnutého postupu bola overená analýzou certifikovaného referenčného materiálu (CRM) pre stopové prvky v jazernej vode (TMDA-61). Uvedený CRM sa nariadil 30-násobne a následne sa použil CPE postup s prekoncentračným faktorom 28. Sb(III) sa stanovoval po redukcii Sb(V) na Sb(III) s použitím L-cysteínu [5, 6]. Extrakčná výťažnosť bola 94 %.

Tab. 1 Selektívne stanovenie Sb(III) vo vzorkách vôd s využitím CPE postupu

Označenie	Stanovený Sb(III) ± SD (µg/l)	Stanovený* Sb(tot) ± SD (µg/l)	Sb(III)/Sb(tot) (%)
V1	0,27 ± 0,04	3,11 ± 0,05	8,7
V2	0,23 ± 0,02	2,88 ± 0,04	8,0
V3	0,18 ± 0,03	2,56 ± 0,03	7,0
V4	0,21 ± 0,03	2,18 ± 0,05	9,6
V5	0,16 ± 0,02	1,78 ± 0,03	9,0

*koncentrácie celkového Sb(tot) boli stanovené po redukcii Sb(V) na Sb(III)

Záver

Napriek súčasným poznatkom o negatívnych účinkoch antimónu a jeho zlúčenín na živé organizmy, doposiaľ sú uzákonené maximálne hraničné koncentrácie iba pre celkový antimón v pitných vodách. Radou Európskeho spoločenstva Európskej únie je to 5 µg/l [7]. Stále nové štúdie dokazujúce rozdielnu mieru toxických účinkov jednotlivých zlúčenín antimónu budú podľa všetkého viesť k snahám o uzákonenie limitných koncentrácií pre rozdielne formy tohto analytu. V takomto prípade bude nevyhnutné používanie validovaných

postupov vhodných pre stanovenie jeho rôznych foriem. Použitie účinných separačno-prekoncentračných postupov v spojení so selektívnou, citlivou a dostupnou detekčnou metódou môže napomôcť pri vypracovávaní týchto postupov. Jednou z možností je aj spojenie zoptimalizovaných CPE postupov s ETAAS detekciou, kde potreba veľmi malých injekčných objemov vzoriek (najčastejšie 20 μ l) je veľkou výhodou (keďže objemy tenzidom obohatenej fázy aj po nariadení činidlom vhodným pre injektovanie do detektora predstavujú stovky mikrolitrov a umožňujú niekoľkonásobné opakovanie analýzy).

V analyzovaných vzorkách boli zistené zvýšené koncentrácie antimónu, avšak ani v jednej vzorke nebola prekročená uvedená hraničná koncentrácia. Pri zisťovaní percentuálneho zastúpenia Sb(III) v porovnaní s celkovou koncentráciou antimónu, ani v jednej z analyzovaných vzoriek koncentrácia Sb(III) neprekročila 10 %.

Pod'akovanie

Táto práca vznikla v rámci riešenia projektu, ktorý je finančne podporovaný grantom Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR a Slovenskej akadémie vied VEGA 1/0274/13 a Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy APVV-0344-11.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Merian E. (1991) *Metals and Their Compounds in the Environment*. VCH, Weinheim, Germany, p. 743
- [2] Filella M., Belzile N., Chen Y. W. (2002) *Earth Sci. Rev.* 57(1-2), p.125
- [3] Hagarová I., Kubová J. (2008) *Chem. Listy* 102(9), p. 782
- [4] Ojeda C. B., Rojas F. S. (2012) *Microchim. Acta* 177(1-2), p. 1
- [5] Hagarová I., Kubová J., Matúš P., et al. (2008) *Acta Chim. Slov.* 55(3), p. 528
- [6] Feng Y. L., Narasaki H., Chen H. Y., et al. (1999) *Anal. Chim. Acta* 386(3), p. 297
- [7] Council of the European Union (1998) Council Directive 98/83/EC on the Quality of Water Intended for Human Consumption

Nové možnosti optimalizace v analytické chemii

Miroslava Bursová, Markéta Krejčová, Hana Dejmková, Radomír Čabala

*Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Hlavova 8,
128 43 Praha 2, Česká republika, bursova.mirka@seznam.cz*

Abstrakt

The goal of the work is practical demonstration of response surface methodology (RSM) applied for simultaneous optimization of resolution and analysis time of separation of a group of aromatic amines in reverse phase liquid chromatography. The aim of RSM is finding of a polynomial model equation, which describes the dependence of the defined response on the selected experimental factors. Chromatographic response function (CRF), a multi-criteria decision making method, was selected as the response [1]. The experimental factors studied were pH, initial percentage of methanol in mobile phase and gradient of methanol. Box-Behnken design was used to map the CRF surface and the calculated function was fitted to a polynomial equation. The optimal conditions for separation of aromatic amines were found as follows: pH 2.5, initial percentage of methanol 20 % and the gradient of methanol 2%.

Klíčová slova: *RSM-response surface methodology; CRF-chromatography response function; HPLC UV*

Úvod

Cílem práce je ukázka praktického použití multifaktorových statistických metod k nalezení optimálních separačních podmínek metody RP-HPLC s UV detekcí. Zkoumanými analyty byla skupina deseti aromatických aminů.

Pojem optimalizace se ve vědecké oblasti používá ve významu zjištění podmínek měření, ve kterých bude použita metoda podávat co nejlepší možné výsledky. Nejčastěji užívaným způsobem je tzv. OFAT (one-factor-at-a-time) [2], kdy je v průběhu optimalizace měněn pouze jeden faktor, např. teplota a ostatní zůstávají konstantní. Při tomto pojetí nelze zjistit možné vzájemné interakce mezi jednotlivými zkoumanými faktory. OFAT postupem nelze odhadnout, který z faktorů má na výslednou odpověď největší vliv. OFAT metoda se ukázala pro větší počet faktorů jako neefektivní a drahý způsob optimalizace. Proto se v posledních letech začaly používat statistické postupy souhrnně nazývané DOE (design of experiment) či RSM (response surface methodology) [2]. Tyto metody jsou založeny na plánu experimentů složeného z kombinací hodnot zkoumaných faktorů. Výsledkem měření je zjištění statisticky významných faktorů, jejich případné vzájemné interakce a nastavení optimálního nastavení. Tohoto cíle je dosaženo s co nejmenším počtem nutných pokusů.

Na začátku celého postupu RSM je třeba stanovit cíl měření - zvolit vhodné faktory (např. čas, objem, tlak, pH) a zkoumanou odpověď (např. plocha píku). Obecně lze multifaktorové statistické postupy rozdělit na tři základní kroky [3]:

1. **Screening** je založen na výběru faktorů a zjištění jejich vlivu na zkoumanou odpověď.
2. **Modelování.** Zjištěné významné faktory jsou použity k vytvoření matematického modelu, který popisuje závislost zkoumané odpovědi na experimentálních faktorech.
3. **Optimalizace.** Získaný matematický model je použit k nastavení faktorů, ve kterých lze dosáhnout optimálních podmínek měření.

Materiál a metody

Chemikálie a rozpouštědla

Anilin (99,5 %), o-toluidin (99 %), 2- ethylanilin (98 %), 2- nitroanilin (98 %), 1- aminonaftalen (99 %), 2- aminonaftalen (99 %), 2- aminobifenyl (97 %), 4- aminobifenyl, 2- aminofluoren (98 %) a 2- aminoantracen (96 %), (všechny, Aldrich, Německo) byly použity jako analyty. Zásobní roztoky analytů (1 mg mL^{-1}) byly připraveny v acetonitrilu (Chromasolve, $\geq 99,9 \%$, Sigma Aldrich). Všechny zásobní roztoky byly uchovávány při teplotě $-18 \text{ }^\circ\text{C}$.

Mobilní fáze pro HPLC separaci obsahovala methanol (LiChrosolv®, Merck) a acetátový pufr (příprava: rozpuštění $0,05 \text{ M}$ kyseliny octové a $0,05 \text{ M}$ kyseliny fosforečné, pH bylo upraveno pomocí $0,1 \text{ M}$ hydroxidu sodného). Všechny chemikálie pro přípravu pufru byly zakoupeny od firmy Lach-Ner, ČR.

Instrumentace

HPLC měření byla prováděna za použití vysokotlaké pumpy Beta 10 (Ecom, Czech Republic), dávkovače se smyčkou o objemu 20μ a spektrofotometrického detektoru Sapphire (Ecom, Czech Republic). Jako stacionární fáze byla použita kolona LiChroCART® 250-4 Lichrospher® RP-18, $100 (5 \mu\text{m})$, Merck). K záznamu a vyhodnocení dat byl použit program Clarity 2.3 (DataApex, Czech Republic). Vlnová délka UV detekce byla nastavena na 235 nm . Pokusy byly prováděny podle uvedeného plánu měření (Tab. 2). Optimální podmínky HPLC separace: jako mobilní fáze byla použita směs pufru (rozpouštědlo A) a methanolu (rozpouštědlo B) o pH $2,5$ při průtoku $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Počáteční podíl methanolu v mobilní fázi byl 20% a byl během měření zvyšován o 2% za min až dosáhl 90% . Po ukončení separace byla kolona, pro návrat podílu methanolu v mobilní fázi na počáteční hodnotu, promývána po dobu 10 min . Koncentrace směsi analytů v mobilní fázi byla $10 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Software

Pro vytvoření a vyhodnocení plánu experimentů, 3D grafů a matematické rovnice byl použit statistický program Minitab 16 (Minitab Inc., USA).

Výsledky a diskuze

Výběr odpovědi a faktorů

Cílem práce je praktické použití statistických metod RSM pro nalezení optimálního separačních podmínek pro skupinu aromatických aminů metodou HPLC s UV detekcí.

Jako zkoumaná odpověď byla vybrána funkce chromatografické odpovědi (CRF, chromatographic response function) [4]. Její princip je založen na nalezení takového nastavení jednotlivých faktorů, aby byly jednotlivé analyty dostatečně rozlišeny v přijatelném čase. CRF funkce kombinuje obě hledané odpovědi, tj. rozlišení a čas analýzy. Pro výpočet CRF funkce existuje několik různých vzorců [5] jako např.:

$$CRF = \sum_{i=1}^L R_i + L^{w_1} - w_2 |T_A - T_L| - w_3 (T_1 - T_0) \quad [1]$$

R...rozlišení mezi dvěma sousedními píky, L...počet píků v chromatogramu, T_A ...maximální přijatelný čas, T_L ...retenční čas posledního píku, T_1 ...retenční čas prvního píku, T_0 ...minimální retenční čas prvního píku, w_1, w_2, w_3 ...vybrané vážené parametry pro analýzu

Pro výpočet CRF funkce pro skupinu aromatických aminů byl použit složitější postup, který je uveden v článku [1].

Jako zkoumané faktory byly vybrány pH, počáteční podíl methanolu v mobilní fázi (%) a gradient methanolu ($\% \cdot \text{min}^{-1}$). Faktory a jejich úrovně jsou uvedeny v Tab. 1.

Z důvodu malého počtu zkoumaných faktorů nebyl použit k optimalizaci screening.

Tab. 1 Faktory a jejich úrovně pro Box-Behnken design

	Faktor	Nižší (-1)	Centrální (0)	Vyšší (+1)
A	pH	6,5	4,5	2,5
B	Počáteční podíl methanolu v mobilní fázi (%)	70	45	20
C	Gradient methanolu ($\% \cdot \text{min}^{-1}$)	0	1	2

Modelování

Pro účel modelování byla zvolena metoda Box-Behnken designu [6]. Tento design je založen na plánu měření (Tab. 2), který je tvořen kombinacemi zkoumaných faktorů (Tab. 1). Plán experimentů a vyhodnocení bylo provedeno pomocí statistického programu Minitab 16.

Po provedení příslušných měření, byly naměřené hodnoty zpracovány ANOVA testy. Výsledkem je matematická rovnice, která vyjadřuje vliv statisticky významných faktorů či jejich interakcí na CRF odpověď.

$$y = 0,01 + 0,07 \cdot B + 0,10 \cdot C + 0,13 \cdot B^2 + 0,11 \cdot C^2 + 0,09 \cdot B \cdot C \quad [\text{II}]$$

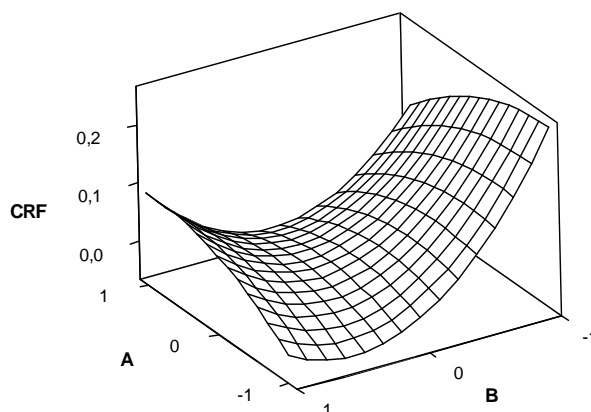
y...odpověď, B...počáteční podíl methanolu v mobilní fázi, C...gradient methanolu

Z výsledků ANOVA testů bylo zjištěno, že faktor pH a jeho interakce nejsou statisticky významné, proto nebyly do matematické rovnice zahrnuty.

Pomocí statistického programu byly vytvořeny 3D grafy, které rovněž zobrazují závislosti jednotlivých faktorů na CRF (Obr. 1).

Tab. 2 Box-Behnken design-plán měření

Měření	pH	Obsah methanolu (%)	Gradient (% min ⁻¹)	CRF
1	2,5	45	0	0,000
2	4,5	70	0	0,285
3	6,5	20	1	0,000
4	4,5	45	1	0,014
5	2,5	20	1	0,038
6	4,5	45	1	0,013
7	4,5	45	1	0,014
8	4,5	70	2	0,330
9	4,5	20	0	0,000
10	6,5	70	1	0,304
11	2,5	70	1	0,103
12	2,5	45	2	0,243
13	6,5	45	2	0,128
14	6,5	45	0	0,000
15	4,5	20	2	0,406

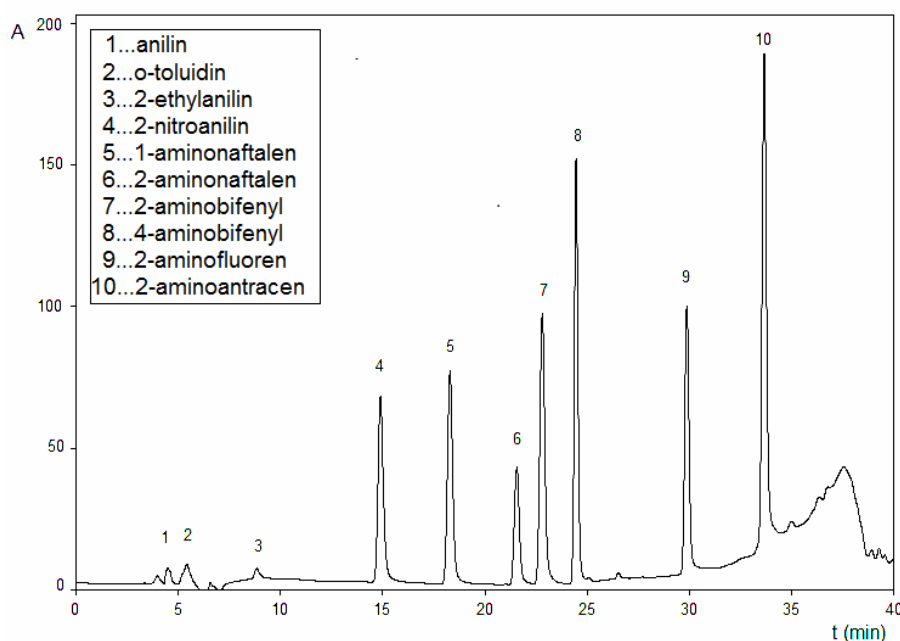


Obr. 1 Graf 3D zobrazující závislost funkce chromatografické odpovědi (CRF) na A... pH a B... počáteční podíl methanolu (%), je-li C... gradient 1%·min⁻¹.

Optimalizace

Posledním krokem optimalizace je zjištění hodnot jednotlivých faktorů, aby hodnota CRF byla maximální. K tomuto účelu slouží funkce desirability [7].

Optimální podmínky separace byly zjištěny jako: počáteční podíl methanolu v mobilní fázi 20 %, gradient methanolu 2 % min⁻¹ a pH mobilní fáze 2,5. Analýza za optimálních podmínek trvala 36 min (Obr. 2).



Obr. 2 Chromatogram aromatických aminů za optimálních podmínek. Kolona LiChroCART[®] 250-4 Lichrospher[®] RP-18, 100 (5 μm), dávkováno 20 μL roztoku směsi v mobilní fázi o c=10 μg ml⁻¹, mobilní fáze methanol-pufr o pH 2,5, počáteční podíl methanolu v mobilní fázi 20 %, gradient 2% min⁻¹ až dosáhl 90 %, průtok 0,5 ml min⁻¹, UV detekce při 235 nm.

Závěr

Použití statistických postupů v analytické chemii se stává v posledních letech téměř nezbytným požadavkem. Pomocí statistických programů a postupů je možné předem odhadnout potřebné náklady a dobu optimalizace. Oproti OFAT je možné zjistit velké množství informací z malého, ale účelného počtu měření.

Poděkování

Autoři děkují Grantové Agentuře Univerzity Karlovy v Praze (GA UK 21210), Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, projektu MSM 0021620857 a SVV 2012-265201.

Seznam použité literatury

- [1] Hadjmohammadi, M., Sharifi, V. (2012) *J. Chromatogr. B* 880, p. 34.
- [2] Ryan, T. P. (2007) *Modern Experimental Design*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, p. 386.
- [3] Costa N. R., Pereira Z. L. (2010) *J. Chemometrics* 24, p. 333.
- [4] Berridge, J. C. (1982) *J. Chromatography* 244, p. 1.
- [5] Siouffi, A. M., Phan-Tan-Luu, R. (2000) *J. Chromatogr. A* 892, p. 75.
- [6] Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira et al. (2008) *Talanta* 76, p. 965.
- [7] Mason, R. L., Gunst, R. F., Hess, J. L. (2003) *Statistical design and analysis of experiment*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, p. 250.

Návrh a syntéza derivátov bitiazolou určených pre organické tranzistory n-typu

Luboš Cehlárik, Peter Magdolen

Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie, Mlynská dolina CH2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; luboscehlarik@gmail.com

Abstrakt

Bithiazole units with trifluoromethyl and trifluoromethylphenyl groups are the major candidates for organic field-effect transistors. We have designed and prepared a basic bithiazol derivative **3** with trifluoromethylphenyl groups. Furthermore, we proposed bithiazol units bridged by sulphur, phosphorus and nitrogen. We have prepared sulphur bridged derivative **4**.

Kľúčové slová: „organic field-effect“ tranzistor; organická elektronika

Úvod a formulácia cieľa

Tranzistory riadené elektrickým poľom (*Organic Field-Effect Transistor* - OFET) sú zariadenia, ktoré pozostávajú z organickej polovodičovej vrstvy, izolačnej vrstvy a troch elektród (emitorová, kolektorová a riadiaca). Nie sú to iba základné stavebné bloky pre sľubnú generáciu lacných a flexibilných organických integrovaných obvodov, ale taktiež poskytujú dôležité informácie o prenose náboja π -konjugovaných systémov. Sú dôležité pre výskum vzťahov medzi štruktúrou a vlastnosťami π -konjugovaných systémov, ako je elektrónová mobilita, prahové napätie a elektrický prúd aplikovaný na organický polovodič. OFET majú uplatnenie v rádiových zariadeniach, flexibilných displejoch, senzoch, atď. [1]

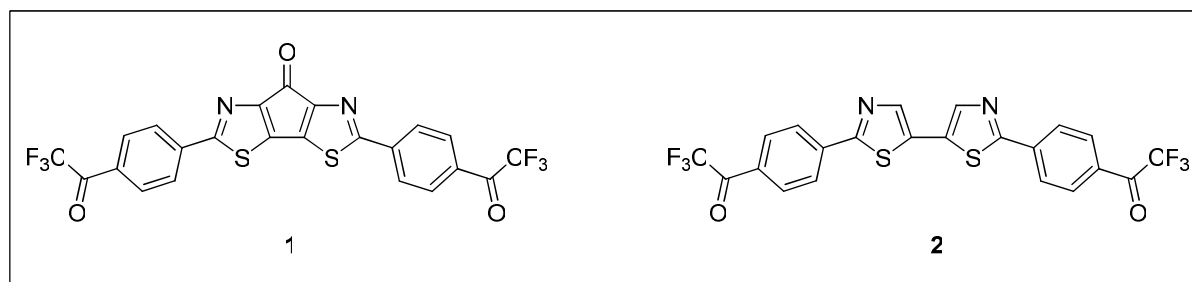
Nevyhnutným predpokladom riešenia stanovenej úlohy bolo získať ucelený prehľad o štruktúre, vlastnostiach a aplikácii organických polovodičových zlúčenín n-typu, ktoré sa majú využiť v optoelektronike ako tranzistory riadené elektrickým poľom. Na základe získaných poznatkov o uvedených zlúčeninách navrhujeme také organické molekuly, ktoré by vykazovali lepšie optoelektronické vlastnosti (HOMO vs. LUMO energia, elektrónová mobilita, morfológia tenkého filmu), ako aj lepšiu stabilitu na vzduchu. Následne sa nami navrhnuté štruktúry podrobia kvantovochemickým výpočtom pomocou DFT metód, aby sme overili vhodnosť použitia týchto zlúčenín pre aplikáciu v optoelektronike. Najdôležitejšou súčasťou projektu je príprava samotných látok ako aj ich následné testovanie s cieľom získať OFET charakteristiky.

Materiál a metódy

^1H a ^{13}C NMR spektrá boli merané v CDCl_3 a DMSO na prístrojoch Varian Gemini (600 a 150.8 MHz, 300 a 75 MHz). Chemické posuny sú udané v ppm, ako vnútorný štandard bol používaný tetrametylsilán (TMS). Priebeh reakcií sme sledovali TLC analýzou (Merck Silica gel 60 F₂₅₄), na vizualizáciu sa používala UV lampka 254 nm a pary jódu. Na FLC sa používal silikagél Merck 60 (40 – 63 μm). Teploty topenia boli namerané na Koflerovom aparáte. Infračervené spektrá boli merané na prístroji FT-IR ThermoNicolet iS10. Všetky použité rozpúšťadlá boli sušené pomocou Na/benzofenón. Komerčne dostupné zlúčeniny boli zakúpené od Sigma-Aldrich bez následnej purifikácie.

Výsledky a diskusia

Ie a kol. [2] publikovali v roku 2010 prípravu a optoelektronické charakteristiky karbonylom premostených bitiazolových derivátov určených pre n-typ *organic field-effect* tranzistory. (Obr. 1)



Obr. 1 Bitiazolové deriváty určené pre aplikáciu OFET.

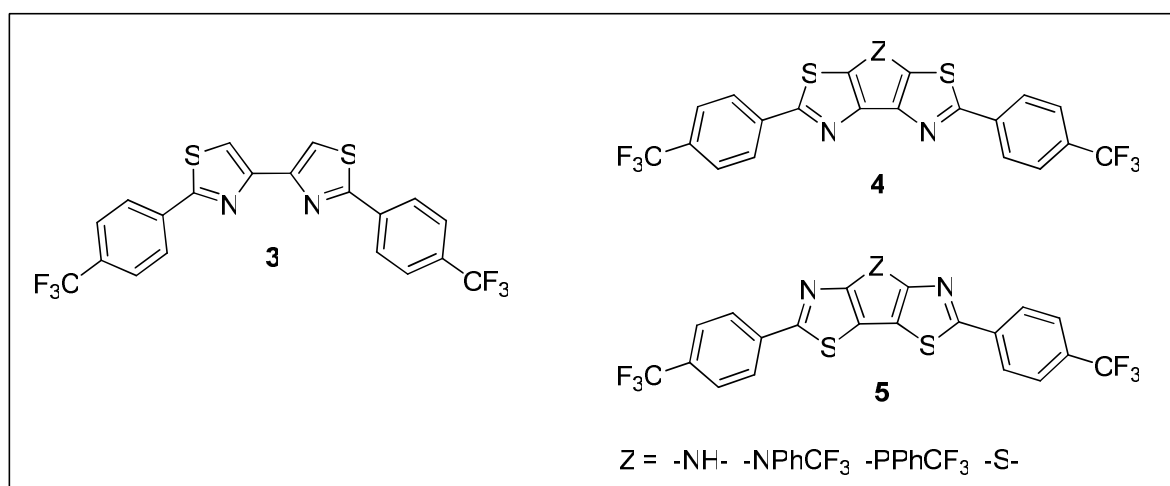
Merania cyklickou voltametrou dokázali, že karbonylom premostená zlúčenina **1** má nižšiu hodnotu energie LUMO orbitálu (-3,73 eV) voči derivátu bitiazolu **2** (-3,10 eV), čo má priamy vplyv na usporiadanie OFET experimentov. Kryštalografickou analýzou sa ďalej zistilo, že látka **1** má planárnu geometriu, čo napomáha lepšiemu elektrónovému transportu. Elektrónová mobilita bola vyššia ako 0,06 $\text{cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ pri maximálnom napätí 20 V za vákuua. Najdôležitejšie je, že hodnoty elektrónovej mobility sa zachovávali aj v prostredí vonkajšej atmosféry, čo umožňuje ďalej rozvíjať novú kategóriu polovodičových materiálov n-typu. (Tab. 1)

Tab. 1. OFET charakteristiky.

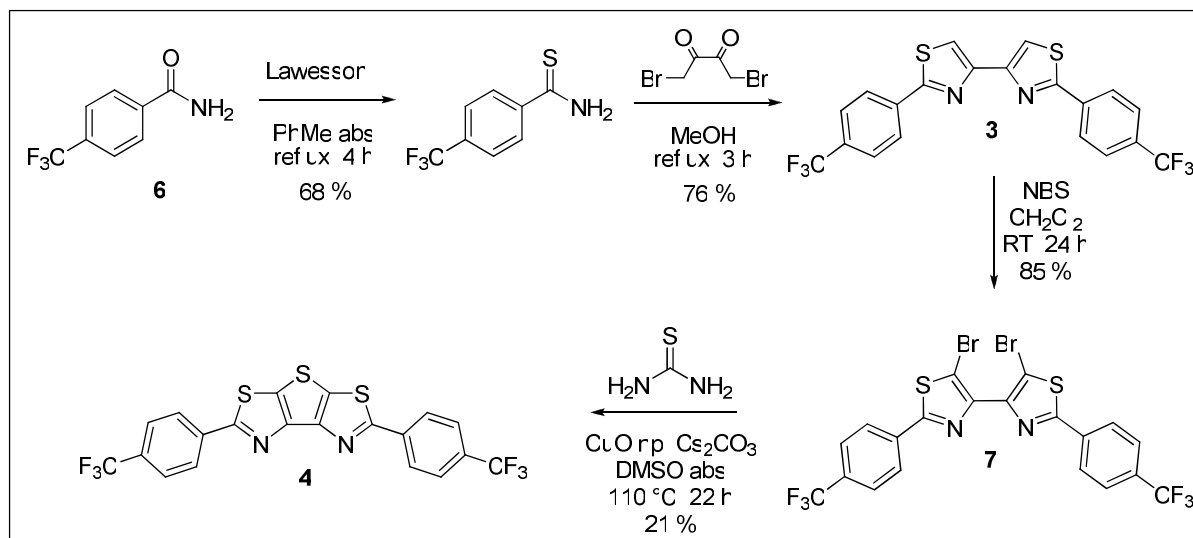
Látka	I_{on} / I_{off}	Podmienky	Mobilita (cm^2/Vs)	V [V]
1(a)	10^6	vákuum	0,06	20
1(b)	10^3	vákuum	0,03	33
1(b)	10^4	vzduch	0,014	44
1(b)	10^6	vzduch	0,013 / 24 h	68
1(b)	10	vzduch	$6,1 \times 10^{-5}$ / rok	61
1(b)	10^5	vákuum	$4,6 \times 10^{-3}$ / rok	73
2(a)	10^4	vákuum	$7,1 \times 10^{-4}$	15
2(b)	10^4	vákuum	$2,0 \times 10^{-3}$	57
2(b)	-	vzduch	no FET	-

(a) „Bottom contact“ geometria. (b) „Top-contact“ geometria

Na základe vyššie uvedených faktov sme sa rozhodli navrhnúť organické molekuly, ktoré by vykazovali FET charakteristiky n-typu, pričom by malo ísť o stabilné heterocyklické zlúčeniny obsahujúce bitiazolové skelety, ktoré by sme chceli premostiť atómom síry, dusíka alebo fosforu a tým planarizovať výslednú molekulu a zlepšiť elektrónový transport. (Obr. 2)

**Obr. 2** Návrh derivátov bitiazolu premosteného atómami dusíka, fosforu a síry.

Pre tiazolové deriváty sme sa rozhodli aj na základe ich dobrých elektrónakceptorných vlastností, chemickej stability, ako aj dobre realizovateľnej syntézy. (Obr. 3) Okrem iného je pre nás zaujímavý fakt, že zvyšovanie počtu tiazolových jadier zlepšuje elektrónový transfer. Trifluórmetyllová a trifluórmetylfenylová skupina patrí taktiež medzi výborné elektrónakceptorné funkčné skupiny [3], ktoré umožňujú znižovanie energie LUMO orbitálu, čo má za následok lepší prenos elektrónu z emitorovej elektródy cez organickú molekulu na kolektorovú elektródu. Na základe uvedeného faktu sme sa rozhodli tieto funkčné skupiny použiť pri navrhovaní molekúl určených pre tranzistory n-typu.



Obr. 3 Syntéza derivátu 3 a sírou premosteného bitiazolu 4.

Pri syntéze základného nepremosteného derivátu 3, určeného pre tranzistory riadené poľom, sme vychádzali z komerčne dostupného amidu 6, z ktorého sme pomocou Lawessonového činidla pripravili príslušný tioamid v 68 % výťažku. Jeho následnou cyklizáciou s 1,4-dibróm-2,3-butadiónom sme pripravili cieľovú zlúčeninu 3 v 76 % výťažku. Bromáciou s NBS v CH_2Cl_2 a následnou „cross-coupling“ reakciou derivátu 7 s tiomočovinou a katalytickým množstvom CuO np sme pripravili ďalšiu cieľovú zlúčeninu 4 určenú pre merania OFET charakteristík.

Počiatkové merania derivátu 4 pomocou cyklickej voltametrie stanovili energiu pre LUMO orbitál na úrovni -3,76 eV, čo je porovnateľná hodnota so známymi organickými molekulami určenými pre tranzistory riadené elektrickým poľom. [4]

Záver

Na základe poznatkov z literatúry sme navrhli bitiazolové deriváty 3, 4 a 5. Nepremostený bitiazol 3 sme pripravili v 85 % výťažku. Sírou premostený bitiazol 4 sme pripravili v 21 % výťažku. Optimalizáciou reakčných podmienok sa nám nepodarilo zlepšiť výťažok reakcie. Oba pripravené deriváty sú určené na meranie OFET charakteristík. Ďalšie deriváty sa pokúsime pripraviť v nasledujúcom období.

Pod'akovanie

Autori ďakujú za finančnú podporu Vedeckej grantovej agentúre Ministerstva školstva SR, Grant Univerzity Komenského UK/456/2013.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Wang Ch., Dong H., Hu W., et al. (2012) Chem. Rev. 112, p. 2208
- [2] Ie Y., Nitani M., Karakawa M., et al. (2010) Adv. Funct. Mater. 20, p. 907
- [3] Ando S., Murakami R., Nishida J., et al. (2005) J. Am. Chem. Soc. 127, p. 14996
- [4] Lin Y., Fan H., Li Y., et al. (2012) Adv. Mater. 24, p. 3087

Lineárne benzobistiazolové soli a od nich odvodené konjugované deriváty s nelineárno optickými vlastnosťami

Alexandra Čibová, Peter Magdolen, Pavol Zahradník

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká Fakulta, Katedra organickej chémie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; cibovaa@fns.uniba.sk

Abstract

Heterocyclic *push-pull* systems based on benzobisthiazole moiety represent a new type of organic nonlinear chromophores. In an effort to enhance electron affinity of the heterocyclic core we prepared and spectroscopically characterized new bis-quaternised azolium salts with D- π -A- π -D architecture. The azolium cycle represents the strong acceptor part of the molecule and the dimethylamino- and diphenylamino-substituted benzene rings represent the donor part at the opposite side. Based on previous research we are expecting improvement in nonlinear and fluorescent properties.

KLúčové slová: benzobistiazolové soli; nelineárno optické vlastnosti; *push-pull*; kvarternizácia.

Úvod a formulácia cieľa

Organické *push-pull* štruktúry so zaujímavými nelineárno-optickými (NLO) vlastnosťami sa dostávajú do popredia ako nízko nákladová alternatíva anorganických materiálov. Konjugované systémy s donorno-akceptornou architektúrou umožňujú výrobu variabilných organických poľom riadených tranzistorov [1] (OFET), organických svetlo emitujúcich diód [2] (OLED), uplatnenie nachádzajú v moderných telekomunikáciách alebo pri aplikácii v pamäťových a informačných médiách a solárnych článkoch.

Štruktúra účinných chromofórov s NLO vlastnosťami predstavuje spojenie silných donorných a akceptorných substituentov cez koncové pozície π -konjugovaného mostíka. Výsledná polarizácia molekuly je ovplyvnená výberom vhodných substituentov a modifikáciou dĺžky konjugovaného systému. Je známe, že náhrada benzénového mostíka za ľahšie konjugovateľné 5-článkové heterocykly (napríklad tiazol) poskytuje efektívnejšiu distribúciu náboja a tým zvýšenie prvej hyperpolarizovateľnosti [3].

Konjugované D- π -A štruktúry na báze heteroaromatických katiónov predstavujú ďalšiu zaujímavú skupinu zlúčenín s potenciálnym využitím v optoelektronike a fotonike. Sú potvrdené priaznivé NLO vlastnosti benzotiazolových [4] a benzobistiazolových [5] solí.

V snahe zvýšiť elektrónakceptorný charakter benzobistiazolového skeletu, pokúsili sme sa o metyláciu oboch heterocyklických dusíkov a následnú prípravu dvojnásobne kondenzovaných solí lineárneho derivátu.

N,N-kvarternizované benzobistiazolové soli teda predstavujú ďalší typ akceptorného skeletu D- π -A- π -D konjugovaných systémov, doposiaľ v literatúre neopísaných.

Optimalizáciou reakčných podmienok (využitím mikrovlnného reaktora) urýchlíme kvarternizačné ako aj kondenzačné reakcie vedúce k požadovaným zlúčeninám.

Teoreticky vypočítané NLO vlastnosti budú potvrdené syntézou cieľových derivátov a tieto látky budú následne charakterizované UV-VIS spektroskopickými metódami a študované z hľadiska fluorescenčných vlastností. V spolupráci s Katedrou mikroelektroniky pri Fakulte elektrotechniky a informatiky STU v Bratislave je naplánované aj meranie elektronických vlastností po vytvorení elektronických prvkov (OLED a OFET).

Materiál a metódy

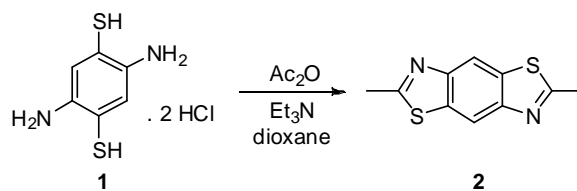
Pripravené zlúčeniny sa izolovali bežnými metódami z laboratórnej praxe (filtrácia, kryštalizácia, stĺpcová chromatografia). Rozpúšťadlá boli čistené a sušené štandardnými postupmi. Priebeh reakcií sa sledoval TLC chromatografiou (Silufol, vizualizácia UV 254). Na stĺpcovú chromatografiu sa použil silikagél 65/40 (Merck). Reakcie za pôsobenia mikrovlnného žiarenia sa uskutočnili v reaktore *Anton Paar Monowave 300* (max. výkon 850W) alebo v reaktore *Initiator BIOTAGE_{TM}* (max. výkon 300W). Elektrónové absorpčné spektrá boli zaznamenané na UV/Vis spektrofotometri *Jenway 6705* a ako rozpúšťadlo sa použil metanol. ¹H a ¹³C spektrá boli namerané na prístroji Varian NMR System 300 s pracovnou frekvenciou 300 MHz (¹H) a 75 MHz (¹³C), ako vnútorný štandard sa použil tetrametylsilán (TMS) a rozpúšťadlo DMSO.

Výsledky a diskusia

Na základe dosiahnutých výsledkov sme sa v ďalšom výskume zamerali na prípravu nových disubstituovaných derivátov benzobistiazolových solí, u ktorých predpokladáme priaznivé NLO vlastnosti tretieho poriadku, najmä dvojfotónovej absorpcie.

Cieľové zlúčeniny boli pripravené kondenzačnými reakciami aldolového typu s vybranými aromatickými aldehydmi.

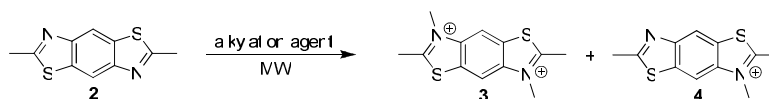
Základná metóda prípravy východiskového benzobistiazolového skeletu **2** je založená na jednoduchej cyklizačnej reakcii s 2,5-diamino-1,4-benzénditiol dihydrochloridom **1** a acetanhydridom v dioxáne. Požadovaný produkt získavame po stĺpcovej chromatografii v 53 % výťažku (Obr. 1).



Obr. 1 Syntéza základného skeletu

N,N-alkyláciou benzobistiazolu **2** získavame dvojnásobne alkylované soli. V literatúre je známych niekoľko alkylačných činidiel [6,7,8]. Uskutočnili sme viacero reakcií. Najlepšie dosiahnuté výsledky sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke.

Tab. 1 Príprava dvojnásobne metylovaných solí benzobistiazolového skeletu



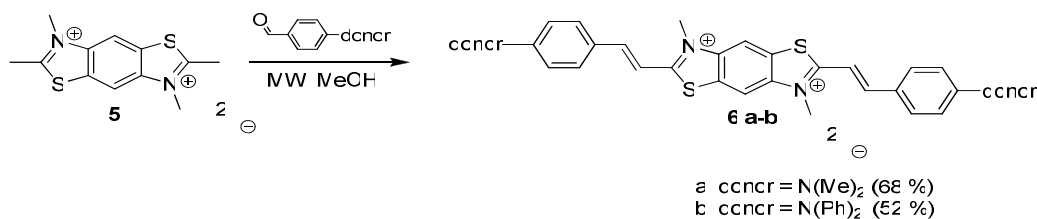
alkylačné činidlo	2 : činidlo (mol. pomer)	3 : 4 : 2*
CH ₃ I	1:5	1 : 2,8 : 0
(CH ₃) ₃ O ⁺ BF ₄ ⁻	1:14	1,2 : 1 : 2
(CH ₃) ₂ SO ₄	1:20	10 : 1 : 0
1,3-propánsultón	1:6	0 : 4,9 : 1

* pomer zastúpenia látok získaný z ¹H NMR spektier

Prvé pokusy s metyljodidom ukázali nízku selektivitu pre prípravu dvojnásobných solí, preto sme sa rozhodli pre využitie trimetyloxónium tetrafluórborátu, ale v reakčnej zmesi aj po pridaní nadbytku činidla pozorujeme nízku konverziu východiskovej látky. Požadovanú konverziu sme dosiahli použitím dimetylsulfátu v dichlórbenzéne. Pre prípravu cieľových kondenzovaných derivátov je potrebná výmena sulfátových aniónov za jodidové, ktorú sme uskutočnili s 10 % vodným roztokom NaI s výťažkami okolo 70 %.

Na zlepšenie rozpustnosti solí v bežných organických rozpúšťadlách sme sa pokúsili aj o kvarternizáciu s hexyljodidom a oktyljodidom, ale tieto deriváty neboli úspešne pripravené kvôli nízkej reaktivite použitých činidiel. Reakciou s 1,3-propánsultónom aj po predĺžení reakčného času pozorujeme iba vznik monoalkylovanej vnútornej soli.

Kondenzačnými reakciami aldolového typu týchto solí s vybranými elektrónodonnými aromatickými benzaldehydmi sme pripravili cieľové zlúčeniny **6a** a **6b**, ktoré sme charakterizovali ¹H a ¹³C NMR spektroskopickými metódami (Obr. 2).



Obr. 2 Syntéza cieľových lineárnych derivátov.

Záver

Nové konjugované deriváty s kvadrupolárnou štruktúrou boli pripravené viacstupňovou syntézou z východiskového 2,5-diamino-1,4-benzénditiol dihydrochloridu **1**. Dvojnásobnou metyláciou s dimetylsulfátom v podmienkach mikrovlnného žiarenia a následnou zmenou aniónu sa získa benzobistiazolová soľ **5** s výťažkami do 70 %. Kondenzačnými reakciami s donornými aromatickými aldehydmi: *p*-dimetylamino-benzaldehydom a *p*-difenylamino-benzaldehydom boli izolované cieľové molekuly s výťažkami 68 % (**6a**) a 52 % (**6b**).

Pod'akovanie

Niektoré časti práce boli riešené v rámci projektov finančne podporených Grantmi UK pre doktorandov a mladých vedeckých pracovníkov (grant číslo UK/151/2011).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Yamashita Y., (2010) Chem Lett. 38, p. 870
- [2] Pang H., Vilela F., Skabara P. J., McDouall J. J. W., Crouch D. J., Anthopoulos T. D., Bradley D. D. C., M. de Leeuw D., Horton P. M. (2007) Adv. Mater. 19, p. 4438
- [3] Naseema K., Sujith K. V., Manjunatha K. B., Kalluraya B., Umesh G., Rao V. (2010) Optic & Laser Technology 42, p. 741
- [4] Hrobáriková V., Hrobárik P., Gajdoš P., Fitis I., Fakis M., Persephonis P., Zahradník P. (2010) J. Org. Chem. 75, p. 3053
- [5] Čibová A., Magdolen P., Fülöpová A., Zahradník P. (2013) Chem. Papers 67, p. 110
- [6] Zanotti K. J., Silva G. L., Creeger Y., Robertson K. L., Waggoner A. S., Bergetb P. B., Armitage B. A. (2011) Org. Biomol. Chem. 9, p. 1012
- [7] Nadeem S., Munawar M. A., Ahmad S., Smiglak M., Drab D. M., Malik K. I., Amjad R., Ashraf C. M., Rogers, R. D. (2010) ARKIVOC 7, p. 19
- [8] Kaloyanova S., Trusova V. M., Gorbenko G. P., Deligeorgiev T. J. (2011) Photochem. Photobiol., A 217, p. 147

Využitie extrakcie teploty zákalu micelárnych roztokov na stanovenie stopových koncentrácií medi v ľudskom moči metódou atómovej absorpčnej spektrometrie s plameňovou atomizáciou

Simona Čurmová, Radoslav Halko, Ivana Petránová

*Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave,
Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava, Slovenska republika
e-mail: curmova@fns.uniba.sk*

Abstract

A new and simple cloud-point extraction (CPE) methodology has been developed for the extraction and preconcentration copper with flame atomic absorption spectrometry (FAAS). The copper ions in the initial aqueous solution were complexed with 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline (neocuproine) and Triton X-114 was added as surfactant. Developed method is based on the reaction of neocuproine with Cu(I) which forms orange-yellow stable and hydrophobic chelate in a neutral or slightly acidic buffer solution (adjusted to pH = 5.9). The main factors affecting CPE procedure, such as pH extraction solution, concentration of ligand, amount of Triton X-114, equilibrium extraction temperature, and time of extraction were investigated and optimized. Under the optimal conditions, the limit of detection (LOD) for copper was $0,764 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Calibration curve was linear in the range of $0\text{-}10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The proposed method was applied to the determination of trace copper in human urine samples.

Kľúčové slová: *meď; neokuproín; Triton-X114; extrakcia; FAAS*

Úvod a formulácia cieľa

Meď je stopovým prvkom a zúčastňuje sa mnohých enzymatických reakcií v organizmoch. V biologických systémoch, existujú kationy medi v dvoch oxidačných stupňoch Cu(I) a Cu (II) [1]. Telo dospelého človeka obsahuje okolo 80-100 mg medi. Človek väčšinu medi prijíma v potrave (3 až 5 mg), z čoho sa okolo 30% resorbuje. Meď je pre naše telo biogénnym – nepostradateľným prvkom, avšak iba v malom množstve. Zvýšený obsah medi v organizme sa prejavuje pri genetickom ochorení metabolizmu, Wilsonovej chorobe. Táto choroba je spôsobená vylučovaním medi do žlče, čo vedie k progresívnemu hromadeniu medi v tkanivách, obličkách a sekundárne v mozgu a očiach. V sére je koncentrácia medi rozdielna, pre mužov je to $11\text{-}20 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a pre ženy $13,4\text{-}24,5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. V moči je to menej ako $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Obsah medi v moči nakazených Wilsonovou chorobou je niekoľkonásobne vyšší [2]. U polovičky chorých vo veku od desiatich rokov spôsobuje symptómy poukazujúce na poruchy pečene. Chorý môže mať akútny alebo chronický zápal pečene (hepatitída) alebo tvrdnutie pečene (cirhóza). Jednotlivé symptómy, ktoré poukazujú na ochorenie, sú veľmi variabilné, ale v podstate je jednoduché rozlíšiť najčastejšiu – hepatálnu, neurologickú

a psychiatrickú formu [3]. K extrakčným technikám, ktoré možno použiť na extrakciu a skoncentrovanie iónov kovov môžeme zaradiť extrakcia tuhou fázou (Solid Phase Extraction, SPE) alebo extrakciu v systéme kvapalina-kvapalina (Liquid Liquid Extraction, LLE) alebo extrakciu s využitím teploty zákalu micelárnych roztokov (Cloud Point Extraction, CPE). Podmienka je, aby tieto extrakčné metódy boli bezpečné, rýchle, spoľahlivé, časovo a finančne nenáročné [4]. V našom prípade sme sa rozhodli pre jednu z vyššie uvedených metód, a to pre CPE. Väčšina publikovaných prác, v ktorých sa využíva CPE je spojená s metódami atómovej spektrometrie ako napríklad atómová absorpčná spektrometria s technikou plameňovej atomizácie (Flame atomic absorption spectrometry, FAAS), elektrotermickej atomizácie (Electrothermal atomic absorption spectrometry, ETAAS) alebo atómovou emisnou spektrometriou s indukčne viazanou plazmou (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, ICP-AES). Je to najmä vďaka vysokej selektivitě použitých detektorov. Hlavným dôvodom spájania separačných a detekčných techník je práve nízka koncentračná úroveň sledovaných analytov v biologických vzorkách, ale taktiež vysoká koncentrácia doprevádzajúcich zložiek. Medzi uvedené metódy môžeme zaradiť aj spojenie CPE s FAAS. V ich prípade, je to najmä kvôli relatívne nízkym prevádzkovým nákladom, rýchlej analýze a už spomínanej vysokej selektivitě. Extrakcia medi bola uskutočnená prídavkom selektívneho chelatovného činidla 2,9-dimetyl-1,10-fenantrolínu (neokuproínu), ktorý vytvára s Cu(I) stabilný, hydrofóbny chelát. Za účelom redukcie Cu(II) na Cu(I) bola pridávaná do jednotlivých vzoriek kyselina askorbová. Stabilný, hydrofóbny chelát bol extrahovaný a skoncentrovaný do micelárneho roztoku neiónového tenzidu Tritonu X-114 (oktyl-fenoxy-polyetoxy-etanol).

Materiál a metódy

Použitíe prístroje a zariadenia

Na stanovenie medi bol použitý Atómový absorpčný spektrometer AAS 3 (Carl Zeiss, Jena, Nemecko) s plameňovou atomizáciou a s deutériovou lampou na korekciu pozadia. Výbojka s dutou katódou pre prvok Cu bola dodaná firmou PERKIN-ELMER (NORWALK, USA). Vyhodnotenia boli robené z integrovaných hodnôt absorbancie. Ďalej boli použité analytické váhy AR 0640 (Ohaus, USA), ultrazvuk UCM 9 (Ecoson, Nové Mesto nad Váhom, SR), automatické pipety Brand 100-1000 μL , 10-100 μL , pH meter AT 3200P (Agilent Technologies, California, USA), vodný kúpeľ (Avalier, ČR) a centrifúgu mlw T30 (Janetzki, Nemecko).

Chemikálie a roztoky

Kalibračné roztoky Cu(II) ($0-10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) boli pripravené postupným riedením zásobného roztoku Cu(II) o koncentrácii $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ v $0,1 \%$ (v/v) HNO_3 (Merck, Nemecko). Roztok chelátotvorného činidla bol pripravený rozpustením odpovedajúceho množstva neokuproínu (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko) v 1 mL metanolu (Merck, Darmstadt, Nemecko) a následne doliaty na požadovaný objem deionizovanou vodou. Pre úpravu pH bol použitý tlmivý roztok s hodnotou pH 5,9, ktorý sme pripravili z $0,05\%$ (w/v) kyseliny askorbovej (Calbiochem, USA a Kanada) a požadované pH sme dosiahli titráciou roztokom $0,5\%$ (w/v) octanu amónneho (Merck, Darmstadt, Nemecko). Ako neiónový tenzid sme použili Triton X-114 (Fluka, Buchs, Švajčiarsko). Všetky použité chemikálie boli definovanej analytickej čistoty a na prípravu roztokov bola použitá deionizovaná voda pripravená systémom Water Pro PS (Labconco, USA).

Príprava štandardov

Pre extrakciu sme použili 25 mL roztoku. Roztok obsahoval prídavok Cu(II), $250 \mu\text{L}$ Tritonu X-114 a $250 \mu\text{L}$ neokuproínu. Zvyšok sme doplnili tlmivým roztokom o zložení ($0,05\%$ kyselina askorbová; $0,5\%$ octan amónny; pH = 5,9).

Príprava vzorky

Moč sme odoberali do čistej suchej nádoby v deň extrakcie, ktorý sme nechali vychladnúť pod prúdom studenej tečúcej vody. Takto vychladený moč sme použili na extrakciu medi bez akýchkoľvek iných úprav.

Pracovné podmienky

Tab. 1 Pracovné podmienky CPE

Vzorka	Koncentrácia NEO [$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$]	Obj. percento Tritonu X-114 [%]	T [$^{\circ}\text{C}$]	t [min]	Centrifugácia [rpm]
Štandard	0,1	1%	60	10	3500
Eudská moč	0,1	1%	60	10	3500

T - teplota extrakcie, t - čas ustáľovania rovnováhy

Tab. 2 Pracovné podmienky FAAS

Prvok	Zdroj žiarenia	Napájací prúd lampy [mA]	Vlnová dĺžka [nm]	Štrbina	Kalibr. rozsah [$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$]
Cu	HKL	15	324,8	0,7	0-10

HKL - výbojka s dutou katódou

Výsledky a diskusia

Optimalizácia podmienok stanovenia medi metódou FAAS

Pre dosiahnutie maximálneho extrakčného výťažku je potrebné optimalizovať všetky možné experimentálne parametre ako vplyv pH extrakčného prostredia, koncentrácie

chelatotvorného činidla, koncentrácie neiónového tenzidu, extrakčnej teploty a trvanie času extrakcie.

Vplyv pH extrakčného prostredia

Hodnota pH prostredia hrá jedinečnú úlohu pri tvorbe chelátu a jeho následnej extrakcii. Extrakcii iónov kovov technikou CPE predchádza tvorba stabilného chelátu s dostatočnou hydrofobicitou, ktorý sa vyextrahuje do malého objemu tenzidom obohatenej fázy. Na zmenu pH pri CPE v rozmedzí od 2,5 do 6,5 sme použili tlmivý roztok kyselina askorbová/octan amónny. Maximálny extrakčný výtťažok sme dosiahli pri pH = 5,9. Pre naše nasledujúce experimenty sme si zvolili mierne kyslé pH prostredie pH = 5,9.

Vplyv koncentrácie chelatovného činidla (neokuproínu)

Výber vhodného chelatovného činidla súvisí s tvorbou dostatočne hydrofóbneho chelátu, ktorý má vysoký rozdeľovací koeficient, vzniká rýchlo a kvantitatívne. Vysoko selektívne činidlo, neokuproín sme použili pre vytvorenie chelátu. V našej štúdií sme sledovali rozsah koncentrácií v rozmedzí od 0,001-1,000 mmol·L⁻¹. Pre nasledujúce merania sme si zvolili optimálnu koncentráciu neokuproínu 0,100 mmol·L⁻¹.

Vplyv koncentrácie neiónového tenzidu (Tritonu X-114)

Neiónový tenzid Triton X-114 sme si vybrali z dôvodu jeho komerčnej dostupnosti, vysoko čistej homogénnej forme, nízkym toxikologickým vlastnostiam a nákladom. Navyše teplota zakalenia 23-25°C [6], vysoká hustota fázy bohatej na tenzid, nám uľahčila samotnú separáciu fáz pri centrifugácii. Skúmali sme vplyv koncentrácie neiónového tenzidu Triton X-114, rozmedzí od 0,5-3,0% objemových na účinnosť extrakcie pre meď. Najlepšie účinnosti CPE meď sme dosiahli pri koncentrácii 1,0% Tritonu X-114.

Vplyv extrakčnej teploty a času

Extrakčný výtťažok je silne ovplyvnený teplotou zahrievania micelárneho roztoku pre vznik fázy obohatenej tenzidom a optimálnym časom ustáľovania rovnováhy. My sme sa rozhodli sledovať vplyv zmeny extrakčnej teploty na extrakčný výtťažok pri vyššej teplote ako je deklarovaná [6] teplota zákalu micelárnych roztokov (Cloud Point Temperature, CPT) a to v rozmedzí od 40-70°C. Najvyšší extrakčný výtťažok sme dosiahli pri teplote 60°C. Ďalej sme sa zamerali na optimalizáciu času ustáľovania rovnováhy. Čas ustáľovania rovnováhy sa najčastejšie pohybuje v rozmedzí 10-30 min. V našom prípade to bolo 10 min.

Výsledky

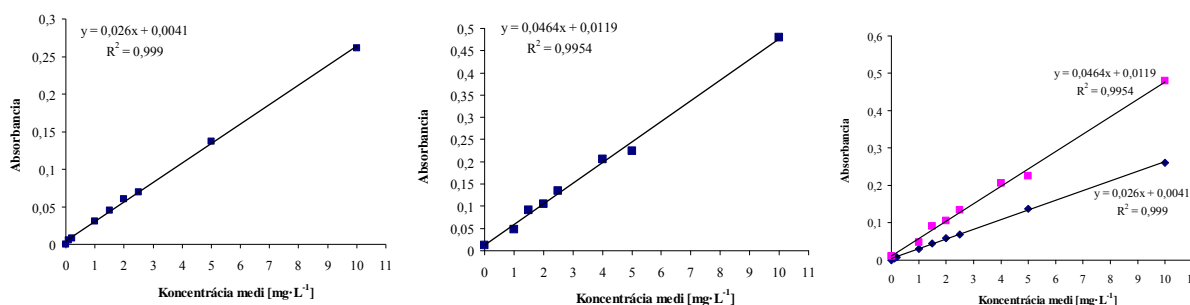
Na vyhodnotenie výsledkov jednotlivých optimalizačných krokov a tiež pri stanovení medi v biologickej vzorke metódou FAAS sme použili metódu kalibračnej krivky. Linearita

systému bola testovaná v rozsahu koncentrácií 0-10 mg·L⁻¹. V Tab. 3 a na Obr. 1-3 sú uvedené výsledné parametre kalibračných závislostí pre štandardy vodných roztokov Cu(II) v 0,1% HNO₃ a pre kalibračné roztoky po extrakcii.

Tab. 3 Kalibračné závislosti (KZ) pre štandardy vodných roztokov Cu(II) s využitím CPE v spojení s FAAS

Kalibračná závislosť	a ¹	R ² ²	m _{char.} ³	LOD ⁴ [mg·L ⁻¹]
KZ roztokov v 0,1% HNO ₃	0,0260	0,9990	0,169	0,368
KZ roztokov po CPE, F _c = 20	0,0464	0,9954	0,095	0,764

¹ – smernica kalibračnej závislosti; ² – štvorec korelačného koeficienta; ³ – charakteristická koncentrácia; ⁴ – limit detekcie



Obr. 1-3 Kalibračné závislosti pre štandardy vodných roztokov Cu(II) s využitím CPE v spojení s FAAS

Navrhnutá metóda bola použitá na stanovenie a skoncentrovanie medi vo vzorke ľudského moču. Vzorku sme skoncentrovali z objemu 25 mL do objemu 1,4 mL, kde koncentračný faktor bol 20. Namerané extrakčné výťažky získané pri optimálnych experimentálnych podmienkach CPE pre jednotlivé vzorky sú uvedené v Tab. 4.

Tab. 4 Výsledky stanovenia Cu(II) vo vzorke ľudského moču

Biologická vzorka ¹	Koncentrácia pridanej Cu(II) [mg·L ⁻¹]	Koncentračný faktor	Stanovená koncentrácia [mg·L ⁻¹]	Výťažok CPE [%]
Ľudská moč	0	20	- ¹	- ¹
Ľudská moč	0,2	20	4,104	108,1
Ľudská moč	0,25	20	4,889	85,1

¹ – počet meraní (n = 4); ² – nebolo stanovené;

Záver

Extrakcia s využitím teploty zrážania micelárnych roztokov je v súčasnosti jednoduchá, citlivá, finančne nenáročná, rýchla technika skoncentrovania a extrakcie stopových množstiev iónov kovov zo vzorky. CPE sme úspešne využili pre stanovenie stopových množstiev medi v ľudskom moči metódou atómovej absorpčnej spektrometrie s plameňovou atomizáciou.

Po optimalizácii experimentálnych parametrov sme dosiahli extrakčné výťažky v rozmedzí 85,1-108,1%.

Pod'akovanie

Táto práca vznikla za finančnej podpory grantovej agentúry MŠ SR VEGA, grant č. 1/1349/12 a Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0583-11 pod záštitou centra excelencie VVCE-0070-07.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Connelly N. G., Hartshorn R. M., Damhus T., et. al. (2005) Nomenclature of Inorganic chemistry, IUPAC Recommendations, RSC Publishing, p. 83.
- [2] Česká hepatologická spoločnosť České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně [Citované: 12. december 2012]
<<http://www.ces-hep.cz/file/215/Wilsonova%20choroba.pdf>>
- [3] Huster, D. (2010) Wilson disease, Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2010, vol. 24, p. 531-539.
- [4] Hagarová, I. (2009) Spojenie Extrakcie s využitím teploty zákalu micelárnych roztokov s metódami atómovej spektrometrie na separáciu, prekoncentráciu a špeciáciu kovov, Chem. listy, 2009, vol. 103, p. 712-720.
- [5] Malát, M. (1988) Extrakční spektrofotometrie kovů a nekov. 1. vyd. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1988. p. 182-190. DT 535.243:546.1/.3
- [6] Halko R., Hutta M. (2000) Přehľad využitia neiónových tenzidov pri úprave vzoriek pre environmentálnu analýzu organických polutantov, Chem. listy, 2000, vol. 94, p. 990-993

Príspevok k riešeniu problému stanovenia hydraulických vlastností bentonitov

Martin Daňo¹, Matej Kurek², Karol Jesenák², Michal Galamboš¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra jadrovej chémie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, dano@fns.uniba.sk

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra anorganickej chémie, Mlynská dolina, 84215 Bratislava, Slovenská republika, kurobag@gmail.com

Abstrakt

Large hydraulic resistance of clay minerals is the most used property. In this regard, bentonite is the most frequent mineral used for sealing barrier purposes in construction and building various types of waste dumps. Large hydraulic resistance of clays is often the cause of various complications of determining these properties. This report informs, how to use equipment that has been designed just for determining the hydraulic properties of particulate materials with high hydraulic resistance. It also shows its advantages and limitations in flow experiments using layers of bentonite Stará Kremnička – Jelšovský potok.

Kľúčové slová: bentonit; montmorillonit; hydraulické vlastnosti

Úvod

Bentonity sú najvýznamnejším prírodným materiálom využívaným pre tesniace účely a počet odborných prác, ktoré sa venujú problému hydraulických vlastností týchto látok, je veľký. Tento príspevok je informáciou o výsledkoch úvodných experimentov so samostatným prístupom k posudzovaniu hydraulických vlastností tejto horniny.

Vo všeobecnosti sa hydraulické vlastnosti látok stanovujú metódami, pri ktorých sa zisťuje prietok kvapaliny cez vrstvy týchto látok pri známom rozdiel tlakov na začiatku a na konci vrstvy, pričom začiatok a koniec vrstvy je tu chápaný z pohľadu smeru toku kvapaliny. Najbežnejším spôsobom charakterizácie hydraulických vlastností látok je súčiniteľ filtrácie k , filtračná rýchlosť v a filtračný prietok Q . Súčiniteľ filtrácie je pomer filtračnej rýchlosti a tzv. hydraulického sklonu i :

$$k = v/i \quad [\text{I.}]$$

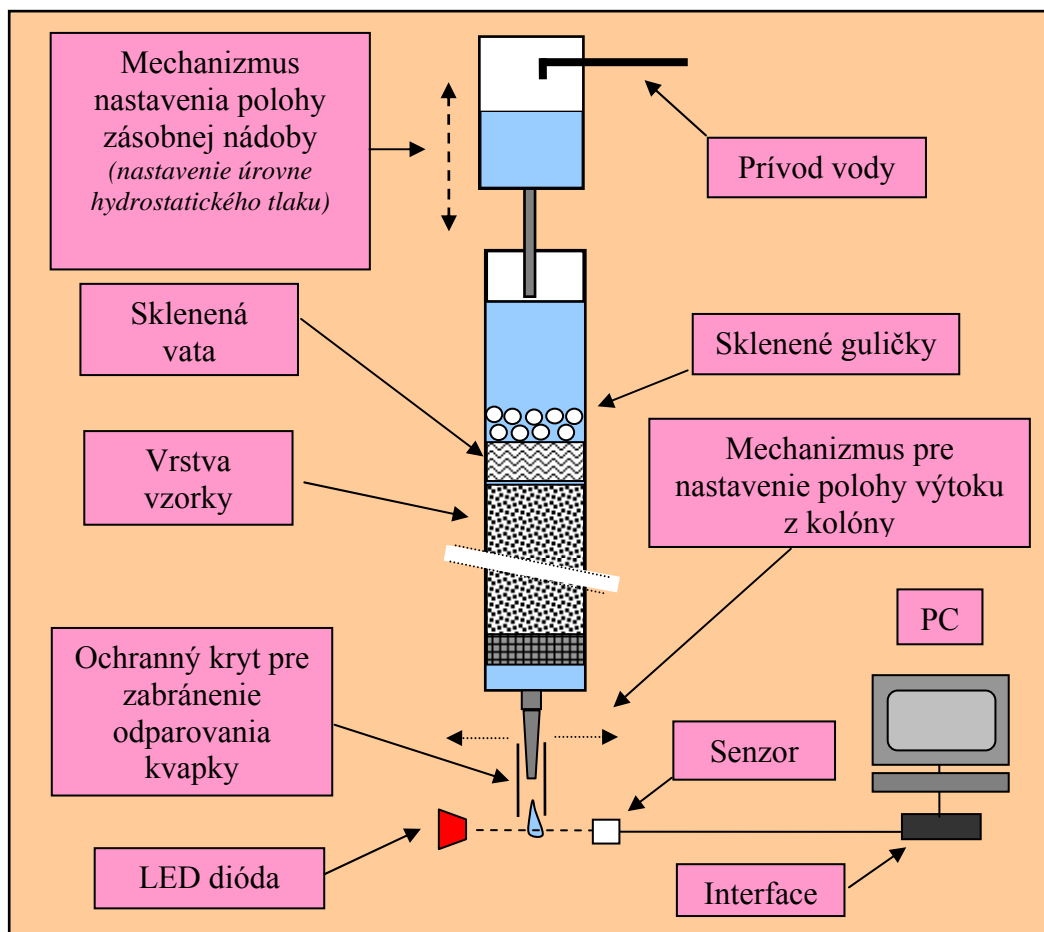
kde hydraulický sklon je rozdiel tlakov meraných napr. výškou hladiny vody na začiatku a konci kolóny s partikulárnou látkou. Filtračná rýchlosť v je definovaná ako objem vody pretečený cez kolónu vzhľadom na jednotkový prierez kolóny za jednotkový časový interval:

$$v = V/A \cdot t \quad [\text{II.}]$$

V súčasnosti používaná normalizovaná metóda stanovenia prietoku vody cez vrstvy rôznych partikulárnych látok pochádza ešte z roku 1990 [1]. Najrozšírenejšia metóda stanovenia hydraulického odporu partikulárnych látok prírodného pôvodu pre stavebné aplikácie využíva triaxiálnu komoru. Aplikácii tejto metódy sa venujú najmä práce Frankovskej a Dananaja [2 – 7]. Napriek tomu, že použitie triaxiálnej komory je najvyužívanejšou metódou stanovenia hydraulických vlastností partikulárnych látok, často nemožno túto metódu považovať za optimálnu. Vo všeobecnosti je to najmä preto, že pri využívaní tohto zariadenia existuje veľmi úzky priestor pre zmenu takých parametrov experimentu akými sú prietoková plocha vrstvy, jej výška, hydraulický tlak nad vrstvou a iných. Tento nedostatok sa zvyčajne rieši bežnými prietokovými experimentmi v rôznych typoch kolón, avšak pri testovaní hydraulických vlastností veľmi jemnozrnných partikulárnych látok sú prietoky kvapalín cez ich vrstvy veľmi nízke a zvyčajne spadajú hlboko pod hranicu použitia bežných elektronických prietokomerov. Tento problém bol v nedávnej minulosti vyriešený zostavením experimentálneho zariadenia, ktoré pracuje na princípe registrácie počtu kvapiek na výstupe z kolóny. Nasledujúci príspevok je opisom riešenia tohto problému a zároveň príkladom jeho konkrétneho využitia.

Materiál a metódy

Stanovenie prietoku kvapaliny cez bentonit bolo založené na kontinuálnej registrácii počtu kvapiek na výstupe z kolóny (obr. 1). Hlavnú časť zariadenia tvorila kolóna s vrstvou bentonitu. Spodná časť kolóny bola riešená tak, aby sa na jednej strane zabránilo úniku častíc z kolóny, a na druhej strane, aby hydraulický odpor tejto časti bol výrazne nižší ako hydraulický odpor bentonitu. Riešenie spočívalo vo vytvorení sendvičovej štruktúry s postupne zmenšujúcimi sa pórmí smerom k výstupu z kolóny. Hornú časť vrstvy uzatvárala vrstva sklenej vaty, ktorá zabraňovala poškodzovaniu vrchnej časti vrstvy bentonitu v dôsledku cirkulácie vody spôsobenej doplnovaním vody z nádoby zabezpečujúcej rovnomerný hydrostatický tlak nad vrstvou. Prietok vody sa kontinuálne zaznamenával registráciou počtu kvapiek vytekajúcich z kolóny. Tá sa uskutočnila vyhodnotením zmeny elektrického signálu zo senzora: ten registroval prerušenie svetelného lúča z LED diódy padajúcou kvapkou. V dolnej časti kolóny sa nachádzala mechanická časť určená na optimalizáciu vzájomnej polohy svetelného zdroja, senzora a ústia kolóny. Aby sa pri veľmi nízkych prietokoch zamedzilo odparovaniu kvapky na výstupe z kolóny, bolo ústie kolóny umiestené v úzkej trubici so stabilnou vlhkosťou vzduchu. Bližší popis použitého zariadenia je publikovaný v práci [8].



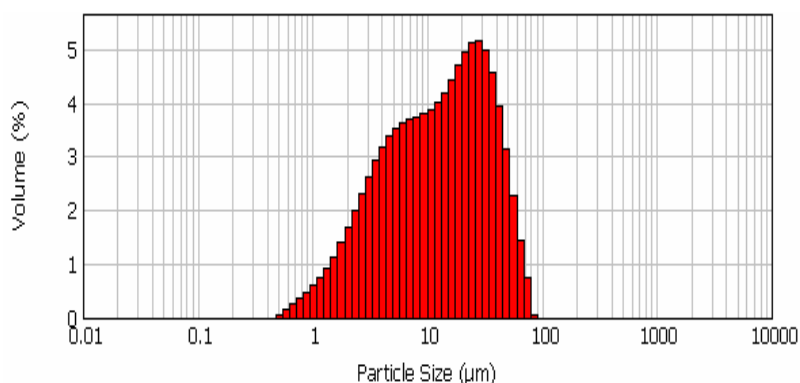
Obr. 1 Schéma prietokového zariadenia na stanovenie hydraulických vlastností látok s nízkou hydraulickou priepustnosťou

V experimentoch bol použitý bentonit zo slovenského ložiska Stará Kremnička – Jelšový potok. Použila sa zrnitostná frakcia bentonitu s časticami menšími ako 50 μm . (Jedná sa o Stokesov rozmer častíc.)

Distribúciu veľkosti častíc zistenú laserovým analyzátorom veľkosti častíc (bol použitý prístroj Mastersizer Hydro 2000S od firmy Malvern) uvádza obr. 2. Stĺpec bentonitu v kolóne bol vytvorením voľným nasypáním suchej práškovej vzorky. Priemer stĺpca bentonitu bol 1,5 cm, jeho výška 2 cm. Celková jeho hmotnosť predstavovala 2,651 g. Výška vodného stĺpca nad vrchným okrajom vrstvy bentonitu bola 52 cm. V experimentoch sa ako kvapalnú médium použila bežná destilovaná voda pripravená destiláciou vopred čiastočne deionizovanej vodovodnej vody.

Priemerná veľkosť častíc v študovanej frakcii bentonitu je 18,18 μm . Po vylúčení desaťpercentnej skupiny najmenších častíc, je spodná hranica veľkosti častíc frakcie 2,546 μm . Po vylúčení desaťpercentnej skupiny najväčších častíc, je horná hranica veľkosti častíc frakcie 41,92 μm . Najfrekvencovanejšie častice bentonitovej frakcie majú rozmer 12,98 μm .

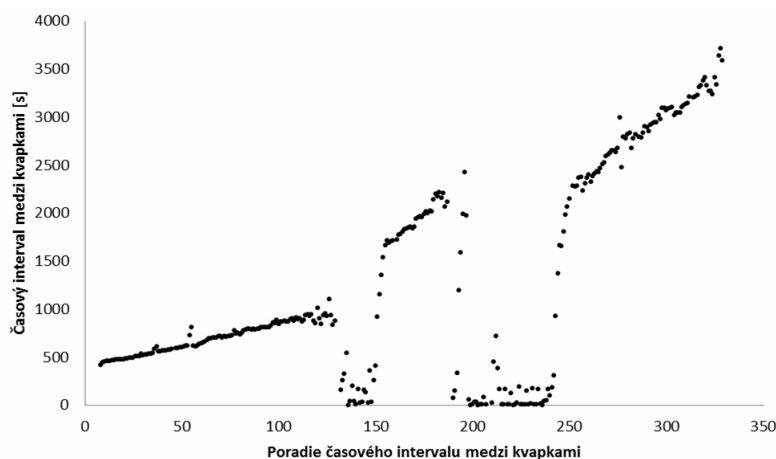
(Častice sú tu chápané ako kompaktné aglomerované celky, vykazujúce vo vodnej suspenzii vzájomnú súdržnosť medzi jednotlivými časticami aglomerátu.)



Obr. 2 Distribúcia veľkosti častíc v študovanej frakcii bentonitu

Výsledky a diskusia

Prietok vody cez vyššie špecifikované vrstvy bentonitov ukazuje obr. 3. Prietok je tu charakterizovaný ako zmena časového intervalu medzi po sebe nasledujúcimi kvapkami na výstupe z kolóny s bentonitovou vrstvou. Objem jednej kvapky je 46 µl.. Celý záznam na obrázku zodpovedá časovému intervalu piatich dní.



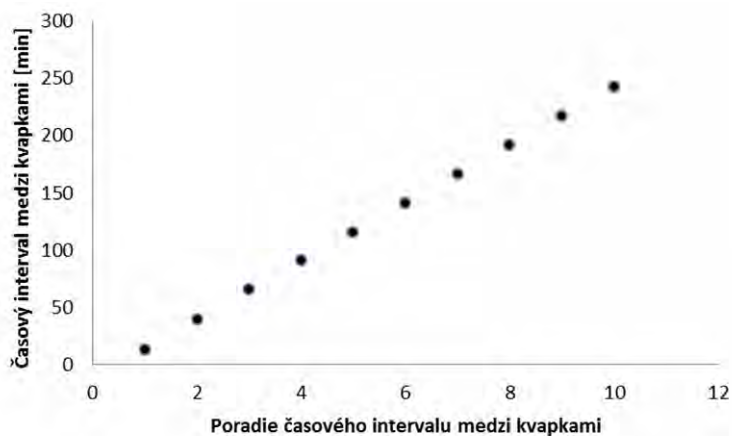
Obr. 3 Prietok destilovanej vody cez vrstvu študovaného bentonitu

Zobrazená krivka ukazuje nasledovné:

1. Časový interval medzi jednotlivými kvapkami vo všeobecnosti narastá, čo zodpovedá postupnému znižovaniu prietoku vody v sledovanom časovom intervale.
2. V sledovanom časovom intervale došlo k dvom výrazným poklesom prietoku a k dvom následným zvýšeniam prietoku až na úroveň, ktorá zodpovedá všeobecnému

trendu pomalého poklesu. Minimá týchto diskontinuit na krivke zodpovedajú zvýšeným prietokom počas časového intervalu približne 160 minút v prvom prípade, a 262 minút v druhom prípade.

Prvá charakteristika krivky na obr. 3 je potvrdením známeho efektu znižovania prietoku vody v dôsledku zvyšovania hydraulického odporu ílov následkom ich pomalej hydratácie. (Vzhľadom na veľmi nízky obsah iných neílových zložiek v bentonite z lokality Stará Kremnička – Jelšový potok, je za zníženie prietoku vody zodpovedná výlučne hydratácia montmorillonitu.) To čo však je na krivke z obr. 3 zaujímavé, že časový interval zmien prietoku vody je mimoriadne veľký a tiež, že výrazne prekračuje doby dosiahnutia rovnovážnych stavov pri sorpciách vody z plynnej fázy. Tie spadajú do časového intervalu približne dvoch dní. Vzhľadom na to, že difúzia pár vody do štruktúry ílového substrátu je pomalší dej ako kapilárne nasávanie vody z kvapalnej fázy, je pozorovaný fakt prekvapujúci. (Pozn.: štruktúra je v tejto vete chápaná v širšom ponímaní, to znamená ako štruktúra na rôznych výstavbových úrovniach ílového minerálu.) Tento fakt je o to významnejší, že v časovom intervale realizovaného experimentu nebol vzhľadom na veľkosť prietoku vody dosiahnutý rovnovážny stav.



Obr. 4 Časová postupnosť kvapiek vody na výstupe z kolóny

Druhý pozorovaný efekt, ktorými sú výrazné diskontinuity v prietoku vody, nie je jednoduché vysvetliť, avšak tie pravdepodobne súvisia s tvorbou rôznych nehomogenít vo vrstve bentonitu počas jeho hydratácie. Ich hlavnou príčinou sú malé zmeny objemu ílovej zložky tejto horniny, ktoré vytvárajú vo vrstve rôzne typy mikrotrhlín. Napriek vysokej homogenite použitého bentonitu, je ich tvorba zodpovedná aj za relatívne vysoký stupeň nereprodukovateľnosti prietokových experimentov s ílovými substrátmi.

Oba pozorované efekty ilustrujú všeobecnú výhodu použitia vyššie popísaného zariadenia. Tou je predovšetkým možnosť realizácie neštandardných prietokových experimentov s látkami s vysokým hydraulickým odporom, ktorými sú predovšetkým ílové substráty so širokým uplatnením pri budovaní rôznych bariérových štruktúr v stavebníctve a v skládkach rôznych typov odpadov. Týmto zariadením možno plynule zaznamenávať úroveň prietoku vody počas dlhodobých experimentov. To umožňuje zároveň identifikovať krátkodobé diskontinuity prietoku, ktoré sú pri tradičných spôsoboch merania neazaznamenateľné. Ako príklad možno uviesť výsledok krátkodobého experimentu na obr. 4., kde prietok vody cez vrstvu bentonitu je síce konštantný, avšak vzhľadom na malý časový interval experimentu ho nemožno interpretovať ako reprezentatívny.

Záver

Vyššie popísané experimenty boli úvodnými pokusmi na zariadení skonštruovanom pre charakterizáciu hydraulických vlastností látok s vysokým filtračným odporom. Tieto experimenty potvrdili jeho predpokladané výhody, ktoré spočívajú predovšetkým v možnosti identifikácie tých javov, ktoré sú pri použití tradičných metód buď neidentifikovateľné, alebo pravdepodobnosť ich identifikácie je veľmi nízka.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporená grantom VEGA 1/0828/13.

Zoznam použitej literatúry

- [1] ČSN 72 10 20 (1990) Laboratorní stanovení propustnosti zemin
- [2] Frankovská J. (2004) Zborník vedeckých prác: Geológia a životné prostredie, Inžinierska geológia a geotechnika v normotvorbe, Bratislava, p. 23
- [3] Atlas sanačných metód environmentálnych záťaží (2010) Štátny geologický ústav Dionýza Štúra, Bratislav
- [4] Klukanová, A., Frankovská, J. (1995) Geol. Mag. 95(3), p. 179
- [5] Frankovská J. (2010) Zborník príspevkov z 15. Konferencie, Aktuálne európske a slovenské normy v geotechnike: Statika stavieb 2010, Piešťany, Bratislava, p. 77
- [6] Dananaj, I., Frankovská, J. (2004) Geol. Mag. 10(4), p. 305
- [7] Frankovská, J., Andrejkovičová, S., Janotka, I. (2010) Geosynth. Int. 17(4), p. 250
- [8] Jesenák, K., Daňo, M., Kurek, M. (2012) Silikátnik, p. 52

Elektrónová štruktúra a vlastnosti fluorovaných uhl'ovodíkov

Ladislav Éhn, Ivan Černušák

*Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyzikálnej a teoretickej chémie,
Mlynská dolina 1, 84215 Bratislava, Slovenská republika,
ehn.laszlo@gmail.com*

Abstrakt

This paper presents the dipole polarizabilities of the C_2F and C_3F radicals, for which thus far no experimental data have been available. The geometries of these radicals have been optimized on the CASPT2/Pol level of theory. In the next step the polarizabilities have been calculated using the CASPT2 method and the series of aug-cc-pVXZ basis sets (where X = T, Q, 5). Dipole polarizabilities of these fluorinated species served as the input for the modeling of thermodynamic and transport properties of high-temperature gases and gas mixtures.

Kľúčové slová: Polarizovateľnosť; Fluorované uhl'ovodíky.

Úvod

Výskum elektrických vlastností organických materiálov si získava čoraz väčšiu pozornosť vedeckej komunity. Tieto materiály sú dôležité predovšetkým pre elektrický priemysel, v ktorom dosiaľ dominovali polovodiče a kovy. Ich výhoda spočíva v tom, že sa ľahko pripravujú a modifikujú. Ďalšou oblasťou, kde je dôležité poznať ich vlastnosti, je modelovanie fyzikálnych vlastností vysokoteplotných plynných zmesí – plazmy.

Vysokoteplotná plazma, môže vznikáť napríklad pri silných elektrických výbojoch v laboratóriách, v elektrických zariadeniach alebo pri vstupe telies do planetárnej atmosféry. Z tohto dôvodu je pre aplikovaný výskum v astrofyzike alebo materiálovej fyzike veľmi dôležité poznať jej makroskopické fyzikálne vlastnosti. [1,2] Vzhľadom na to, že vytvoriť podmienky pre experimentálny výskum pri takto vysokých teplotách je pomerne náročné a nákladné, je účelné využiť počítačové modelovanie, pre ktoré však ako vstupy slúžia mikroskopické fyzikálne vlastnosti molekúl, a medzi nimi je aj polarizovateľnosť.

Polarizovateľnosť je vlastnosť, ktorá nám určuje, do akej miery sa mení rozloženie náboja v molekule v závislosti od vplyvu vonkajšieho elektromagnetického poľa. V minulosti sme sa venovali jej teoretickému výpočtu ako aj vplyvu fluorácie na jej hodnotu pre rôzne nasýtené dvoj- a trojuhlíkaté molekuly etylénu a propylénu. [3] V tejto práci nadväzujeme na naše publikované výsledky a prezentujeme teoreticky vypočítané hodnoty polarizovateľnosti radikálov C_3F a C_2F , ktorých elektrické vlastnosti ešte doteraz neboli študované *in extenso*.

Metódy výskumu

Experimentálne geometrie pre nami skúmané systémy neboli dostupné. Radikály C_2F a C_3F boli optimalizované pomocou programu MOLCAS [4] z numericky počítaných gradientov energie na úrovni CASPT2 metódy [5] v „ekonomicky“ primerane náročnej báze POL (Sadlej). Voľba tejto multireferenčnej metódy pre optimalizáciu geometrie bola nutná z dôvodu, že oba radikály sú tzv. *open-shell* systémy a môžu sa v oblasti rovnovážnych geometrií nachádzať v (kvázi)degenerovaných energetických stavoch, pre C_2F to ukázali Tarroni a Palmieri v práci [6], kde počítali sériu nízko ležiacich stavov tohto radikálu.

Pri multireferenčných kvantovochemických metódach konštruujeme vlnovú funkciu Ψ_{MR} ako lineárnu kombináciu nie jedného, ale viacerých Slaterových determinantov Φ_i :

$$\Psi_{MR} = C_0\Phi_0 + C_1\Phi_1 + C_2\Phi_2 + \dots \quad [1]$$

jednotlivé determinanty nám reprezentujú systémy s rôzne obsadenými elektrónovými orbitálmi (excitované stavy), pričom koeficienty C_i vyjadrujú váhu daného determinantu vo výslednej vlnovej funkcii. Vzhľadom na to, že vo väčšine systémov je virtuálnych orbitálov veľmi veľa, tak zahrnutie všetkých možných excitovaných stavov by neúmerne navýšilo pracovný čas. Preto sa zvykne pri výpočtoch definovať tzv. „aktívny priestor“ t.j. tie orbitály, ktoré budú môcť byť obsadzované v multireferenčnom výpočte v zmysle úplnej konfiguračnej interakcie [7]. Ich voľba však závisí predovšetkým od chemického zloženia a štruktúry nami skúmaného systému a vyžaduje si v nemalej miere aj určitú chemickú intuíciu a skúsenosť. Spravidla sa do aktívneho priestoru zahrnú všetky dôležité valenčné orbitály. Pre C_2F to predstavuje všetky molekulové orbitály (MO) budované z valenčnej *sp*-vrstvy atómov C a F a pre C_3F MO budované len z valenčnej *p*-vrstvy atómov C a F. Preto sme v C_2F použili 15 aktívnych elektrónov, aktívny priestor bol: $9a' \oplus 3a''$. Pre radikál C_2F sa tiež ukázalo, že excitácie z orbitálov s dominantným podielom 2s AO sú nevýznamné, preto sme pre C_3F použili úspornejší variant: 11 aktívnych elektrónov, aktívny priestor: $8a' \oplus 4a''$. Oba radikály sú planárne takže aktívne orbitály môžeme prepísať aj v notácii pomocou σ/π orbitálov: C_2F : $9\sigma \oplus 3\pi$ a C_3F : $8\sigma \oplus 4\pi$, čo využijeme pri konštrukcii tabuľky dominantných konfigurácií.

Výpočty polarizovateľnosti sme robili tiež metódou CASPT2 v kombinácii s poruchovou metódou *Finite field* (FFPT), v rámci ktorej sa vypočítajú energie molekúl bez prítomnosti vonkajšieho elektrického poľa – $E^{(0)}$ a po „zapnutí“ slabého poľa – $E^{(F)}$. Pre lepšiu simuláciu odozvy molekúl na vonkajšie elektrické pole sme použili sériu báz aug-cc-pVXZ ($X = T, Q, 5$) [8], ktorá je súčasťou knižnice báz atómových funkcií v programovom balíku

MOLCAS [4]. Energia molekuly v statickom, homogénnom elektrickom poli sa dá vyjadriť pomocou nasledovného Taylorov radu:

$$E^{(F)} = E^{(0)} - \mu_{\alpha}^{(0)} F_{\alpha} - \frac{1}{2} \alpha_{\alpha\beta} F_{\alpha} F_{\beta} - \dots \quad [\text{II.}]$$

kde $E^{(0)}$ je energia neporušeného systému, $\mu_{\alpha}^{(0)}$ je permanentný dipólový moment molekuly, $\alpha_{\alpha\beta}$ je jej polarizovateľnosť a F_{α} je elektrické pole, pričom indexy α a β vyjadrujú sumácie podľa Einsteinovej konvencie cez kartézské súradnice a môžu sa rovnať smerovým vektorom x, y, z . Ak zvolíme rôzne vhodné kombinácie polí F_{α} a F_{β} , môžeme nežiaduce členy z rovnice [II.] eliminovať a vypočítať polarizovateľnosť ako numerickú druhú deriváciu.

Jednotlivé smerové komponenty tenzora polarizovateľnosti (α_{xx} , α_{yy} a α_{zz}) boli počítané ako príslušné numerické derivácie hodnôt získaných metódou FFPT a využitím Rombergovej schémy pre spresnenie numerických derivácií podľa vzorcov prebratých od Maroulisa [9]:

$$\alpha_{ii} = \frac{(1024S_i(F) - 80S_i(2F) + S_i(4F))}{360F^2} \quad [\text{III.}]$$

pričom α_{ii} je diagonálna zložka polarizovateľnosti, kde i sa môže rovnať x, y alebo z , F je porucha od poľa pôsobiaceho v danom smere a člen S_i je definovaný nasledovne:

$$S_i = \frac{(2E_0 - E_{+F} - E_{-F})}{2} \quad [\text{IV.}]$$

E_0 je energia neporušeného systému, E_{+F} a E_{-F} sú energie systému v kladnom, resp. zápornom poli o sile F . Ako vidno vzorec (III.) počíta s tromi rôznymi hodnotami S_i pre polia o sile $F, 2F$ a $4F$. V našich výpočtoch sme si hodnotu F stanovili na ± 0.001 a.u. Priemernú polarizovateľnosť molekúl $\bar{\alpha}$ sme počítali ako priemernú hodnotu troch diagonálnych zložiek tenzora polarizovateľnosti:

$$\bar{\alpha} = \frac{(\alpha_{xx} + \alpha_{yy} + \alpha_{zz})}{3} \quad [\text{V.}]$$

Výsledky a diskusia

Vypočítané hodnoty rovnovážnych geometrií radikálov C_2F a C_3F prezentujeme v nasledovných tabuľkách:

Tab. 1 Vypočítaná rovnovážna CASPT2/Pol geometria radikálu C_2F

Parameter	Táto práca	Ref. [6]
Väzba C1-C2	1,3021Å	1,2648Å
Väzba C2-F	1,2933Å	1,2789Å
Uhol C1-C2-F	151,99°	155,25°

Tab. 2 Vypočítaná rovnovážna CASPT2/Pol geometria radikálu C₃F

Parameter	Táto práca
Väzba C1-C2	1,3071 Å
Väzba C2-C3	1,3254 Å
Väzba C3-F	1,2954 Å
Uhol C1-C2-C3	159,63°
Uhol C2-C3-F	133,52°

Z Tabuľky 1 vidno, že naša geometria je v dobrom súhlase s geometriou získanou multireferenčnou metódou konfiguračnej interakcie [6]. Multireferenčný charakter oboch radikálov dokumentuje Tabuľka 3. Po stanovení geometrií molekúl nasledoval výpočet energií v závislosti od elektrického poľa potrebných pre polarizovateľnosti podľa vzorcov [III.] a [IV.]: Ako vedľajší produkt uvádzame v tabuľke 4 aj celkové hodnoty dipólových momentov, pretože pre C₂F ich môžeme rámcovo porovnať s dipólovým momentom, ktorý publikovali Tarroni, Palmieri a Rosmus [6]. Zhoda je veľmi dobrá.

Tab. 3 Prehľad dominantných konfigurácií pre C₂F a C₃F s absolútnou hodnotou CI koeficientov väčšou ako 0,1.

Konfigurácia (aktívne MO)	C _i
C₂F	
...4σ ² 5σ ² 6σ ² 7σ ² 8σ ² 9σ [↑] 10σ ⁰ ... ⊕ 1π ² 2π ² 3π ⁰ ...	0.9122
...4σ ² 5σ ² 6σ ² 7σ ² 8σ ² 9σ [↑] 10σ ⁰ ... ⊕ 1π ² 2π ⁰ 3π ² ...	0.1247
...4σ ² 5σ ² 6σ ² 7σ ² 8σ ² 9σ ⁰ 10σ [↑] ... ⊕ 1π ² 2π ⁰ 3π ² ...	0.1761
...4σ ² 5σ ² 6σ ² 7σ ² 8σ ⁰ 9σ ² 10σ [↑] ... ⊕ 1π ² 2π ² 3π ⁰ ...	0.1353
C₃F	
...9σ ² 10σ ² 11σ ² 12σ [↑] 13σ ⁰ ... ⊕ 1π ² 2π ² 3π ⁰ ...	0.9211
..9σ ² 10σ ² 11σ ² 12σ [↑] 13σ ⁰ ... ⊕ 1π ² 2π ⁰ 3π ² ...	0.1311
..9σ ² 10σ ² 11σ [↑] 12σ ² 13σ ⁰ ... ⊕ 1π ² 2π ² 3π ⁰ ...	0.1048
..9σ ² 10σ ² 11σ [↑] 12σ [↓] 13σ [↑] ... ⊕ 1π ² 2π ² 3π ⁰ ...	0.1224

Tab. 4 Polarizovateľností pre radikály C₂F a C₃F s extrapoláciou na nekonečnú bázu (CBS) a dipólové momenty pre C₂F.

Báza	C ₂ F		C ₃ F
	α [a.u.]	μ [D]	α [a.u.]
aug-cc-pVTZ	30.55	0.9690	40.500
aug-cc-pVQZ	31.08	0.9843	40.512
aug-cc-pV5Z	31.16	0.9904	40.499
CBS(Q5)	31.26	0.9961	40.485
Ref. [6]		0.9742	

Záver

Experimentálne údaje dipólových polarizovateľností fluorovaných zlúčenín sú bohužiaľ veľmi málo dostupné. Avšak kvantovochemické výpočty tejto vlastnosti môžu dosahovať akceptovateľnú presnosť, pokiaľ sa použije dobrá kombinácia výpočtovej metódy a bázy. Výsledky našich výpočtov boli nedávno využité v práci, ktorá sa zaoberala vysokoteplotnými zmesami plynov F_2 , CF_4 , C_2F_2 , C_2F_4 , C_3F_6 a C_3F_8 . [10] Naším zámerom do budúcnosti je poskytnúť výsledky dipólových polarizovateľností študovaných systémov a ich analógov s dobrou presnosťou a spoľahlivosťou, vhodných pre aplikáciu v modelovaní termodynamických a transportných vlastností vysokoteplotnej plazmy, predovšetkým pre také fragmenty zlúčenín uhlíka a fluóru, kde chýbajú experimentálne dáta.

Pod'akovanie

Táto práca bola realizovaná s pomocou Agentúry pre podporu výskumu a vývoja, kontrakt APVV-0059-10 a Agentúry VEGA, projekt 1/0430/13. Autori ďakujú dr. Wang Wei Zongovi z Univerzity v Liverpoole za podnetné diskusie.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Wright M. J., Bose D., Palmer G. E., Levin E. (2005) *AIAA Journal* 43, p. 2558
- [2] Kovitya P. (1984) *IEEE Transactions on Plasma Science* 12, p. 38
- [3] Éhn L., Černušák I., Neogrády P. (2009) *Croat. Chem. Acta* 82, p. 253
- [4] G. Karlström, R. Lindh, P.-Å. Malmqvist, B. O. Roos, U. Ryde, V. Veryazov, P.-O. Widmark, M. Cossi, B. Schimmelpfennig, P. Neogrady, and L. Seijo. (2003) *Comput. Mat. Sci.*, 28, p. 222
- [5] Andersson K., Malmqvist P.-Å., Roos B. O. (1992) *J. Chem. Phys.*, 96, p. 1218
- [6] Tarroni R., Palmieri P., Rosmus P. (1996) *Int. J. Quantum Chem.* 60, p. 467
- [7] Malmqvist P.-Å., Rendell A., Roos B. O. (1990) *J. Phys. Chem.* 94, p. 5477
- [8] Woon D. E.; Dunning T. H., Jr. (1994) *J. Chem. Phys.* 100, p. 2975
- [9] Maroulis G., (1998) *J. Chem. Phys.* 108, p. 5432
- [10] Wang W. Z., Wu Y., Rong M. Z., Éhn L., Černušák I., (2012) *J. Phys. D: Appl. Phys.* 45 p. 285201

Syntetické imínové antioxidanty podobné resveratrolu

Viktória Ferenczy, Peter Kotora, Juraj Adamuščin

*Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Chemický Ústav, Mlynská dolina, 842 15
Bratislava, Slovenská Republika; viktoria.ferenczy@gmail.com*

Abstrakt

Antioxidants limit the overall process of oxidation, where they occur. Consumption of these substances has a positive effect on the human body, which is every day exposed to the oxidative stress. They are widely used in living organisms, but also in food industry.

The aim of this work was the preparation and review of the antioxidant activity of synthetically prepared antioxidants - hydroxyimines, and their starting materials - hydroxybenzaldehydes and aminophenols. The antioxidant activity was tested by the method of trapping DPPH radicals. Antioxidant activity of the studied aldehydes was in the range of almost four orders of magnitude, aminophenol almost two orders of magnitude.

In this work we prepared 27 imine compounds, by which we measured the antioxidant activity. 16 of these prepared hydroxyimines had higher free radicals trapping ability as our reference molecule, resveratrol, and 11 of them had lower ability. To confirm the structures of imines ^1H NMR spectroscopy was used.

KLúčové slová: aminofenol; hydroxybenzaldehyd; antioxidačná aktivita; resveratrol; imín

Úvod a formulácia cieľa

Antioxidant sa najčastejšie definuje ako látka, ktorej molekuly obmedzujú aktivitu kyslíkatých molekúl, čím môžu znižovať pravdepodobnosť vzniku takýchto molekúl, alebo ich dostať do menej aktívneho, prípadne až do neaktívneho stavu. Antioxidanty celkovo obmedzujú proces oxidácie tam, kde sa vyskytujú. Konzumovanie takýchto látok pôsobí priaznivo na ľudský organizmus, ktorý je každý deň vystavovaný oxidačnému stresu, nakoľko žijeme v kyslíkovej atmosfére. Tento oxidačný stres môže byť teda eliminovaný antioxidantmi. Majú široké použitie, jednak v živých organizmoch, ale aj v priemysle a potravinárstve. Preto je náležité hľadať nové prírodné aj syntetické antioxidanty.

Teóriu voľných radikálov prezentoval už v roku 1954 profesor Denham Harman [1, 2]. Tak, ako väčšina veľkých objavov, aj táto teória bola spočiatku zaznávaná. Koncom šesťdesiatych rokov minulého storočia ju však podporili viaceré štúdie. Podľa tejto teórie sa predpokladá, že v organizme začína proces starnutia vtedy, keď sú jeho bunky poškodzované nestabilnými voľnými radikálmi. Teória dokonca predpokladá, že pri narušení rovnováhy tráviacich funkcií organizmu klesá jeho obranyschopnosť voči oxidačnému stresu spôsobenému voľnými radikálmi.

V súčasnej dobe sa nedá o tom pochybovať, že voľné radikály hrajú dôležitú úlohu v živých organizmoch, pretože vznikajú pri mnohých biochemických procesoch v bunke (napr. dýchanie, trávenie a podobne). Organizmus sa ale môže brániť, pretože antioxidačné enzýmy

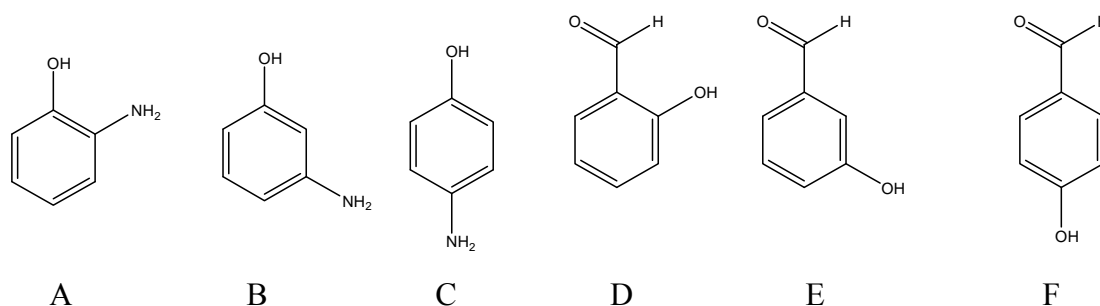
(superoxiddismutáza, glutationperoxidáza, kataláza) fungujú spoločne a deaktivujú voľné radikály. Použitie antioxidantov vzrastá vďaka ich mnohostrannému využitiu na elimináciu škodlivého efektu oxidačného stresu. 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazilový radikál (DPPH \cdot) umožňuje uskutočniť jednoduchý test na určenie antioxidačných účinkov rôznych zlúčenín. DPPH test sa bežne používa na posúdenie vychytávania voľných radikálov antioxidantom [3].

Zdroje voľných radikálov pri súčasnom spôsobe života sústavne narastajú. Napriek tomu, že sa antioxidanty nachádzajú v prirodzenej forme v niektorých druhoch potravín, dokonca ich produkuje aj samotný organizmus, avšak toto množstvo nie vždy postačuje. Organizmus potrebuje pomoc pravidelným dodávaním antioxidantov vo forme čerstvého ovocia a zeleniny, ale aj vo forme rôznych výživových a liečebných doplnkov. Synteticky pripravené imínové analógy prírodného resveratrolu môžu byť jednou z možností potlačania vplyvu voľných radikálov na organizmus.

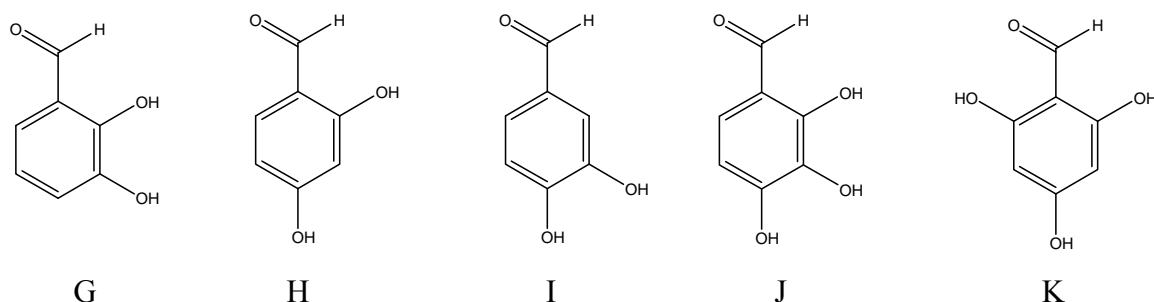
Cieľom práce bolo otestovať antioxidačnú aktivitu východiskových látok ako aj produktov ich reakcií. Následne sa namerané hodnoty porovnali s referenčnou molekulou resveratrolu.

Materiál a metódy

Ako východiskové látky boli použité 2-, 3- a 4-aminofenol, 2-, 3- a 4-hydroxybenzaldehyd, 2,3-, 2,4-, 2,5- a 3,4-dihydroxybenzaldehyd, 2,3,4- a 2,4,6-trihydroxybenzaldehyd (Obr. 1, Obr. 2). Na samotný test bol použitý metanol a 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazilový radikál (DPPH \cdot).



Obr.1 Štruktúrne vzorce východiskových látok A) 2-aminofenol (2-AMP), B) 3-aminofenol (3-AMP), C) 4-aminofenol (4-AMP), D) 2-hydroxybenzaldehyd (2-HBA), E) 3-hydroxybenzaldehyd (3-HBA), F) 4-hydroxybenzaldehyd (4-HBA)

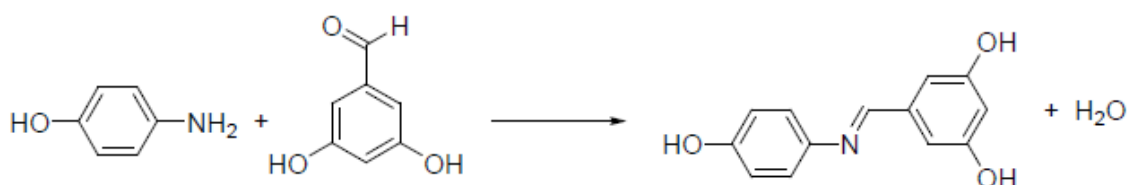


Obr. 2 Štruktúrne vzorce východiskových látok G) 2,3-dihydroxybenzaldehyd (2,3-HBA), H) 2,4-dihydroxybenzaldehyd (2,4-HBA), I) 3,4-dihydroxybenzaldehyd (3,4-HBA), J) 2,3,4-trihydroxybenzaldehyd (2,3,4-HBA), K) 2,4,6-trihydroxybenzaldehyd (2,4,6-HBA)

DPPH \cdot umožňuje uskutočniť jednoduchý test na určenie antioxidačných účinkov rôznych zlúčenín. DPPH test sa bežne používa na posúdenie vychytávania voľných radikálov antioxidantom [3].

DPPH \cdot je stabilným radikálom a v roztoku s metanolom má fialovú farbu, ktorá má absorpčné maximum pri 517 nm. Tento test je založený na tom, že DPPH \cdot prijme vodík z molekuly antioxidantu a tým sa DPPH \cdot redukuje na DPPH $_2$, čím sa mení farba z fialovej na žltú. Táto farebná zmena sa meria spektrofotometricky a z poklesu absorpcie pri 517 nm dokážeme určiť zvýšenie koncentrácie redukovanej formy DPPH $_2$. Táto metóda bola po prvýkrát predstavená Bolisom v roku 1958, kde DPPH \cdot prijal atóm vodíka z molekuly cysteínu [4,5].

Pri príprave imínových analógov resveratrolu sme postupovali tak, že sme si pripravili 2×10^{-3} molárne roztoky príslušných aminofenolov a hydroxybenzaldehydov v metanole. Pripravili sme zmesi každého aminofenolu s každým benzaldehydom. Po ich zmiešaní nám vznikla zrazenina, ktorú sme nechali pri laboratórnej teplote vysušiť. Vyzrážané kryštalické látky sme testovali ^1H NMR spektroskopiou, aby sme potvrdili ich štruktúru. Pre zistenie, či naše kryštály obsahujú aj nejaké izoméry, sme zmerali aj teploty topenia.



Obr. 3 Schéma reakcie 4-aminofenolu s 2,4-dihydroxybenzaldehydom za vzniku 5-((4-hydroxyfenylamino)metyl)benzén-1,3-diolu

Vyššie uvedenou reakciou sme získali zlúčeninu s imínovou skupinou, kde je cez dusík naviazaný hydroxyfenyl a cez uhlík na dvojitej väzbe je naviazaný mono-, di- alebo trihydroxyfenyl (Obr.3). Táto zlúčenina je štruktúrne podobná molekule resveratrolu a očakávali sme aj podobné antioxidačné vlastnosti.

Výsledky a diskusia

Študované aminofenoly sú veľmi účinné vychytávače DPPH· – rádovo pár mikromólov na mililiter 0,0001 mol/dm³ DPPH roztoku v metanole, čo je porovnateľné s účinnosťou známeho antioxidantu – kyseliny askorbovej ($SC_{50} = 12,55 \times 10^{-6}$) [6].

Takmer všetky nami pripravené deriváty imínov boli schopné účinnejšie vychytávať DPPH· ako pôvodné dihydroxybenzaldehydy, z ktorých boli pripravené. Na druhej strane, iba niektoré z novo pripravených imínov mali nižšiu hodnotu SC_{50} ako pôvodné aminofenoly, z ktorých boli pripravené. Za povšimnutie stojí skutočnosť, že imíny pripravené z 4-AMP + 4-HBA, 2-AMP + 3,4-HBA, 3-AMP + 3,4-HBA, 4-AMP + 3,4-HBA, 4-AMP + 2,3,4-HBA, 3-AMP + 2,4,6-HBA mali vyššiu účinnosť vychytávania DPPH· ako samotné aminofenoly a hydroxybenzaldehydy, z ktorých boli vytvorené.

Z novo pripravených imínov bol najúčinnjší imín pripravený z 3-AMP + 3,4-HBA, ktorý 7-krát účinnejšie vychytával DPPH· ako resveratrol. Hodnota SC_{50} pre resveratrol je $26,28 \times 10^{-6}$ mol/dm³ [7].

Tab. 1 Hodnoty SC_{50} pre základné aminofenoly a hydroxybenzaldehydy

Zlúčenina	SC_{50} [g/ml]	SC_{50} [mol/dm ³]	R2
2-AMP	$7,52 \times 10^{-7}$	$6,89 \times 10^{-6}$	0,99468
3-AMP	$2,277 \times 10^{-6}$	$2,09 \times 10^{-5}$	0,59628
4-AMP	$2,59 \times 10^{-6}$	$2,37 \times 10^{-5}$	0,98319
2-HBA	$4,42 \times 10^{-3}$	$3,62 \times 10^{-2}$	0,80692
3-HBA	$3,05 \times 10^{-3}$	$2,49 \times 10^{-2}$	0,02482
4-HBA	$9,6 \times 10^{-7}$	$7,86 \times 10^{-6}$	0,96024
2,3-HBA	$2,34 \times 10^{-6}$	$1,69 \times 10^{-5}$	0,99906
2,4-HBA	$7,93 \times 10^{-4}$	$5,74 \times 10^{-3}$	0,46062
2,5-HBA	$1,25 \times 10^{-6}$	$9,05 \times 10^{-6}$	0,99683
3,4-HBA	$1,27 \times 10^{-6}$	$9,19 \times 10^{-6}$	0,99025
2,3,4-HBA	$1,47 \times 10^{-6}$	$9,54 \times 10^{-6}$	0,96002
2,4,6-HBA	$4,208 \times 10^{-6}$	$2,73 \times 10^{-5}$	0,40628

Tab. 2 Hodnoty SC_{50} imínových produktov

Produkt	SC_{50} [g/ml]	SC_{50} [mol/dm ³]	R^2
2-AMP + 2-HBA	$3,61 \times 10^{-5}$	$1,69 \times 10^{-4}$	0,7301
3-AMP + 2-HBA	$1,21 \times 10^{-4}$	$5,6 \times 10^{-4}$	0,8932
4-AMP + 2-HBA	$4,43 \times 10^{-4}$	$2,07 \times 10^{-3}$	0,9899
2-AMP + 3-HBA	$8,16 \times 10^{-6}$	$3,82 \times 10^{-5}$	0,9632
3-AMP + 3-HBA	$4,15 \times 10^{-5}$	$1,95 \times 10^{-4}$	0,9036
4-AMP + 3-HBA	$1,07 \times 10^{-6}$	$5,02 \times 10^{-6}$	0,9573
2-AMP + 4-HBA	3×10^{-6}	$1,41 \times 10^{-5}$	0,9625
3-AMP + 4-HBA	$2,37 \times 10^{-5}$	$1,11 \times 10^{-4}$	0,8557
4-AMP + 4-HBA	$9,62 \times 10^{-7}$	$4,51 \times 10^{-6}$	0,9892
2-AMP + 2,3-HBA	$2,213 \times 10^{-6}$	$9,64 \times 10^{-6}$	0,97716
3-AMP + 2,3-HBA	$1,77 \times 10^{-6}$	$7,72 \times 10^{-6}$	0,8658
4-AMP + 2,3-HBA	$2,715 \times 10^{-6}$	$1,18 \times 10^{-5}$	0,34927
2-AMP + 2,4-HBA	$7,726 \times 10^{-6}$	$3,37 \times 10^{-5}$	0,98349
3-AMP + 2,4-HBA	$1,129 \times 10^{-4}$	$4,93 \times 10^{-4}$	0,97716
4-AMP + 2,4-HBA	$7,99 \times 10^{-6}$	$3,49 \times 10^{-5}$	0,99333
2-AMP + 2,5-HBA	$2,64 \times 10^{-6}$	$1,15 \times 10^{-5}$	0,99637
3-AMP + 2,5-HBA	$1,73 \times 10^{-6}$	$7,55 \times 10^{-6}$	0,94604
4-AMP + 2,5-HBA	$3,204 \times 10^{-6}$	$1,40 \times 10^{-5}$	0,986
2-AMP + 3,4-HBA	$1,173 \times 10^{-6}$	$5,10 \times 10^{-6}$	0,99556
3-AMP + 3,4-HBA	$8,568 \times 10^{-7}$	$3,74 \times 10^{-6}$	0,97749
4-AMP + 3,4-HBA	$1,725 \times 10^{-6}$	$7,55 \times 10^{-6}$	0,98985
2-AMP + 2,3,4-HBA	$2,66 \times 10^{-6}$	$1,08 \times 10^{-5}$	0,89457
3-AMP + 2,3,4-HBA	$8,67 \times 10^{-6}$	$3,54 \times 10^{-5}$	0,9098
4-AMP + 2,3,4-HBA	$1,786 \times 10^{-6}$	$7,30 \times 10^{-6}$	0,96894
2-AMP + 2,4,6-HBA	$4,54 \times 10^{-6}$	$1,85 \times 10^{-5}$	0,80031
3-AMP + 2,4,6-HBA	$4,52 \times 10^{-6}$	$1,84 \times 10^{-5}$	0,946
4-AMP + 2,4,6-HBA	$8,03 \times 10^{-6}$	$3,27 \times 10^{-5}$	0,8608

Záver

Na základe získaných experimentálnych výsledkov a výsledkov testovania antioxidačných vlastností pripravených imínových analógov resveratrolu možno formulovať nasledovné závery:

Antioxidačnú aktivitu vybraných aminofenolov a hydroxybenzaldehydov sme otestovali metódou vychytávania DPPH[•] radikálov. Študované aminofenoly mali pomerne vysokú antioxidačnú aktivitu na úrovni známeho antioxidantu kyseliny askorbovej (vitamínu C). Antioxidačná aktivita študovaných aldehydov bola v rozmedzí takmer 4 rádo. Najúčinnjšími vychytávačmi DPPH[•] boli 4-HBA, 2,5-HBA, 3,4-HBA a 2,3,4-HBA, ktoré boli na úrovni účinnosti kyseliny askorbovej (vitamínu C).

Z vyššie uvedených aminofenolov a hydroxybenzaldehydov sme pripravili 27 hydroxy derivátov imínov. Pripravené imíny sme ocharakterizovali ich bodmi tavenia a ^1H NMR spektrami.

Antioxidačnú aktivitu 27 pripravených hydroxyimínov sme otestovali metódou vychytávania DPPH \cdot . Ich antioxidačná aktivita bola v rozmedzí 3 rádoov. Najlepšie antioxidačné účinky má produkt reakcie 3-aminofenolu s 3,4-dihydroxybenzaldehydom s hodnotou $\text{SC}_{50} = 3,74 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ a najslabšie účinky má produkt reakcie 4-aminofenolu s 2-hydroxybenzaldehydom s hodnotou $\text{SC}_{50} = 2,0710^{-3} \text{ mol/dm}^3$. Z novo pripravených imínov bol najúčinnjší imín pripravený z 3-aminofenolu a 3,4-dihydroxybenzaldehydu, ktorý 7-krát účinnejšie vychytával DPPH radikály ako resveratrol. Vyššiu oxidačnú aktivitu ako resveratrol malo aj 16 ďalších novo pripravených hydroxyimínov.

Výsledkom tejto práce bola príprava syntetických antioxidantov podobných resveratrolu z pôvodných látok toxických pre ľudský organizmus.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Harman, D. (1956) J. Gerontol. 11(3) p. 298
- [2] Harman, D. (1972) J. Am. Geriatr. Soc. 20(4) p. 145
- [3] Cheng, Z., Moore, J., & Yu, L. (2006) J. Agric. Food. Chem. 54 p. 7429
- [4] Molyneux, P. (2004) Songklanakarin J. Sci. Technol., 26 p. 211
- [5] Mishra, K., Ojha, H., Chaudhury, N.K. (2012) Food Chem., 130 p. 1036
- [6] Mučaji P., Haladová M., Eisenreichová E., Šeršeň F., Ubik K., Grančai D. (2007) Čes. Slov. Farm. 56 p. 27
- [7] Šeršeň F., Walko M., Loos D. (2009) Gen. Physiol. Biophys., 28 p. 210

Imunomodulačné vlastnosti pripravených glykokonjugátov pozostávajúcich z detoxikovanej molekuly lipopolysacharidu *V. cholerae* O139 a proteínového nosiča

Anna Fleischhackerová, Slavomír Bystrický

Slovenská akadémia vied, Chemický ústav, Oddelenie imunochémie a glykokonjugátov, Dúbravská cesta 9, Bratislava, Slovenská republika; chemflei@savba.sk

Abstrakt

Vibrio cholerae O139 serotype was used as a source of lipopolysaccharide (LPS). After detoxication procedure, detoxified LPS (dLPS) was used for preparation of two glycoconjugates. The immunogenicities (induced IgM, IgG, IgA antibodies) of conjugates and cytokines secretion were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Conjugates elicited higher levels of specific anti-LPS IgG and IgM antibodies in comparison with preimmune serum and control group.

Kľúčové slová: *Vibrio cholerae*; lipopolysacharid; konjugáty; protilátky; cytokíny

ÚVOD A FORMULÁCIA CIEĽA

Jedným z najväčších úspechov v imunológii je moderná subcelulárna vakcína, ktorá by indukovala rýchlu a účinnú obranu hostiteľa voči útoku mikrobiálnych patogénov. Príprava takýchto vakcín spočíva v naviazaní povrchových oligo- alebo polysacharidových štruktúr na proteínový nosič (tzv. glykokonjugátové konštrukty) [1], pričom je potrebné vziať do úvahy viaceré kritériá, z ktorých najdôležitejšie je využiť dominantný epitop pochádzajúci z pôvodného patogénu. Významným a dominantným imunogénnym faktorom *V. cholerae* sú povrchové endotoxíny – lipopolysacharidy.

Vo všeobecnosti stále platí, že pre indukovanie účinnej dlhodobej imunitnej ochrany je nevyhnutná účasť T-lymfocytov. Glykokonjugáty sa osvedčili ako efektívne látky v indukovaní T - lymfocyt závislej imunity.

Jedným z dôvodov, pre ktorý je riešenie cholerových ochorení stále viac a viac naliehavé, sú nové rezistentné mutantné kmene, ako aj objavenie sa nových patogénnych kmeňov, najmä *V. cholerae* O139.

Hoci je tento nový sérotyp v centre súčasného výskumu [2], málo laboratórií sa zaoberá prípravou konjugovanej vakcíny. Prvé práce sa týkali testovaním celých inaktivovaných alebo oslabených buniek *V. cholerae* O139 [3]. Prípravou subcelulárnych glykokonjugátov sa zaoberali dve laboratóriá, NIH v USA a Pasteurov inštitút vo Francúzsku, kde bol použitý kapsulárny polysacharid (CPS) kmeňa *V. cholerae* O139, ktorý sa kovalentne naviazal na kurací sérový albumín, rozdielne boli schémy syntézy konjugátov [4]. Pripravené

glykokonjugáty síce indukovali tvorbu špecifických IgG s vibriocídnou aktivitou voči silno enkapsulovaným baktériám, avšak samotný CPS nevyvolal žiadnu odpoveď. Iné laboratóriá sa zaoberali zabudovaním detoxikovaného LPS (dLPS, O-špecifického oligosacharidu s intaktným jadrom, tzv, kyslá detoxikácia) do glykokonjugátu [5]. Štúdiom lipopolysacharidov sa došlo k záveru, že sú dominantným imunogénnym faktorom a najúčinnějšíu ochranu hostiteľa voči patogénu zabezpečili práve špecifické anti-LPS protilátky. Práve táto skutočnosť sa stala hlavným zdrojom nášho záujmu. Na konštrukciu glykokonjugátu sme použili celú molekulu LPS *V. cholerae* O139 detoxikovanú hydrazínom (tzv. deOAc LPS).

Jedným z našich cieľov bolo sledovanie hladín celkových ako aj LPS – špecifických protilátok triedy IgG, IgM a IgA počas imunizácie, ako aj sledovanie hladín vybraných cytokínov (IFN γ , TNF α , IL – 4, IL -6, IL – 10 a IL -12) v sérach pomocou metódy ELISA.

Materiál a metódy

Imunizácia laboratórných zvierat a kolekcia sér

Laboratórnym zvieratám (6-8 týždňové samičky Balb/c myši, Velaz, ČR) sa aplikovali nasledovné látky:

- ☞ **Roztoky pripravených konjugátov: K1, K2** (2,5 μ g sacharidu/dávka)
- ☞ **Roztok dLPS** (2,5 μ g sacharidu/ dávka)
- ☞ **Kontrola** (fyziologický roztok)

Zvieratá sa rozdelili do skupín po 10 myši. Každéj skupine sa aplikovala daná látka. Každý typ látky bol podávaný subkutánne v dvojtýždňových intervaloch a každá látka bola aplikovaná trikrát (100 μ L). Odber krvi sa uskutočnil do odberových ampuliek pre sérum v dvojtýždňových intervaloch a následne 5 týždňov po podaní 3. dávky. Preimúnne sérum sa získalo z krvi desiatich myši, odobratej pred imunizáciou.

Enzýmová imunoabsorpčná analýza (ELISA)

Na stanovenie LPS - špecifických protilátok tried IgM, IgG a IgA, ktoré boli indukované aplikáciou konjugátu, alebo čistého sacharidu (dLPS), bola použitá metóda ELISA. Postup pozostával z nasledujúcich krokov: viazanie antigénu (LPS), sýtenie mliekom, viazanie primárnej protilátky (sérum), aplikácia sekundárnej protilátky značenej alkalickou fosfatázou, následne prídanie substrátu (vyvíjanie) a v poslednom rade zastavenie reakcie prídanim 2,5 % (w/v) Na₂EDTA . 2H₂O.

Stanovenie cytokínov

Na stanovenie cytokínov, ktoré boli indukované po aplikácii konjugátov a dLPS, bola použitá metóda ELISA s využitím komerčne dostupných kitov (BioLegend, USA), ktorá predstavuje kvantitatívne stanovenie myších IFN - γ , TNF - α , IL - 4, IL - 6, IL - 10 a IL - 12 v sére.

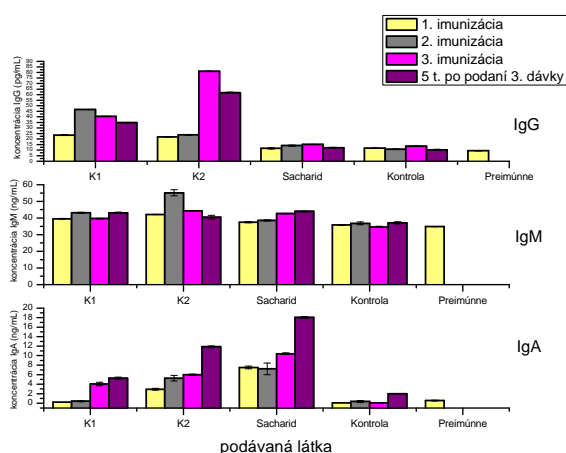
Výsledky a diskusia

Stanovenie hladiny LPS - špecifických protilátok v sérach experimentálnych zvierat

V experimente sa imunizovali myši-samice BALB/c konjugátmi K1 a K2. Uvedené látky sa aplikovali v dvojtýždňových intervaloch v dávkach 100 μ L o koncentrácii sacharidového antigénu 2,5 μ g/ 100 μ L, pričom sa sledovala tvorba LPS – špecifických protilátok IgG, IgM a IgA.

Anti – LPS IgG

V prípade oboch aplikovaných konjugátov sa prejavili výrazné imunostimulačné vlastnosti „Obr.1“. Sérové hladiny IgG po 3. subkutánnej aplikácii konjugátu K1 boli 4,5 – krát vyššie a u konjugátu K2 boli dokonca 8,6 – krát vyššie ako v preimúnnom sére. Porovnaním hladín IgG v sére kontroly (fyziologický roztok) sa zistilo, že hladina IgG po 3. subkutánnej aplikácii konjugátu K1 bola 3-krát vyššia a konjugátu K2 až 6- krát vyššia. Zvýšené hladiny anti- LPS IgG protilátok pretrvávali aj 5 týždňov po podaní 3. injekcie, kde sérové hladiny IgG u konjugátu K1 boli 3,7 – krát vyššie a u konjugátu K2 až 6,8 – krát vyššie v porovnaní s preimúnnym sérom (u konjugátu K1 boli 3,4 – krát vyššie a u konjugátu K2 až 6,1 – krát vyššie v porovnaní s kontrolou).



Obr. 1 Indukcia Ig protilátkovej LPS - špecifickej odpovede.

Anti – LPS IgM

V prípade IgM protilátok, len konjugát K2 po podaní 2. injekcie vyvolal štatisticky významnú IgM protilátkovú odpoveď, a to 1,6 – krát vyššiu v porovnaní s preimúnnym sérom „**Obr. 1**“. Konjugát K2 indukoval nižšie sérové hladiny IgM (44,33 ng/mL) v porovnaní s IgG (81,09 ng/mL) po 3. subkutánnej aplikácii. Nižšie sérové hladiny IgM (40,46 ng/mL) v porovnaní s IgG (61,78 ng/mL) sa zaznamenali aj 5 týždňov po podaní 3. injekcie. Klesajúca tendencia sérových hladín IgM po 3. injekcii konjugátom K2 a zároveň nárast hladiny IgG po 3. injekcii by mohlo znamenať („switch“) prepnutie protilátkovej triedy IgM na IgG.

Anti – LPS IgA

Konjugát K2 indukoval štatisticky významný nárast hladín protilátok IgA v sére počas celej imunizácie „**Obr. 1**“. Po podaní 2. Dávky sa zaznamenal 9,5- násobný nárast, po podaní 3. dávky 10,9 – násobný nárast v porovnaní s preimúnnym sérom, pričom hladiny IgA sa stále zvyšovali a 5 týždňov po podaní 3. dávky boli už 21,6 – násobné vyššie ako hladiny IgA v preimúnnom sérum. Pri konjugáte K1 sa zaznamenalo zvýšenie hladín protilátok IgA až po podaní 3. dávky a tieto hladiny boli 7,3 – násobne vyššie v porovnaní s preimúnnym sérom. Podobne ako u konjugátu K2, aj pri konjugáte K1 zvýšenie hladín protilátok IgA pretrvávalo a 5. týždňov po podaní 3. dávky boli 9,5 – krát vyššie ako v preimúnnom sére.

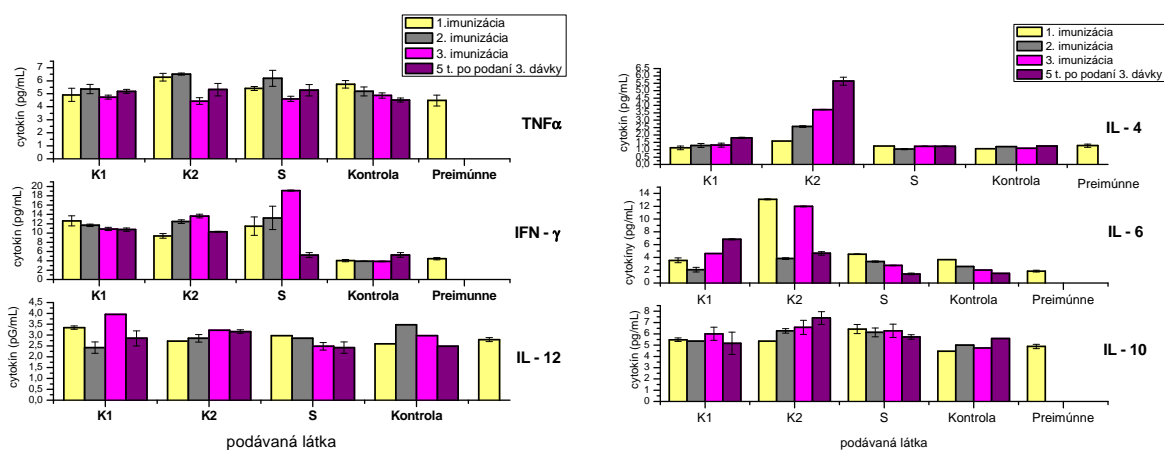
Indukcia produkcie cytokínov IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10 a IL – 12 konjugátmi

Pre zhodnotenie účinku konjugátov na báze LPS *V. cholerae* O139 ako najvhodnejšieho imunomodulátora sa stanovili hladiny vybraných cytokínov, reprezentujúcich T_H1 (IFN γ , IL -12, čiastočne TNF α) a T_H2 (IL – 4, IL – 6, čiastočne IL – 10) imunitnú odpoveď, prozápalových cytokínov IL-6 a TNF- α , a ako protizápalový cytokín IL - 10. Vybrané skupiny cytokínov súčasne reprezentujú cytokíny regulujúce špecifickú imunitu (IL-4, IFN- γ) a cytokíny riadiace efektorové mechanizmy prirodzenej imunity (IFN- γ , IL-6, TNF- α). Sérové hladiny jednotlivých cytokínov v závislosti od typu podávanej látky počas imunizácií sú znázornené na „**Obr. 2**“.

TNF α , IFN γ a IL -12

Cytokíny TNF α , IFN γ a IL -12 patria do skupiny cytokínov, ktoré indukujú polarizáciu T-lymfocytov do T_H1 subpopulácie. Základná funkcia T_H1 buniek je spolupráca

s makrofágmi a ich stimulácia k premene na aktivované makrofágy. Konjugáty K1 a K2, z vybraných cytokínov, indukovali zvýšenú sekréciu iba IFN γ už po prvej injekcii „**Obr. 2**“. V porovnaní s preimúnnym sérom, konjugát K1 indukoval po prvej injekcii 2,8- násobný nárast hladín IFN γ , po 2. injekcii 2,6- násobný nárast a po aplikácii 3. injekcii 2,4- násobný nárast, pričom aj 5 týždňov po aplikácii 3. injekcie hladina cytokínu naďalej klesala. Sérová hladina cytokínu IFN γ po imunizácii konjugátom K2 bola 2,8 – násobne vyššia po 2. injekcii, a 3,1 – násobne vyššia po aplikácii 3. injekcie, avšak po 5-týždňoch po aplikácii 3. dávky začala hladina cytokínu IFN γ klesať.



Obr. 2 Sérové hladiny cytokínov v závislosti od počtu imunizácií a typu podávanej látky.

IL -4, IL – 6 a IL – 10

Cytokíny IL – 4, IL – 6 a IL – 10 sú produkované T_H2 lymfocytmi a ich základnou funkciou je spolupráca s B – lymfocytmi, ktoré boli stimulované rozoznaním antigénu. Táto interakcia vedie k pomnoženiu daného klonu B- buniek a ich konečnej diferenciacii na plazmatické bunky produkujúce veľké množstvo protilátok. Konjugát K2 indukovali zvýšenú hladinu IL-6 už po 1. injekcii, a to 7 – násobne vyššie ako v preimúnnom sére, po 2. injekcii sa zaznamenal mierny pokles, a po aplikácii 3. dávky boli sérové hladiny 6,5 – násobne vyššie v porovnaní s preimúnnym sérom. Konjugát K1 indukoval zvýšené hladiny IL -6 po podaní 3. injekcie, pričom zvýšené hladiny pretrvávali. Štatisticky významný nárast sérových hladín IL – 4 bol zaznamenaný počas celej imunizácie len konjugátom K2. Po prvej dávke, v porovnaní s preimúnnym sérom bol zaznamenaný 1,5- násobný nárast, po 2. injekcii 2 – násobný nárast, po 3. injekcii 3 – násobný nárast, pričom hodnoty IL - 4 v sére stúpali aj po 5-týždňoch po podaní 3. dávky, a to až na 4,5 násobok v porovnaní s preimúnnym sérom. Imunizácia konjugátmi nevyvolala počas celej imunizácie významný nárast sérových hladín IL-10.

Záver

Imunogenicita pripravených konjugátov sa testovala na myšacom zvieracom modeli. Aplikáciou konjugátov K1 a K2 sa úspešne podarilo navodiť T - bunkovo závislú imunitnú odpoveď na základe stúpania hladín špecifických anti- LPS IgG. Imunizácia konjugátmi, na báze LPS *V. cholerae* O139, stimulovala tvorbu cytokínov ako IL – 4 a IL - 6, na základe ktorých sa usúdila predomnancia T_H2 - imunitnej odpovede. Záverom možno dodať, že *Vibrio cholerae* O139, sa ukázal ako vhodný modelový mikroorganizmus pre štúdium povrchových polysacharidov a následnú prípravu potenciálnej subcelulárnej vakcíny.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre Glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja, Centra Excelentnosti - Glycomed a Agentúry pre vedu a výskum (VEGA 2/0040/10)

Zoznam použitej literatúry

- [1] Lindberg A. A. (1999) Vaccine 17 (2), p. 28
- [2] Tacket C.O., Losonsky G., Nataro J.P. et al. (1995) J. Infect. Dis. 172(3), p. 883
- [3] Fournier J.M., Boutonnier, A. (2001) Conjugate vaccine composed of the polysaccharide moiety of the lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O139 bound to tetanus toxoid. PATENT WO/2002/080964
- [4] Kossaczka Z., Szu, S. C. (2000) Glycoconjugate J. 17(6), p.425
- [5] Boutonnier A., Villeneuve S., Nato, F. et al. (2001) Infect. Immun. 69(5), p. 3488

Niektoré štatistické spracovania parametrov taviaceho procesu skla, vzhľadom na početnosť chemických nehomogenít

Blanka Fusková

Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne, Fakulta priemyselných technológií v Púchove, Katedra materiálového inžinierstva, I. Krasku 491/30, 020 01 Púchov, Slovensko; blanka.fuskova@fpt.tnuni.sk

Abstrakt.

In the paper is referred to the correlation matrix of the absolute values of the coefficients of correlation of all pairs (p_i, p_j) measurements of parameters of smelters p_1, \dots, p_{18} and pairs (p_i, y) measurements of these parameters and measurement values of chemical inhomogeneities y . This matrix shows the degree of linear dependence of these measurements. The distribution of the chemical inhomogeneities values with respect to the individual parameter or parameters values is discussed.

Kľúčové slová: *Glass melting; chemical inhomogeneity (striae); correlation matrix*

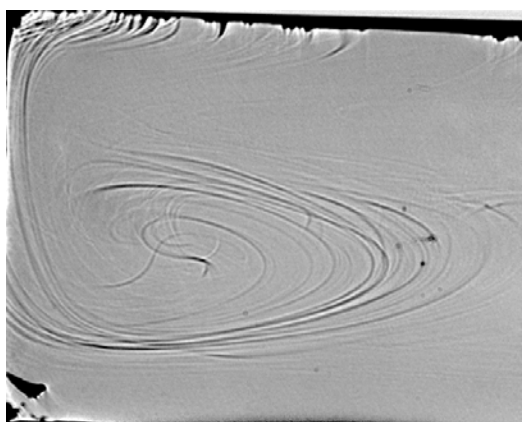
Úvod a formulácia cieľa

Aj keď v súčasnosti nastáva rozvoj nových materiálov, sklo je stále klasický materiál, ktorý má široké uplatnenie. Kvalita sklenených výrobkov závisí na množstve a druhu chýb v skle. Jednou z týchto chýb sú chemické nehomogenity (šlíry), ktoré sú jedným z faktorov ocenenia kvality produkcie sklárskeho priemyslu. Chemické nehomogenity vznikajú počas taviaceho procesu, ktorý je základným procesom pri výrobe skla, z rozpúšťania nepoddajného materiálu. Chemické nehomogenity a bubliny v sklenej tavenine, pôsobia na fyzikálne, chemické, mechanické a optické vlastnosti skleneného produktu a sú hlavnou zložkou nehomogenít v širokej škále prírodných a umelých vyrobených skiel a sú často zdrojom zlej kvality výrobkov zo skla [1].

Chemické nehomogenity sú definované ako sklené nerovnorodosti v skle líšiac sa od základného skla malým rozdielom zloženia. a dajú sa definovať aj ako úplne miešateľné sklené vmestky v okolitom skle, ktoré by sa pri taviacej teplote v okolitej sklovine rozpustili, avšak rovnako ako okolitá sklovina „zamrzli“ pri poklese teploty [2]. Ide o sklo, ktoré sa svojimi vlastnosťami líši od okolitého skla a teda je viditeľné. Od kamienkov sa líšia tým, že nejde o tuhé látky v skle, ale o sklené nekryštalické nerovnorodosti. Chemické nehomogenity, ktoré sa svojím zložením líšia od okolitého skla sa nazývajú chemické a chemické nehomogenity, ktoré sa svojím zložením nelíšia od okolitého skla sú chemické nehomogenity tepelné.

Chemické nehomogenity pôsobia na kvalitu sklenených výrobkov. Napríklad zhoršujú

optické vlastnosťami výrobkov. Pri výrobkoch na ktoré sa kladú najvyššie požiadavky, čo do optických vlastností je optické skreslenie nežiadúce. Príčinou skreslenia je gradient indexu lomu v skle spôsobený chemickou nehomogenitou. Nežiaduce je tiež napätie v skle spôsobené chemickými nehomogenitami. Medzi chemickými nehomogenitami a sklom môže vzniknúť vnútorné napätie aj pri výrobkoch dobre vychladených. Stáva sa to v tom prípade, že zloženie a teda aj teplotná rozťažnosť chemických nehomogenít sa líšia od okolitého skla. Tento rozdiel v teplotnej rozťažnosti spôsobuje, že obidve sklá sa pri ochladzovaní zmršťujú inak, čím môže dôjsť k praskaniu.



Obr. 1 Röntgenová snímka chemickej nehomogenity ukazujúca stuhnuté prúdenie vo vzorke [3]

Proces tavenia skla je energeticky veľmi náročný a keďže výrobky, ktoré systém kontroly vyraduje sa vracajú do výroby, je snaha taviaci proces optimalizovať s ohľadom na množstvo takto vznikajúcich chýb.

Chemické nehomogenity sú následkom nedostatočnej homogenizácie skloviny, vyplavovaním korózných produktov žiaromateriálov, z ktorých je taviaci agregát a jeho súčasti skonštruovaný, alebo následkom odparovania prchavých zložiek skloviny z hladiny taviaceho agregátu. Jednotlivé technologické parametre taviaceho procesu ovplyvňujú výskyt chemických nehomogenít jednak tým, že ovplyvňujú rýchlosť vzniku korózných produktov, avšak hlavne tým, že zapríčiňujú zmeny v prúde skloviny, ktoré vyúsťujú do vizuálnych prejavov chemických nehomogenít vo finálnych výrobkoch.

Veľký význam tu zohráva skúsenosť sklárov – technológov tavenia pri nastavení parametrov taviaceho procesu, ktoré sú dlhodobo sledované na úrovni technológov tavenia, pričom niektoré závislosti početností výskytu chemických nehomogenít od jednotlivých parametrov sú nachádzané intuitívne, prípadne jednoduchou lineárnou závislosťou. Tieto

intuitívne, resp. jednoduché binárne závislosti sú zaťažené veľkou neurčitosťou, nakoľko na sledovaný parameter početnosť výskytu chemickej nehomogenity nevplyva iba jeden z parametrov, ale viaceré parametre, ktorým prislúchajú rôzne váhy.

Cieľom tohto článku je na konkrétnych hodnotách parametrov taviaceho procesu použiť niektoré štatistické metódy, ktoré by boli aplikovateľné v praxi.

Materiál a metódy

Skúmajú sa vzťahy vybraných meraní parametrov taviaceho procesu a vzťahy a rozloženie týchto meraní parametrov k príslušnému meraniu hodnôt chemických nehomogenít, kde tieto nehomogenity sú merané na vysoko úžitkovom skle typu bárnatý kryštál. Taviaci agregát je typu horizontálny U - plameň vyhrievaný zemným plynom za použitia elektrického príhrevu. Parametre taviaceho procesu p_1, \dots, p_{18} sú popísané v nasledujúcej tabuľke.

Tab. 1 Popis parametrov p_1, \dots, p_{18} taviaceho procesu

p_1	prvá časť elektrického príhrevu. Hodnoty v [kW].
p_2	druhá časť elektrického príhrevu. Hodnoty v [kW].
p_3	hodnota aktuálneho odberu skloviny zo žľabu pre fúkací stroj (FS) linky 1 (L1) hodnota v tonách za 24h
p_4	hodnota aktuálneho odberu skloviny zo žľabu pre lisovací stroj (LS) linky 1 hodnota v tonách za 24h.
p_5	teplota prednej zóny žľabu pre FS L1
p_6	teplota zadnej zóny žľabu pre FS L1
p_7	teplota prednej zóny žľabu pre LS L1
p_8	teplota zadnej zóny žľabu pre LS L1
p_9	hodnota aktuálneho odberu skloviny zo žľabu pre fúkací stroj (FS) linky 2 (L2), hodnota v tonách za 24 h
p_{10}	hodnota aktuálneho odberu skloviny zo žľabu pre lisovací stroj (LS) linky 2, hodnota v tonách za 24 h
p_{11}	hodnota špecifickej hmotnosti [g/cm^3] odobratej vzorky skla z FS L1 meraná raz za 24 h
p_{12}	hodnota špecifickej hmotnosti [g/cm^3] odobratej vzorky skla z výtoku zariadenia na FS L1 meraná raz za 24 h
p_{13}	teplota meraná termočlánkom v dne taviacej časti vane
p_{14}	teplota meraná termočlánkom v dne taviacej časti vane
p_{15}	teplota meraná termočlánkom v dne taviacej časti vane
p_{16}	kontrolná teplota meraná obsluhou v taviacej časti vane min. šesť krát za 24h
p_{17}	teplota meraná pyrometrom (meraná v niekoľko sekundových intervaloch) v taviacej časti vane
p_{18}	teplota meraná termočlánkom v pracovnej časti vane

Hodnota početnosti chemických nehomogenít je označená symbolom y . Pre

simulovanie rôznych štatistických výpočtov bolo v rámci jedného mesiaca vybraných 187 meraní osemnástich parametrov taviaceho procesu a hodnôt chemických nehomogenít v hodinových odstupoch, pričom parametre, ktoré sa nemerajú každú hodinu boli hodinovo zlinearizované.

Výsledky a diskusia

Každý nameranej osemnástici $(p_{1,i}, \dots, p_{18,i})$ kde $i \in \{1, \dots, 187\}$, ktorá reprezentuje stav parametrov taviaceho procesu v danom čase, je priradená príslušná nameraná hodnota šlír, ktorá je označená znakom y_i . Nech

$$\mathbf{p}_1 = (p_{1,1}, \dots, p_{1,187}), \mathbf{p}_2 = (p_{2,1}, \dots, p_{2,187}), \dots, \mathbf{p}_{18} = (p_{18,1}, \dots, p_{18,187}), \mathbf{y} = (y_1, \dots, y_{187}). \quad [1.]$$

Nasledujúca matica, Tab. 2, je korelačná matica [4] absolútnych hodnôt koeficientov korelácie všetkých dvojíc (p_i, p_j) a dvojíc (p_i, y) , kde $i, j \in \{1, \dots, 18\}$ meraných taviacich parametrov p_1, \dots, p_{18} a hodnôt šlír y . Ukazuje mieru lineárnej závislosti medzi jednotlivými meraniami parametrov p_1, \dots, p_{18} a medzi jednotlivými meraniami týchto parametrov a meraniami šlír. Tabuľka ukazuje že miera lineárnej závislosti medzi jednotlivými meraniami parametrov p_1 až p_{18} a medzi meraniami chemických nehomogenít y je vo všetkých osemnástich prípadoch menšia ako 0,3, teda lineárna závislosť medzi jednotlivými meraniami týchto parametrov a meraniami šlír je veľmi nízka čo neznamena, že neexistuje iná závislosť. Z tejto matice je možné taktiež vyhodnotiť mieru lineárnej závislosti meraní jednotlivých parametrov. Merania parametrov p_7 a p_8 vykazujú najvyššiu lineárnu tesnosť.

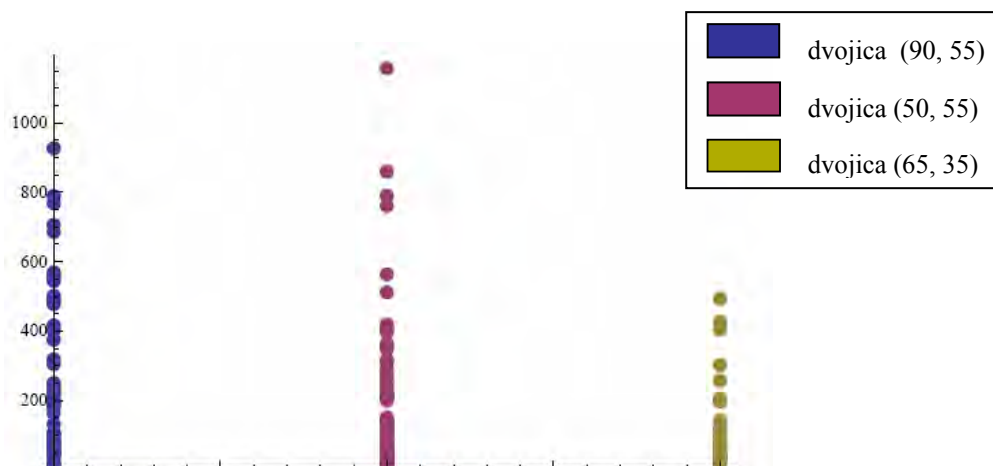
Tab. 2 Korelačná matica parametrov tavenia a chemických nehomogenít

	p_1	p_2	p_3	p_4	p_5	p_6	p_7	p_8	p_9	p_{10}	p_{11}	p_{12}	p_{13}	p_{14}	p_{15}	p_{16}	p_{17}	p_{18}	y
p_1	1	0,02	0,13	0,01	0,02	0,12	0,72	0,71	0,14	0,86	0,06	0,16	0,85	0,7	0,6	0,7	0,16	0,54	0,14
p_2	0,02	1	0,24	0,25	0,29	0,06	0,19	0,2	0,49	0,03	0,13	0,43	0,24	0,48	0,54	0,01	0,1	0,57	0,17
p_3	0,13	0,24	1	0,96	0,92	0,03	0,24	0,24	0,04	0,18	0,15	0,19	0,31	0,43	0,47	0,24	0,12	0,47	0,28
p_4	0,01	0,25	0,96	1	0,88	0,08	0,43	0,44	0,02	0,04	0,18	0,20	0,14	0,27	0,32	0,15	0,06	0,33	0,28
p_5	0,02	0,29	0,92	0,88	1	0,07	0,26	0,27	0,13	0,01	0,16	0,3	0,19	0,35	0,42	0,12	0,1	0,45	0,25
p_6	0,12	0,06	0,03	0,08	0,07	1	0,1	0,1	0,15	0,13	0,15	0,08	0,07	0,02	0,05	0,11	0,12	0,04	0,04
p_7	0,72	0,19	0,24	0,43	0,26	0,1	1	1	0,22	0,55	0,00	0,04	0,63	0,59	0,54	0,39	0,03	0,48	0,03
p_8	0,71	0,2	0,24	0,44	0,27	0,1	1	1	0,24	0,56	0,01	0,06	0,63	0,59	0,54	0,38	0,04	0,49	0,02
p_9	0,14	0,49	0,04	0,02	0,13	0,15	0,22	0,24	1	0,27	0,07	0,26	0,03	0,19	0,27	0,2	0,11	0,31	0,05
p_{10}	0,86	0,03	0,18	0,04	0,01	0,13	0,55	0,56	0,27	1	0,12	0,29	0,88	0,73	0,66	0,71	0,31	0,55	0,09
p_{11}	0,06	0,13	0,15	0,18	0,16	0,15	0,00	0,01	0,07	0,12	1	0,17	0,11	0,07	0,04	0,04	0,24	0,003	0,12
p_{12}	0,16	0,43	0,19	0,2	0,3	0,08	0,04	0,06	0,26	0,29	0,17	1	0,01	0,13	0,17	0,06	0,09	0,17	0,11
p_{13}	0,85	0,24	0,31	0,14	0,19	0,07	0,63	0,63	0,03	0,88	0,11	0,01	1	0,93	0,87	0,7	0,26	0,78	0,14

p_{14}	0,7	0,48	0,43	0,27	0,35	0,02	0,59	0,59	0,19	0,73	0,07	0,13	0,93	1	0,97	0,6	0,25	0,92	0,16
p_{15}	0,64	0,54	0,47	0,32	0,42	0,05	0,54	0,54	0,27	0,66	0,04	0,17	0,87	0,97	1	0,53	0,23	0,97	0,18
p_{16}	0,71	0,01	0,24	0,15	0,12	0,11	0,39	0,38	0,2	0,71	0,04	0,06	0,7	0,6	0,53	1	0,37	0,41	0,15
p_{17}	0,16	0,1	0,12	0,06	0,1	0,12	0,03	0,04	0,11	0,31	0,24	0,09	0,26	0,25	0,23	0,37	1	0,23	0,00
p_{18}	0,54	0,57	0,47	0,33	0,45	0,04	0,48	0,49	0,31	0,55	0,00	0,17	0,78	0,92	0,97	0,41	0,23	1	0,15
y	0,14	0,17	0,28	0,28	0,25	0,04	0,03	0,02	0,05	0,09	0,12	0,11	0,14	0,16	0,18	0,15	0,00	0,15	1

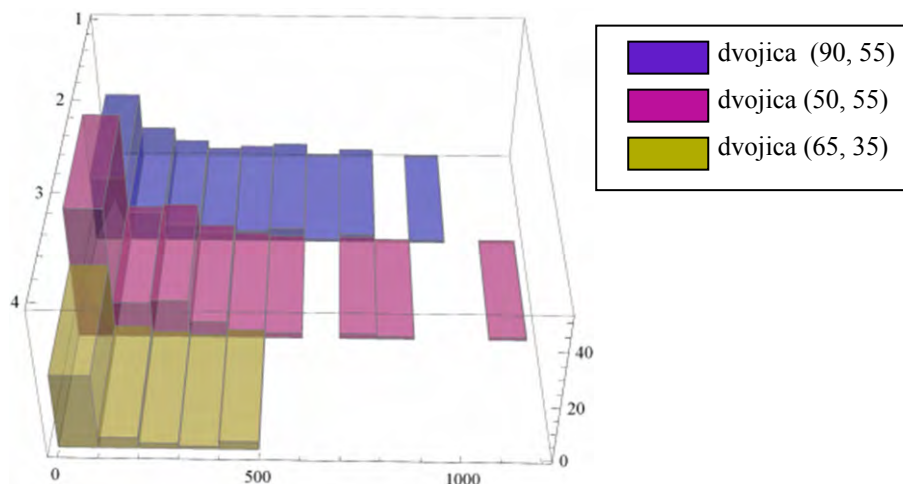
V rámci skúmania vzťahu jednotlivých parametrov a početnosti chemických nehomogenít je možné pre potreby sklárov - technológov sledovať rozloženie hodnôt chemických nehomogenít vzhľadom na jednotlivé hodnoty konkrétneho parametra alebo parametrov. Toto rozloženie je možné pre konkrétne potreby technológov vyjadriť graficky rôznymi spôsobmi. Pre toto rozloženie boli vybrané dva parametre p_1 a p_2 . Parameter p_1 nadobúda počas 187 meraní tri hodnoty: 50, 65, a 90 a parameter p_2 dve hodnoty: 35 a 55. Teoreticky môže byť dvojíc (p_1, p_2), ak prvá nadobúda tri hodnoty a druhá dve, šesť. Počas 187 meraní v našom prípade nastanú iba tieto prípady: (90, 55), (50, 55) a (65, 35). Počas 187 meraní dvojica (90, 55) nastane 58 krát, dvojica (50, 55) 89 krát a dvojica (65, 35) 40 krát.

Nasledujúci obrázok ukazuje, že pre dvojicu (65, 35) je celkový rozsah početnosti chemických nehomogenít najmenší, je pre ňu podstatne najmenšia najväčšia hodnota početnosti šlír oproti ostatným dvom dvojiciam, pričom sústredenosť početnosti chemických nehomogenít je do hodnoty 200. Treba si ale uvedomiť, že z 187 meraní dvojica (65, 35) nastane iba 40 krát. Farebné označenie pre jednotlivé dvojice hodnôt parametrov p_1 a p_2 :



Obr. 2 Stĺpcové rozloženie hodnôt chemických nehomogenít vzhľadom na parametre p_1 a p_2

Nasledujúci obrázok predstavuje iné grafické vyjadrenie toho istého rozloženia. V tomto znázornení je oproti predchádzajúcemu obrázku dobre rozlíšiteľná mohutnosť (počet) meraní.



Obr. 2 Boxové rozloženie hodnôt chemických nehomogenít vzhľadom parametre p_1 a p_2

Záver

Použitie štatistických metód má význam pre lepšie pochopenie vzťahov medzi parametrami taviaceho procesu a medzi parametrami a chemickými nehomogenitami. Sledovanie a vyhodnocovanie týchto údajov je potrebné taktiež pre navrhnutie regresnej funkcie závislosti chemických nehomogenít od parametrov taviaceho procesu a následne použitie vhodnej optimalizačnej metódy optimalizácie taviaceho procesu.

Zoznam použitej literatúry

- [1] VBN - Publication [Citované: 18. januára 2013]
<[http://vbn.aau.dk/en/publications/development-of-an-approach-for-characterisation-of-striae-in-bubble-containing-glasses\(0f2253f2-b11f-4fde-a984-d079292ef3ea\).html](http://vbn.aau.dk/en/publications/development-of-an-approach-for-characterisation-of-striae-in-bubble-containing-glasses(0f2253f2-b11f-4fde-a984-d079292ef3ea).html)>
- [2] Bartuška M., (2001) Vady skla. PRÁH, Praha, p. 424
- [3] Schott glass made of ideas [Citované: 18. januára 2013]
<http://www.schott.com/advanced_optics/english/download/schott_tie_25_striae_in_optical_glass_june_2006_en.pdf>
- [4] Bakytová H., Ugron M., Kontšeková O. (1975) Základy štatistiky. Alfa, Bratislava, p. 283

Evaluation of Chemical Inhomogeneities from the aspect of their numbers, largeness and shapes

Blanka Fusková

Alexander Dubček University of Trenčín, Faculty of Industrial Technologies, Department of Physical Engineering of Materials, I. Krasku 491/30, 020 01 Púchov, Slovakia, blanka.fuskova@fpt.tnuni.sk,

Abstract

We create the function $y = h(p_1, \dots, p_m)$, where, p_1, \dots, p_m are parameters of melting process for evaluation of chemical inhomogeneities (striae). The values of this function express the measure of numbers, largeness and shapes of chemical inhomogeneities. This function can be substituted by suitable regression models for its minimizing.

Keywords: *Glass melting; regression; chemical inhomogeneity*

Introduction

Chemical inhomogeneity are often the source of the poor quality of glass products. Chemical inhomogeneities (striae) are defined as the heterogeneity of glass in the glass. It is a glass that their properties differ from the surrounding glass and is visible. Between the chemical inhomogeneities and glazed may occur internal tensions even a chilled products well. It happens in this case, the composition and thus the thermal expansion of chemical inhomogeneities differs from the surrounding glass. This difference in thermal expansion causes both the glass during the cooling or shrink, which can lead to cracking. In assessing the homogeneity of flat and hollow glass is not enough just to assess stress in the chemical inhomogeneity the vantage point of natural areas of the product. In this way the recognize the true size of the internal stresses or real chemical inhomogeneity and its harmfulness. The products are checked in sections. The flat glass is controlled chemical inhomogeneity on samples in the form of strips. Direction is parallel to the vantage point of the glass surface. The hollow-ware checks are made on the ring sections [1]. In homogeneities such as chemical inhomogeneity and bubbles in glass-forming melts affect the physical, chemical, mechanical, and optical properties of the produced glass. Chemical inhomogeneity are a major component of the inhomogeneity present in a wide variety of natural and manmade glasses and are often the source of the poor quality of glass products [2].

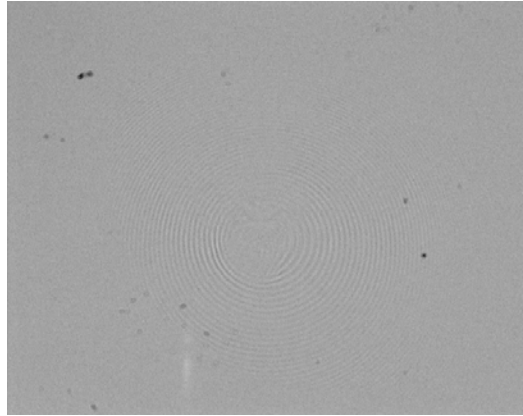


Fig. 1 Whirl shaped band-like chemical inhomogeneity from the tank melting process. Sophisticated casting control helps to prevent such chemical inhomogeneity [3]

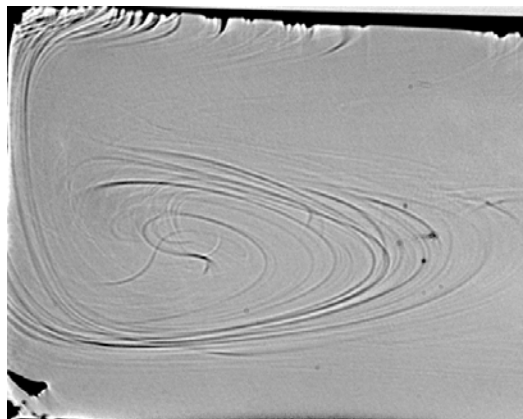


Fig. 2 Shadowgraph picture of chemical inhomogeneity within N-LAK8 exhibiting a frozen convection pattern [3]

To achieve the best quality products, the chemical inhomogeneity value and largeness must be smallest. We describe one method for evaluation and minimization of chemical inhomogeneities from the aspect of their numbers, largeness and shapes. Our mentioned method is closely concerned with construction of the function $y = h(p_1, \dots, p_m)$, where, p_1, \dots, p_m are parameters of melting process for example, performance of electro – heating for each transformer, pull rate of line 1 and 2, total pull rate of melting furnace, hot and cold area temperature of the feeder, chemical inhomogeneity of line 1 and 2, other defects of line 1 and 2, effectiveness of the defects monitoring process, glass density of line 1 and 2, temperature of the furnace base, temperatures at thermocouple, temperature on the surface, melting temperature on the surface, temperature on the stone, melting temperature on the stone, while the values of this function express the measure of number and largeness of striae which occur

during the process of glass melting. This function can be substituted by suitable regression models in the form $y = f(p_1, \dots, p_m)$, where f is a polynomial of m variables.

$$f = \sum_{i_1=1}^m A_{i_1} p_{i_1} + \sum_{i_1=1, i_2=1}^m A_{i_1, i_2} p_{i_1} p_{i_2} + \dots$$

$$\dots + \sum_{i_1=1, i_2=1, \dots, i_n=1}^m A_{i_1, i_2, \dots, i_n} p_{i_1} p_{i_2} \dots p_{i_n} + A,$$
[I.]

where $A_i, A_{i,j}, \dots, A$ are unknown constants, which can be determined by the least squares method: so that

$$\sum_{i=1}^l (y_i - f(p_{1i}, \dots, p_{mi}))^2$$
[II.]

is minimal [4], where l is number of measurements of parameters p_1, \dots, p_m of melting process and y_i is value of function h for i -th measurement ($y_i = h(p_{1i}, \dots, p_{mi})$).

The optimal point (p_1, \dots, p_m) , is the point of minimum of the function f on closed m -dimensional block determined from the field measurements.

Those parameters at which the coefficients in their absolute value are large in the regression function, have a major influence on the creation of the striae. On the other side, those parameters at which the coefficients are too small, have little impact on the creation of chemical inhomogeneity.

Results

The parameters p_1, \dots, p_m influence the shape and number of striae. The following table shows the classification of striae number on the base of shape and largeness. The interval (a_{i-1}, a_i) , where $i \in \{1, \dots, r\}$ and $a_0=0$, expresses classification of striae shape according to their largeness (diameter of striae is from some interval (a_{i-1}, a_i) , $i \in \{1, \dots, r\}$). The symbol s_{ji} , where $j \in \{1, \dots, k\}$, $i \in \{1, \dots, r\}$ expresses shape of striae with their given diameter from interval (a_{i-1}, a_i) and n_{ji} , where $j \in \{1, \dots, k\}$, $i \in \{1, \dots, r\}$ expresses number of striae for interval (a_{i-1}, a_i) , and shape s_{ji} . Finally, l is number of measurements of parameters p_1, \dots, p_m of melting process.

Tab. 1 Global clasification of striae number on the base of shape and largeness, where s_i are types of shapes and

n_{ij} are numbers of striae

Parameters of melting proces			Admitted intervals										
			$(0, a_1)$...			(a_{r-1}, a_r)					
			Shapes for given interval										
			s_{11}	...		s_{k1}	...		s_{1r}	...		s_{kr}	
			Numbers of striae for given interval and shape and for given parameters										
p_1	...		p_m	n_{11}	...		n_{k1}	...		n_{r1}	...		n_{kr}
p_{11}	...		p_{m1}			
.	
.	
.	
p_{1l}	...		p_{ml}			

We construct the function h (This function is modification of function $y = h(p_1, \dots, p_m)$ from [5] and [6]) which expresses the measure of striae in dependence on measured parameters p_1, \dots, p_m in following way

$$y = h(p_1, \dots, p_m) = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^k n_{ij} d_{ij} \tag{III.}$$

Where d_{ij} are coefficients of shapes and largeness, which can be created according to the importance of the given shape and largeness of striae.

The function f can be obtained by method of regression analysis described above.

Conclusion

The function, values of which express the measure, number and largeness of striae which occur during the process of glass melting has practical utilization, especially in connection with optimum setting of parameters for melting process where the given parameters influence the creation of striae.

References

[1] Glassrevue [Cited: 17. januar 2013] <<http://www.glassrevue.com/news.asp@nid=1213&cid=6.html>>
 [2] VBN - Publication [Cited: 18. januar 2013]

- <[http://vbn.aau.dk/en/publications/development-of-an-approach-for-characterisation-of-striae-in-bubble-containing-glasses\(0f2253f2-b11f-4fde-a984-d079292ef3ea\).html](http://vbn.aau.dk/en/publications/development-of-an-approach-for-characterisation-of-striae-in-bubble-containing-glasses(0f2253f2-b11f-4fde-a984-d079292ef3ea).html)>
- [3] Schott glass made of ideas [Cited: 18. januar 2013]
<http://www.schott.com/advanced_optics/english/download/schott_tie_25_striae_in_optical_glass_june_2006_en.pdf>
- [4] Bakytová H., Ugron M., Kontšeková O. (1975) Základy štatistiky. Alfa, Bratislava, p. 283
- [5] Fusková B., Hrnčiariková H., Holý D., et al. (2011) XVI. Slovak - Polish Scientific Conference on Machine Modeling and Simulations MMS 2011, On one method for Evaluation of chemical inhomogeneities, Terchová, Slovakia, p. 283
- [6] Fusková B. (2011) Metalurgical Journal, Evaluation of Chemical Inhomogeneities by the Function which Dependences on Parameters of Melting Process, 7, p. 29

Stanovenie rádionuklidov ^{90}Sr , $^{239,240}\text{Pu}$, ^{238}Pu a ^{241}Am v pôde využívajúce metódy extrakčnej chromatografie a spoluzrážania

Veronika Gardoňová, Silvia Dulanská, Ján Bilohuščin

Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra jadrovej chémie,, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko; vgardonova@gmail.com

Abstrakt

Ecosystems, which include soil and sediments, contain not only natural radionuclides but also radionuclides from deposits, mainly ^{137}Cs , ^{90}Sr and α -emitting radionuclides such as $^{239,240}\text{Pu}$, ^{238}Pu a ^{241}Am , that originate from global fallout and nuclear facilities leaks worldwide. The goal of the work was optimization of separation and determination of ^{90}Sr , ^{238}Pu , $^{239,240}\text{Pu}$ a ^{241}Am in soil from Slovak Republic. The newest methods were applied for separation of selected radionuclides based on coprecipitation with oxalic salts and extraction chromatography using selective commercial sorbents.

KLúčové slová: plutónium; stroncium; amerícium; štavelanové zrážanie; extrakčná chromatografia

Úvod a formulácia cieľa

Ekologicky významné rádionuklidy môžu byť buď prírodného charakteru tzv. prírodné rádionuklidy alebo vznikajú pri jadrových výbuchoch poprípade pri riadenom uvoľňovaní jadrovej energie ako štiepne rádionuklidy. Tieto nuklidy nie sú metabolicky významné, ale sú nebezpečné z pohľadu ich vznikajúceho množstva. Taktiež ľahko vstupujú do biochemických cyklov a mnohé z nich sa koncentrujú v potravinových reťazcoch.

Za nebezpečné znečisťovače životného prostredia môžeme považovať izotopy plutónia. Tieto nuklidy sa vyznačujú rádiologickou toxicitou a dlhou dobou polpremeny. Hlavný problém teda spočíva v ich dlhodobom zotrúvaní v prostredí. Napr. ^{239}Pu má schopnosť ukladať sa v kostiach a emitovať alfa častice s vysokou energiou, čím je predovšetkým ohrozená kostná dreň.

Izotopy plutónia sa do životného prostredia dostávajú ako výsledok testov jadrových zbraní, jadrových nehôd, nehôd satelitov a reaktorov ale aj ako spad z prepracovaných jadrových zariadení a jadrových elektrární. [1, 2]

Separácii Pu z chalúch a usadenín sa venovali Varga a kol. [3] použitím TEVA[®] Resin extrakčnej chromatografie. Extrakt v $3 \text{ mol. dm}^{-3} \text{ HNO}_3$ bol nanosený na TEVA[®] Resin, kolóna bola premytá s $3 \text{ mol. dm}^{-3} \text{ HNO}_3$ a $6 \text{ mol. dm}^{-3} \text{ HCl}$ a Pu bolo eluované zmesou $0,1 \text{ mol. dm}^{-3} \text{ HNO}_3 - 0,1 \text{ mol. dm}^{-3} \text{ HF}$. Výhodou danej metódy separácie Pu bola eliminácia eventuálneho rušenia Th, Am, U, Pb a Bi v konečnom detekčnom kroku a krátky čas

separácie vzorky. Výťažok Pu sa pohyboval v rozmedzí od 72% do 92%. Tavcar a kol. [4] objavili metódu na súčasnú separáciu Pu a iných rádionuklidov (Am, Np a Sr) v pôdach a usadeninách pomocou kombinácie aniónovo - výmennej separácie a extrakčnej chromatografie (TRU[®]Resin a Sr[®]Resin) s priemernou hodnotou výťažku okolo 61%. Činidlá NH₂OH, HCl a NaNO₂ boli použité na regulovanie Pu na Pu(IV) pred zavedením na aniónový výmenník pre zadržanie Pu v separačnej kolónke. Separácia Am a Sr bola vykonaná použitím TRU[®]Resin a Sr[®]Resin sorbentov.

Pri činnosti jadrových zariadení a pri jadrových nehodách môže byť do životného prostredia taktiež uvoľňované nebezpečné amerícium. Tento nuklid sa dostáva do ľudského tela prostredníctvom potravy, dýchania alebo kontaktom s pokožkou. Po prijímaní sa amerícium veľmi rýchlo pohybuje po celom tele a koncentruje sa po dlhú dobu v kostiach. Taktiež izotopy amerícia sa veľmi pomaly rozpadajú v životnom prostredí, čoho výsledkom je poškodenie rastlín a živočíchov (hlavne orgány ako pľúca, pečeň a štítna žľaza). [5]

Amerícium je možné zo vzoriek separovať napríklad použitím TRU[®]Resin. Kolóna so sorbentom je kondicionovaná 2 mol.dm⁻³ HNO₃ a prekonvertovaná do chloridovej formy pomocou 9 mol.dm⁻³ HCl. Amerícium je eluované 4 mol.dm⁻³ HCl. Po odparení sa vzorka rozpustí a pomocou mikrozrážania s NdF₃ sa pripraví na alfa spektrometrické meranie. [2]

K rádioaktívnej kontaminácii životného prostredia vo veľkej miere prispieva aj ⁹⁰Sr, ktoré vzniká vo veľkých výťažkoch pri jadrovom štiepení. Daný rádionuklid stroncia sa pre svoju veľkú chemickú podobnosť s vápnikom pomerne ľahko pohybuje biologickým systémom. Beta častice a hlavne dcérske produkty ⁹⁰Sr ožarujú kostnú dreň a predstavujú tak značné biologické nebezpečenstvo pre krvotvorbu. [6]

Separácii ⁹⁰Sr sa venovala Ometáková a kolektív použitím sorbentu AnaLig Sr-01 gel. Kolónu so sorbentom bola kondicionovaná 10 ml 1 mol.dm⁻³ HNO₃, po nanosení vzorky bola premytá 2x20 ml 1 mol.dm⁻³ HNO₃ a 2 ml deionizovanej vody. Stroncium bolo eluované 15 ml 0,05 mol.dm⁻³ Na₄EDTA. [7]

Cieľom práce bolo optimalizovať rýchlu a efektívnu metódu pre stanovenie rádionuklidov z depozitu ^{239,240}Pu, ²³⁸Pu, ²⁴¹Am a ⁹⁰Sr z vybranej matrice životného prostredia- pôdy. Pri separácii sa využili najnovšie metódy spoluzrážania a extrakčnej chromatografie založené na použití selektívnych sorbentov.

Materiál a metódy

Činidlá a materiály

TRU[®] Resin , UTEVA Resin (100 – 150 µm) – Eichrom Technologies, Inc., AnaLig[®] Sr-01 gel, AnaLig[®] Pu-02 gel (60 – 100 mesh) – IBC Advanced Technologies.

Všetky ďalšie chemikálie boli bežne dostupné v analytickej čistote kyselín a chemikálií.

Príprava vzorky pôdy – digerovanie

Za maticu životného prostredia sa zvolila pôda odobraná z územia západného Slovenska. Pôda sa vysušila pri $T = 105\text{ °C}$ a následne spálila pri $T = 550\text{ °C}$ v muflovej peci počas 8 hodín. Takto upravená vzorka sa digerovala v kadičke v zmesi 35 % HCl a 65 % HNO₃ v pomere 1 : 3 počas 6 hodín pri teplote 90 – 100 °C. Digerovaná zmes sa prefiltrovala a premyla sa 8 mol.dm⁻³ HNO₃. Z výluhu sa vždy odoberalo ekvivalentné množstvo.

Separácia amerícia z pôdy metódou spoluzrážania so šťaveľanom amónnym

Ako prvé sa optimalizovala metóda separácie amerícia z pôdy pri rôznych hmotnostiach. K vzorke pripraveného výluhu pôdy s hmotnosťou od 2,5 g do 50 g sa pridalo 50 µl stopovacieho rádionuklidu ²⁴³Am na sledovanie výťažku separácie. Zmes sa odparila skoro dosucha a odparok sa rozpustil v 60 ml deionizovanej vody. pH roztoku sa upravilo koncentrovaným NH₄OH na hodnotu 2,6 – 2,7. K takto upravenej vzorke sa pridalo 10 – 15 ml nasýteného roztoku šťaveľanu amónneho za vzniku zrazeniny Am₂(C₂O₄)₃. Zmes sa následne scentrifugovala. K roztoku nad zrazeninou sa opäť pridalo 10 ml nasýteného roztoku šťaveľanu amónneho za vzniku bielej zrazeniny, ktorá sa scentrifugovala. Obe zrazeniny sa premyli deionizovanou vodou. Zrazenina Am₂(C₂O₄)₃ sa rozpustila v teplej 65% HNO₃ a k roztoku sa pridalo 200 µl koncentrovaného peroxidu vodíka. Zmes sa odparila skoro dosucha a pridala sa 1 ml koncentrovanej HNO₃, 90 ml deionizovanej vody a 2 g Na₂SO₃, potrebného na redukciu Fe³⁺. pH vzorky sa upravilo s koncentrovaným NH₃ na 8 – 9 (vznik zrazeniny), zmes sa scentrifugovala. Zrazenina sa rozpustila v 3 mol.dm⁻³ HNO₃ a pridala sa 0,3 g kyseliny askorbovej (redukcia Fe^{III} na Fe^{II}). Vzorka sa naniesla na kolónu so 0,7 g sorbentu TRU[®]Resin, kondiciovanú 10 ml 3 mol.dm⁻³ HNO₃. Kolóna sa premyla 5 ml 3 mol.dm⁻³ HNO₃ a 1 ml 9 mol.dm⁻³ HCl. Amerícium bolo eluované 3 ml 9 mol.dm⁻³ HCl a 15 ml 4,5 mol.dm⁻³ HCl. Eluát s Am bol odparený dosucha. K vzorke sa pridalo 6 ml 1 mol.dm⁻³ HCl; 0,5 ml koncentrovanej HF; 100 µl 0,5 mg.ml⁻¹ Nd³⁺. Takto upravená vzorka sa dala na

30 min do mrazničky. Vzorka sa prefiltrovala na filtri (25 mm Tuffryn[®] membrane filter, 0,2 μm), vysušila po IČ lampou a zmerala sa na alfaspektrometri (Ortec 576 A).

Separácia stroncia, plutónia a amerícia v porovnávacjej vzorke pôdy z IAEA 375

Výluh 50 g pôdnej vzorky sa pripravil podľa predchádzajúceho postupu – spaľovaním a digerovaním v zmesi kyselín. K výluhu sa pridalo 50 μl stopovacieho rádionuklidu ^{243}Am , 50 μl stopovacieho rádionuklidu ^{242}Pu , 100 μl stopovacieho rádionuklidu ^{85}Sr a 50 μl nosiča Sr (60 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) na sledovanie výťažku separácie. Vzorka sa odparila takmer dosucha a odparok sa rozpustil v 15 ml 5 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HNO_3 . Na separáciu sa použila metóda extrakčnej chromatografie so sorbentami: UTEVA[®] Resin (odstránenie interferentov Th a U), AnaLig[®] Sr-01 gel na separáciu ^{90}Sr , AnaLig[®] Pu-02 gel pre separáciu Pu a TRU[®] Resin potrebný na separáciu amerícia.

Ako prvé sa vzorka výluhu 50 g pôdy naniesla na kolónu so 1,0 g sorbentu AnaLig[®] Sr-01 gel, (separácia Sr), kondiciovanú 10 ml 1 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HNO_3 . Kolóna sa následne ešte premyla 3 ml 5 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HNO_3 a 3 ml 1 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HNO_3 – (frakcie obsahujú amerícium a plutónium) sa zachytili a spojili. AnaLig[®] Sr-01 gel sa premyl 20 ml 1 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HNO_3 . Stroncium sa eluovalo 20ml Na_4EDTA .

K odloženej frakcii po separácii stroncia sa pridali 4 ml ferosulfamátu a 0,3 g kyseliny askorbovej na redukciu plutónia z Pu^{IV} na Pu^{III} , aby sa eliminoval záchyt plutónia na sorbente UTEVA. Takto upravená vzorka sa naniesla na kolónu so sorbentom UTEVA[®] Resin na odstránenie interferujúcich izotopov uránu a tória. Kolóna so sorbentom UTEVA[®] Resin sa kondiciovala 10 ml 5 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HNO_3 . Po nanesení vzorky sa sorbent premyl 2 ml 5 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HNO_3 , pretečená frakcia sa zachytila do kadičky (obsahuje Pu a Am).

Na separáciu plutónia sa použil sorbent molekulárneho rozpoznávania AnaLig[®] Pu-02 gel. Plutónium sa sorbuje na sorbente AnaLig[®] Pu-02 ako Pu^{IV} , preto bolo potrebné upraviť oxidačný stav z Pu^{III} na Pu^{IV} pomocou 0,5 g NaNO_2 . AnaLig[®] Pu-02 sa kondicioval s 10 ml 2 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HNO_3 a následne sa naniesla vzorka. Plutónium bolo adsorbované na sorbente, pretečená frakcia sa odložila na separáciu amerícia. Kolóna so sorbentom AnaLig[®] Pu-02 sa premyla s 10 ml 2 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HNO_3 . Plutónium sa eluovalo z kolóny so sorbentom AnaLig[®] Pu-02 so zmesou 0,6 ml 15 % TiCl_3 v 20 ml 9 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HCl .

Amerícium sa vo vzorke IAEA 375 separovalo spoluzrážaním so šťaveľanom amónnym a využitím sorbentu TRU[®] Resin postupom zavedeným vyššie.

Meranie stroncia

Frakcia so stronciom bola meraná ako prvá na vysoko čistom germániovom detektore (HPGe) ($E = 514 \text{ keV}$) pre stanovenie ^{85}Sr (určil sa rádiochemický výtťažok separácie Sr). ^{90}Sr bolo merané po náraste dcérskeho rádionuklidu ^{90}Y meraním Čerenkovovho žiarenia na kvapalinovom scintilačnom spektrometri TRI CARB 2900 TR (PerkinElmer).

Meranie amerícia a plutónia

Vzorka plutónia a amerícia bola pripravená na meranie metódou spoluzrážania s fluoridom neodýmitym podľa nižšie uvedeného postupu.

Eluované frakcie amerícia a plutónia sa odparili dosucha. K odparkom sa pridalo 0,6 ml 38 % HF, 6 ml 1 mol.dm⁻³ HCl a 100 μl 0,5 mg.ml⁻¹ Nd³⁺ a zmes sa dala na 30 min do mrazničky. Vzorka sa prefiltrovala na filtri (25 mm Tuffryn[®] membrane filter, 0,2 μm), vysušila po IČ lampou. Preparáty boli merané na metrologicky overenom dvojkomorovom α -spektrometri 576A s ULTRA[™]AlphaDetector 600, EG&G ORTEC. Spektrá boli následne spracované programom GammaVision (32-bit), EG&G ORTEC.

Výsledky a diskusia

Na optimalizáciu separácie amerícia vo vzorke pôdy s hmotnosťou od 2,5 – 50 g sa využila metóda spoluzrážania amerícia so šŕaveľanom amónnym. Výhodou postupu prekoncentrovania amerícia pomocou spoluzrážania je relatívne krátky čas separácie (cca 4 hod) a eliminácia nežiadúcich interferentov v pôde. Porovnaním rádiochemických výtťažkov amerícia v jednotlivých frakciách pôdy sa zistilo, že účinnosť separácie sa pohybovala v závislosti od hmotnosti pôdnej matrice od 63,2 – 96,67 % (Tab. 1).

Tab. 1 Rádiochemické výtťažky separácie amerícia metódou spoluzrážania z pôdy

	2,5 g	5 g	10 g	20 g	30 g	50 g
R ^{241}Am (%)	65,21	62,91	96,67	74,64	58,14	63,2

Optimalizovaná metóda separácie amerícia v pôde sa verifikovala na 50g porovnávacej vzorky pôdy IAEA 375. Rýchla separácia amerícia, ale aj plutónia a stroncia využíva sorbenty založené na princípe extrakčnej chromatografie: AnaLig[®] Sr-01 gel (separácia ^{90}Sr), AnaLig[®] Pu-02 gel (separácia Pu) a TRU[®] Resin na separáciu amerícia. Na odstránenie interferentov Th a U sa zabezpečilo zavedením sorbentu UTEVA[®] Resin.

Výsledky separácie rádionuklidov v porovnávacej vzorke IAEA 375 sú prezentované v tabuľke 2.

Tab. 2 Výsledky sekvenčného stanovenia rádionuklidov v porovnávacej vzorke IAEA 375

	²⁴¹ Am	²³⁸ Pu	^{239,240} Pu	⁹⁰ Sr
R (%)	63,0	59,2	59,2	97,0
a (Bq.kg⁻¹)	0,14 ± 0,02	0,061 ± 0,005	0,28 ± 0,02	108,0 ± 9,7
Referenčná hodnota	0,13	0,071	0,30	108

Záver

Na vzorke pôdy z územia Slovenskej republiky bola optimalizovaná metóda zakoncentrovania amerícia spoluzrážaním so šľavelanom amónnym. Na separáciu ekologicky významných rádionuklidov ⁹⁰Sr, ^{239,240}Pu, ²³⁸Pu a ²⁴¹Am v pôde sa využili metódy kombinujúce sorbenty extrakčnej chromatografie a metóda spoluzrážania. Kombináciou metód je možné stanoviť rádionuklidy aj vo väčších hmotnostiach pôdy. Metóda bola verifikovaná na porovnávacej vzorke IAEA 375, pričom výsledky sa zhodujú s referenčnými hodnotami.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Tölgyessy J., Mátel L., Holý K. (2006) Chemické a rádioaktívne kontaminanty životného prostredia. Omega Info, Bratislava, p. 7, 32
- [2] Durkot E. (2012) Stanovenie ^{239,240}Pu a ²³⁸Pu vo vybraných matriciach na SPE sorbente AnaLig[®] Pu-02. (Diplomová práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p. 8, 49
- [3] Varga Z., Suranyi G., Vajda N. (2007) J. Radioanal. Nucl. Chem. 54, p. 87
- [4] Tavcar P., Jakopic R., Benedik L. (2005) Acta Chim. Slov. 52, p. 60
- [5] Water Treatment solutions, [Citované: 04. február 2013] < <http://www.lenntech.com/periodic/elements/am.htm> >
- [6] Tölgyessy J., Mátel L., Holý K. (2006) Chemické a rádioaktívne kontaminanty životného prostredia. Omega Info, Bratislava, p. 28
- [7] Ometáková J., Dulanská S., Mátel L., Remenec B. (2011) J. Radioanal. Nucl. Chem. 290, p. 319

Analýza výdychových plynov človeka pomocou plynovej chromatografie

Alexandra Hengerics Szabó, Peter Podolec, Peter Kotora, Juraj Adamuščin, Dušana Samková,
Jozef Višňovský, Róbert Kubinec

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Chemický ústav, Mlynská
dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
szaboova@fns.uniba.sk*

Abstrakt

Human exhaled breath contains hundreds of volatile organic compounds at trace concentrations. Analysis of these compounds present in breath can serve as an insight into various biochemical processes of the healthy and diseased body. Exhaled breath analysis is one of the non-invasive diagnostic methods. As a clinical tool it requires reliable identification and quantification of compounds present at concentrations ppb-ppt, while the biochemical mechanisms by which these substances are formed in the body have to be described. Sample preparation is a critical step of the analysis. In recent years, several solventless extraction techniques were developed for the analysis of volatile organic compounds. INCAT (inside needle capillary adsorption trap) allows the analysis of various volatile compounds present in the samples at trace levels. In addition to being a solventless, one-step sample pretreatment method, other advantages are its robustness and simple methodology.

Kľúčové slová: *analýza výdychových plynov; mikroextrakcia; INCAT; plynová chromatografia*

Úvod a formulácia cieľa

Základom moderného lekárstva je predstava, že analýzou vzoriek krvi, moču, tkanív a iných telesných tekutín a plynov môžeme získať potrebné informácie pre diagnostiku chorobných stavov ako aj sledovať proces ochorenia alebo terapiu [1]. Nové diagnostické techniky musia byť bez rizika pre pacienta aj pri častom opakovaní a musia poskytovať viac informácií, než sa získava z bežných analýz krvi a moču. Analýza výdychu by mohla splniť všetky tieto požiadavky. Mohli by sa zdefinovať súbory markerov, ktoré by mali prediktívnu hodnotu aj pri zložitých ochoreniach, akým je napríklad akútne zlyhanie pľúc, zápal pľúc, rakovina pľúc a veľa ďalších [2].

Hlavnú časť výdychovej matrice tvorí zmes dusíka, kyslíka, oxidu uhličitého, vodnej pary a inertných plynov. Zvyšok (menej ako 100 ppm) je zmes viac ako 500 rôznych zlúčenín. Tieto molekuly môžu byť endogénneho aj exogénneho pôvodu. Normálne aj chorobné fyziologické procesy sú zdrojom endogénnych molekúl. Zdrojmi exogénnych molekúl sú vdychovaný vzduch, požitá potrava a nápoje, a všetky exogénne molekuly, ktoré vstúpili do tela inými cestami (napr. absorpciou cez kožu) [1]. Analýza zlúčenín prítomných vo výdychu nám môže slúžiť ako náhľad do rôznych biochemických procesov zdravého aj chorého tela. V posledných rokoch sa analyzovalo veľké množstvo prchavých

organických zlúčenín (VOC) vo výdychu a pre viaceré z nich sa stanovila korelácia medzi ich koncentráciou a rôznymi chorobami, preto je z medicínskeho pohľadu dôležité vyvinúť spoľahlivé a citlivé metódy na ich stanovenie a nájsť nové biomarkery, ktoré sú indikátorom chorôb.

Dychové skúšky sa datujú od najstarších dejín medicíny, pretože už aj lekári v staroveku vedeli, že pach dychu môže byť náznakom niektorých ochorení. Skúsení lekári aj dnes používajú svoje nosy na doplnenie diagnózy. Niektoré pachy prítomné vo výdychu sú veľmi charakteristické pre dané ochorenie: výdych pacientov s diabetickou ketoacidózou páchne ako hnijúce jablká, hlavne kvôli acetonémii. Chronické zlyhanie obličiek spôsobuje zápach podobný moču v dôsledku zvýšenej hladiny dimetylamínu a trimetylamínu v krvi a zlyhanie pečene v pokročilom štádiu spôsobuje zatuchnutý zápach „feto hepaticus“, absces pľúc hnisavý zápach. Okrem ochorení sa z výdychu dá zistiť aj konzumácia tabaku, alkoholu, cesnaku a iných korenín [3].

V súčasnosti analýza výdychu predstavuje sľubnú, neinvazívnu diagnostickú techniku. Skutočné množstvo markérnych zlúčenín vo výdychu je zvyčajne veľmi malé a môže byť detekované len použitím najcitlivejších techník [4]. Na analýzu výdychových vzoriek sa používa niekoľko analytických techník: GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry), PTR-MS (proton-transfer reaction mass spectrometry), SIFT-MS (selected ion flow tube mass spectrometry), IMS (ion mobility spectrometry) a laserová spektrometria [5]. Z týchto spomínaných metód, plynová chromatografia predstavuje zlatý štandard vo výdychovej analýze [6].

Cieľom tejto práce bolo vyvinutie analytickej metódy na analýzu prchavých organických zlúčenín prítomných v ľudskom výdychu. Pre realizáciu tohto cieľa sme použili mikroextrakčné zariadenie vyvinuté v našom laboratóriu na analýzu prchavých zlúčenín, ktoré sme následne analyzovali pomocou plynovej chromatografie s MS detekciou.

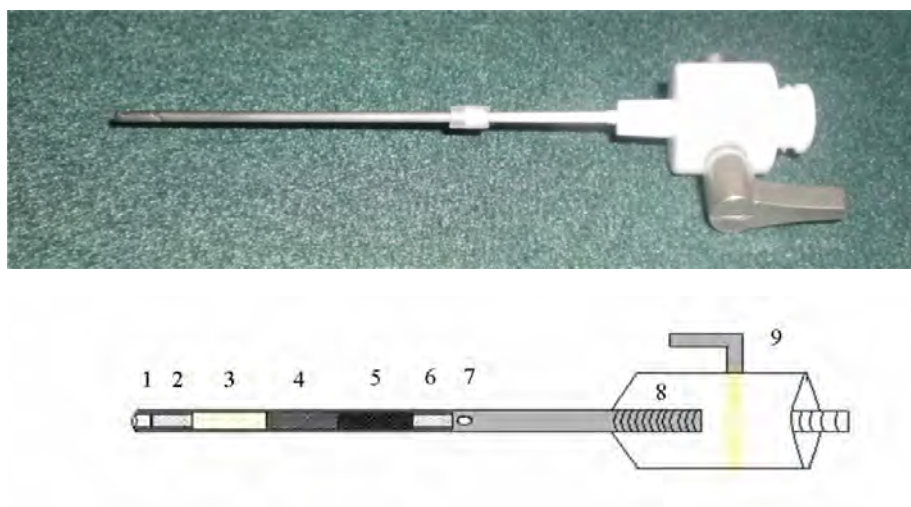
Materiál a metódy

Na odber vzoriek výdychových plynov sa použili Tedlar vrecká o objeme 3l. Vzorky sa nakoncentrovali mikroextrakčnou technikou INCAT. K príprave INCAT zariadenia sme použili ihly z nerezovej ocele typ kanyla, sorbenty Chromosorb W s 20% SE-54, Carboxen X a Carboxen 1000. Vzorkovanie výdychových plynov sa uskutočnilo za pomoci použitia membránovej pumpy Neuberger KNF Laboport, typ N86KT.18. Plynovochromatografické analýzy sa vykonali na plynovom chromatografe Network GC System 6890N (Agilent Technologies) s MS detektorom (SCAN mód). Chromatografická separácia bola uskutočnená

na kapilárnej kolóne DB-1 s dĺžkou 60 m, vnútorným priemerom 0,32 mm a hrúbkou filmu stacionárnej fázy 5 μm . Zber dát a ich následné spracovanie bolo uskutočnené pomocou programu MSD ChemStation na PC.

Výsledky a diskusia

Pripravili sme INCAT zariadenie so sorbentom v celom objeme ihly na zakoncentrovanie prchavých organických látok z ľudských výdychových plynov. Schéma INCAT zariadenia je znázornená na Obr. 1.



Obr. 1 Schéma INCAT zariadenia – (1) hrot ihly, (2,6) sklená fritá, (3-5) sorbenty, (7) bočný otvor, (8) závit, (9) ventil

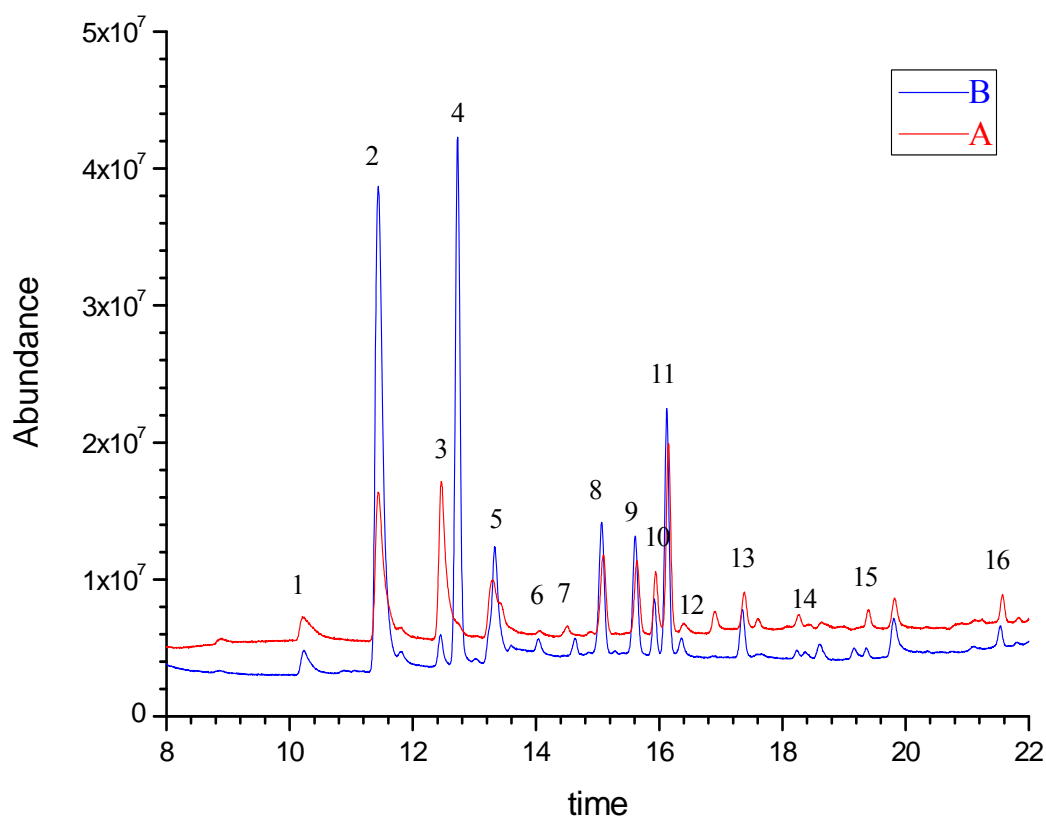
Zariadenie INCAT sa pripravilo z ihly z nerezovej ocele dlhej 80 mm do ktorej sa 30 mm od konca navíjala diera veľkosti 0,6 mm. Hrot ihly sa opracoval do hladka a guľata, aby sa zabránilo krájaniu septa pri dávkovaní do GC injektora. Do ihly sa vložila fritá so sintrovanými sklenenými guľičkami, ktorá slúžila nato, aby sa sorbenty nevysypali z ihly. Následne sa ihla naplnila vybranými sorbentmi a zasunula sa ďalšia fritá. Zadný koniec tejto frity bol tesne pod vyvítanou bočnou dierkou. Ako tesnenie sa na dierku zasunula teflónová (kvôli inertnosti) a silikónová hadica (kvôli tesneniu). Na zadnú časť zariadenia sa narezal závit a nasadil zatvárací ventil.

Vzorkovanie sa uskutočnilo aktívnym spôsobom pomocou pumpy. Prchavé analyty sa adsorbovali na sorbenty v zariadení nasávaním určitého objemu plynnej vzorky. Objem čerpaného plynu sa stanovil meraním prietoku cez INCAT zariadenie.

Vzorkovanie výdychových plynov sa robilo naplnením Tedlar vrečka o objeme 3l pokiaľ bolo možné z jedného dychu a následného čerpania konštantného objemu vzorky cez

INCAT zariadenie. Prípadný pamäťový efekt vrečka sme odstránili viacnásobným prepláchnutím vrečka čistým dusíkom medzi analýzami.

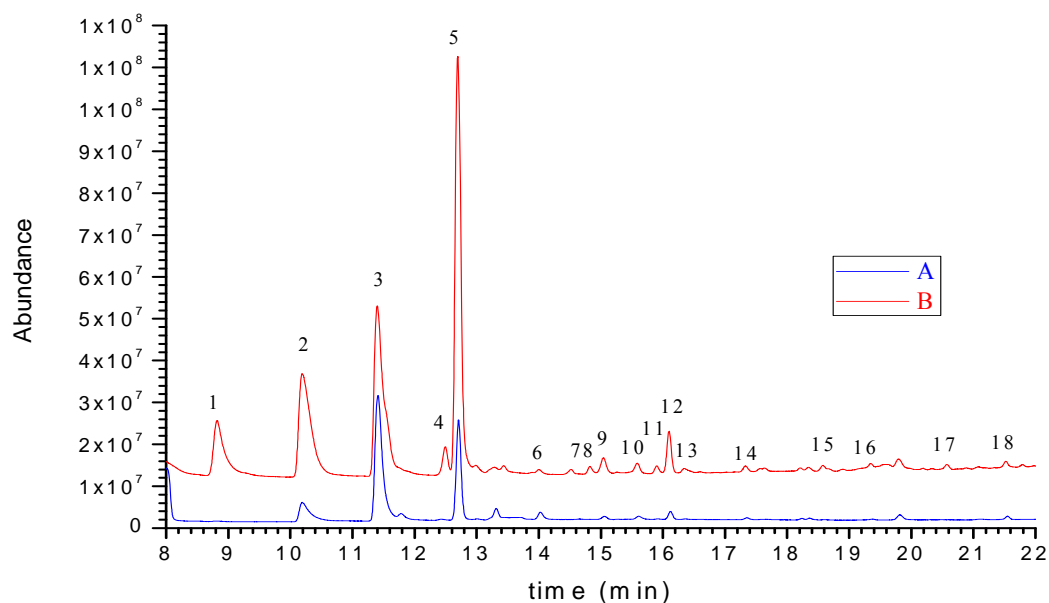
Pri analýze výdychových plynov treba brať do úvahy vplyv vdychovaného vzduchu, keďže koncentrácie niektorých látok prítomných vo vzduchu môžu presahovať koncentráciu endogénnych molekúl. Ignorácia tohto problému môže viesť k falošnej interpretácii výsledkov. Na Obr. 2 je znázornený vplyv ovzdušia v pracovnom prostredí na zloženie výdychových plynov človeka.



Obr. 2. Chromatografické záznamy ovzdušia a výdychových plynov človeka v laboratóriu GC po desorpcii z INCAT zariadenia s trojvrstvovým sorbentom. **A**- vzduch z laboratória GC, **B**- výdychový plyn z laboratória GC. 1- etanol, 2- acetón, 3- etyl éter, 4- penta-1,4-dién, 5- dichlórmetán, 6- propán-1-ol, 7- kyselina octová, 8- 2-metylpentán, 9- 3-metylpentán, 10- etylacetát, 11- hexán, 12- trichlórmetán, 13- metylcyklopentán, 14- benzén, 15- heptán, 16- toluén.

Ako ďalšie možné kontaminácie výdychových plynov môžeme považovať vplyv potravy a čistiacich prostriedkov ústnej dutiny.

Vzorky výdychových plynov sme preto odoberali minimálne 2 hodiny po konzumácii potravy a po dlhšom dýchaní čistého vzduchu mimo laboratória. Na Obr. 3 sú znázornené rozdiely v zložení výdychových plynov zdravého človeka a človeka s rakovinou pľúc.



Obr.3 Chromatografické záznamy výdychových plynov zdravého človeka a človeka s rakovinou pľúc po desorpcii z INCAT zariadenia s trojvrstvom sorbentom. **A** – výdychový plyn zdravého človeka, **B** - výdychový plyn človeka s rakovinou pľúc. 1- bután, 2- etanol, 3- acetón, 4- pentán, 5- penta-1,4-dién, 6- propán-1-ol, 7-kyselina octová, 8- bután-2,3-dión, 9- 2-metylpentán, 10- 3-metylpentán, 11- etylacetát, 12- hexán, 13- trichlórmetán, 14- metylcyklopentán, 15- 3-metylhexán, 16- heptán, 17- metylcyklohexán, 18- toluén.

Z Obr. 3 je zrejmé, že vyvinutá metóda je vyhovujúca na stanovenie prchavých organických zlúčenín vo výdychových plynoch človeka. Za účelom potvrdenia alebo určenia diagnózy sa však musia jednoznačne zdefinovať markery, poprípade súbory markerov pre jednotlivé ochorenia, aby sa mohla zaviesť citlivejšia cieľená analýza.

Záver

Táto práca bola zameraná na vývoj novej mikroextrakčnej predkoncentračnej techniky a na možnosť jej využitia pri analýze prchavých organických metabolitov vo výdychových plynoch s použitím plynovej chromatografie s MS detekciou.

Vyhotovili sa mikroextrakčné INCAT zariadenia s trojvrstvom sorbentom, použitím sorbentov Chromosorb W+ 20% SE-54, Carbopack X a Carboxen 1000. Získali sa tak zariadenia vhodné pre vzorkovanie širokého spektra prchavých organických zlúčenín.

Vyvinulo sa vzorkovanie aktívnym spôsobom čerpaním konštantného objemu vzorky pomocou pumpy cez INCAT zariadenie, kde sa analyty zachytili na sorbentoch, pričom vzorky výdychových plynov boli zachytené v inertnom Tedlar vrecku. Následne bolo INCAT zariadenie vložené do GC injektora, kde boli analyty tepelne desorbované a unášané nosným plynom do chromatografickej kolóny na separáciu.

Otestovali sa možnosti použitia tejto techniky na analýzu prchavých organických zlúčenín vo výdychových plynoch, tak za účelom monitoringu vplyvov kontaminácie

z pracovného prostredia na zloženie výdychových plynov, ako aj za účelom sledovania výdychových plynov u ľudí s rôznymi ochoreniami.

Hlavné výhody zariadenia INCAT oproti iným bezrozpušťadlovým extrakčným metódam sú jednoduchosť, robustnosť zariadenia a možnosť kvantitatívne zachytiť látky so širokým spektrom prchavosti a polarity.

Pod'akovanie

Prácu podporila Agentúra na podporu výskumu a vývoja pod číslom projektu APVV-0416-10 a Univerzita Komenského v Bratislave (grant UK/483/2012 a UK/428/2012).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Risby T.H. (2005). Current Status of Clinical Breath Analysis. In: Amann A., Smith D. (eds.) Breath Analysis for Clinical Diagnosis and Therapeutic Monitoring. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Singapore, p. 251.
- [2] Schubert J.K., Miekisch W., Nöldge-Schomburg G.F.E. (2005). VOC Breath Markers in Critically Ill Patients. In: Amann A., Smith D. (eds.) Breath Analysis for Clinical Diagnosis and Therapeutic Monitoring. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Singapore, p. 267.
- [3] Phillips M. (2003). Analysis of Volatile Organic Compounds in the Breath. In: Marczin N. (ed.) Disease markers in exhaled breath. Marcel Dekker Inc. New York, p. 219.
- [4] Buszewski B., Keşy M., Ligor T., Amann A. (2007) Biomed. Chrom. 21, p. 553.
- [5] Krkošová Ž., Kubinec R., Soják L., Amann A. (2008) J. Chromatogr. A 1179, p. 59.
- [6] Mochalski P., Wzorek B., Sliwka I., Amann A. (2009) J. Chromatogr. B 887, p. 1856.

Vplyv reakčných podmienok bez rozpúšťadla na enantioselektívnu Michealovu adíciu katalyzovanú vodíkovými väzbami

Martina Hesticová, Radovan Šebesta

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; martina.hestericova@gmail.com

Abstrakt

Thiourea organocatalysts are capable of donating hydrogen bonds, which activate carbonyl or imine groups for a nucleophilic attack. Furthermore, appendant tertiary amine group within the catalyst can activate nucleophile as well. Several thiourea organocatalysts capable of hydrogen bond catalysis were synthesized and tested on two model Michael additions in solvent and under solvent-free conditions in a ball mill. Products of these reactions can serve as precursors for synthesis of biologically active compounds, such as deacetylase inhibitors, cyclin dependent kinase inhibitors, compounds with serotonin antagonist activity; in general for preparation of anticancer agents. This methodology also includes green approach by lowering the necessary amount of solvents.

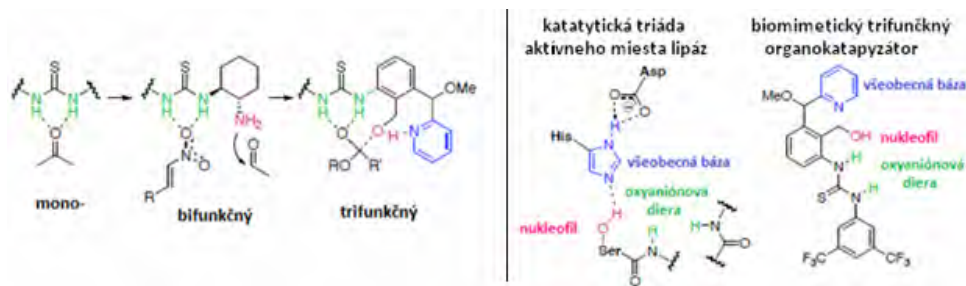
Kľúčové slová: *organokatalýza; Michaelova adícia; tiomočovínové katalyzátory; guľový mlyn.*

Úvod a formulácia cieľa

Organokatalytické asymetrické reakcie bez prítomnosti kovov sú veľmi účinnou a environmentálne prijateľnou stratégiou pre syntézy chirálnych stavebných blokov mnohých zlúčenín vo vysokých výťažkoch s vysokou enantioselektívnou čistotou. Výhodou je eliminácia kontaminácie produktu potenciálne nebezpečným kovom a tým zníženie zdravotného rizika pri syntéze liečiv. Organokatalýza je kompatibilná s modernými syntetickými technikami, medzi ktoré patrí aj mechanická aktivácia v guľových mlynoch.

Vodíkové väzby patria medzi prítlačlivé nekovalentné interakcie. Sú slabšie, menej závislé od medziatómovej vzdialenosti a viac ovplyvnené entropiou než kovalentné interakcie [1]. Vodíková väzba s elektrofilom znižuje elektrónovú hustotu na elektrofilnom atóme, čím dochádza k zníženiu energie LUMO elektrofilu, teda k jeho aktivácii voči nukleofilnému ataku. Tento princíp je často uplatňovaný aj v prírode prostredníctvom enzýmovej katalýzy.

Organokatalyzátory obsahujúce vo svojej štruktúre donory vodíkovej väzby tvoria veľmi úspešné bifunkčné a trifunkčné katalyzátory pre mnoho reakcií [2]. Biomimetický prístup tiomočovín spočíva v orientovaní reagentov a v stabilizácii tranzitného stavu reakcie. Podobný prístup je možné nájsť v enzýmoch ako napr. serínové proteázy a aldolázy, alebo HIV-1 proteáza [3,4]. Medzi najnovšie trendy patrí vývoj bifunkčných a trifunkčných organokatalyzátorov odvodených od štruktúry aktívneho miesta serínových hydroláz (Obr. 1). Takéto katalyzátory mimikujú enzymatické systémy prostredníctvom simultánnej aktivácie elektrofilu aj nukleofilu [5].



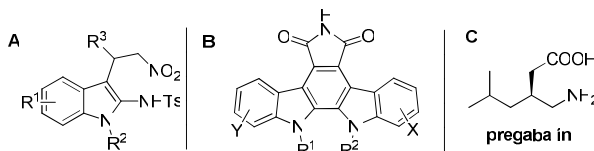
Obr. 1 Viacfunkčné katalyzátory a postup ich vývoja

Tiomočoviny sú organické katalyzátory správajúce sa ako slabé Lewisove kyseliny, ktoré na rozdiel od tradičnej katalýzy prechodnými kovmi operujú prostredníctvom dvojítych vodíkových väzieb[6].

Chen a kol. tvrdia, že energetický rozdiel medzi krátkymi, silnými a normálnymi vodíkovými väzbami je veľmi citlivý na rozpúšťadlá v ich okolí. Tento energetický rozdiel sa rapídne zvyšuje spolu s rastúcou polaritou. Z toho vyplýva, že by katalýza za pomoci tiomočovínových katalyzátorov mohla prebiehať lepšie bez prítomnosti rozpúšťadla [7].

Vynechanie rozpúšťadiel alebo redukcia množstva rozpúšťadla patrí medzi jednu z hlavných možností pre zvýšenie „zelenosti“ chemického procesu [8]. Mechanochemia zabezpečuje dodanie energie, ktoré môže mať vplyv na kryštalitu tuhých látok, ich zahriatie, redukciu veľkosti častíc, vznik defektov a dier v kryštalových mriežkach, alebo lokálne topenie látok. V guľových mlynoch dochádza k mechanickej aktivácii, teda k modifikácii reakčných podmienok a k zvyšovaniu reaktivity[9].

Produkty modelových reakcií je možné priamo alebo sprostredkované použiť ako liečivá. Produktom prvej modelovej reakcie je derivát indolu (Obr. 2A), ktorý sa využíva na syntézu inhibítorov exonického urýchľovača splicingu (Obr. 2B). Tie sa dajú využiť pri syntézach liečiv proti HIV-1 RNA splicingu, pri liečbe genetických ochorení a v boji proti rakovine [10]. Druhá modelová reakcia môže slúžiť ako predloha pre optimalizáciu procesu výroby pregabalínu (obr. 2C), liečiva proti epilepsii a neuropatickej bolesti [11].



Obr. 2 Štruktúra liečiv založených na indoloch

Hlavným cieľom práce bola príprava tiomočovínových organokatalyzátorov a ich testovanie na dvoch modelových Michaelových adíciách. Katalyzátory boli testované v rozpúšťadle a v podmienkach bez rozpúšťadla.

Materiál a metódy

Priebeh reakcií bol sledovaný TLC analýzou (Silufol, viz. UV 254 nm alebo KMnO_4). Na stĺpcovú chromatografiu sa používal silikagél 65/40 (Merck). ^1H a ^{13}C NMR spektrá vzoriek boli namerané na prístroji Varian NMR System 300 s pracovnou frekvenciou 300 MHz (^1H) a 75 MHz (^{13}C). Ako vnútorný štandard bol použitý tetrametylsilán, rozpúšťadlo CDCl_3 , alebo d_6 -DMSO. Michaelove adície bez prítomnosti rozpúšťadla boli uskutočnené v oscilačnom mlyne MM400 (firma Retsch) s pracovnou frekvenciou 20 Hz. Identita známych zlúčenín bola potvrdená porovnávaním ^1H -NMR a ^{13}C NMR spektier s údajmi v literatúre. Enantiométna čistota bola stanovená pomocou enantioselektívnej HPLC na kolóne Chiracel OD-H (Daicel Chemical Industries, Ltd.) a UV detektorom (254 nm). Všetky rozpúšťadlá boli pred použitím v reakciách vysušené a predestilované.

Všeobecný postup pre Michaelovu adíciu bez prítomnosti rozpúšťadla

Zmes *trans*- β -nitrostyrénu (50 mg, 0,335 mmol), katalyzátora (0,065 mmol) a indolu (1. modelová reakcia; 45 mg, 0,385 mmol) alebo dimetyl-malonátu (2. modelová reakcia; 88,5 mg, 0,67 mmol) a K_2CO_3 (2. modelová reakcia; 10 mg, 0,07 mmol) sme vložili do reaktora guľového mlynu s objemom 5 ml spolu s 1 oceľovou guľičkou s priemerom 0,5 cm. Reakcia prebiehala pri pracovnej frekvencii 20 Hz po dobu 6 hodín. Priebeh reakcie sme sledovali TLC analýzou (hexán/EtOAc 4:1). Surovú reakčnú zmes sme rozdelili stĺpcovou chromatografiou (SiO_2 ; hexán/ EtOAc 4:1).

Všeobecný postup pre Michaelovu adíciu indolu s nitrostyrénom v rozpúšťadle

K roztoku *trans*- β -nitrostyrénu (15 mg, 0,15 mmol) a katalyzátora (0,02 mmol) v 200 μl suchého DCM sme pridali indol (17,6 mg, 0,1 mmol). Reakčnú zmes sme nechali reagovať pri RT po dobu 72 hodín. Priebeh reakcie sme sledovali TLC analýzou (hexán/EtOAc 4:1). Po odstavení reakcie bola reakčná zmes zahustená na RVO, dosušená na HV a rozdelená stĺpcovou chromatografiou (SiO_2 ; hexán/ EtOAc 4:1).

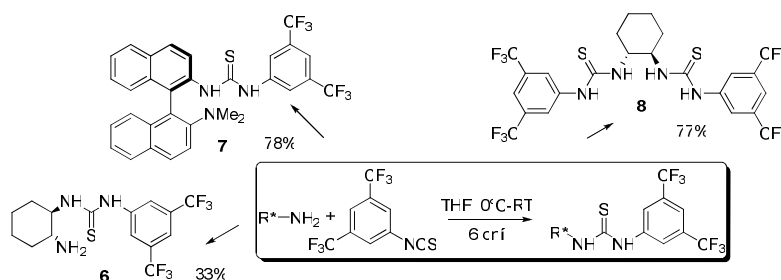
Všeobecný postup pre Michaelovu adíciu malonátu s nitrostyrénom v rozpúšťadle

Dimetyl-malonát (39,6 mg, 0,3 mmol), *trans*- β -nitrostyrén (17 mg, 0,1 mmol) a K_2CO_3 (3 mg, 0,02 mmol) sme rozpustili v 2 ml suchého toluénu. Pod inertom sme pridali katalyzátor (0,02 mmol) a reakčnú zmes miešali pri -30°C po dobu 72 hodín. Priebeh reakcie sme sledovali TLC analýzou (hexán/EtOAc 4:1). Po odstavení reakcie bola reakčná zmes zahustená na

RVO, dosušená na HV a rozdelená stĺpcovou chromatografiou (SiO₂; hexán/ EtOAc 4:1).

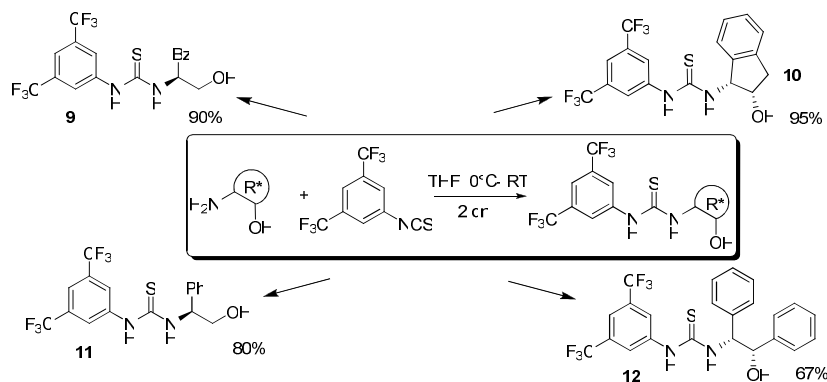
Výsledky a diskusia

Projekt sme začali syntézou katalyzátorov potrebných pre Michaelove adície. Syntéza tiomočovínových katalyzátorov prvého typu vychádza z komerčne dostupného alebo nami pripraveného chirálneho amínu, ktorý sa aduje na bis(trifluorometyl)fenyl-izotiokyanát za vzniku katalyzátora **6** v 33 % výťažku, katalyzátora **7** v 78 % výťažku a katalyzátora **8** v 77 % výťažku (Obr. 3).



Obr. 3- Syntéza tiomočovín prvého typu

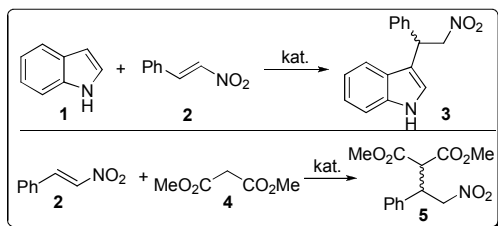
Syntéza tiomočovín druhého typu vychádza z komerčne dostupného aminoalkoholu, ktorý sa aduje na bis(trifluorometyl)fenyl-izotiokyanát za vzniku katalyzátora **9** v 90 % výťažku, katalyzátora **10** v 95 % výťažku, katalyzátora **11** v 80 % výťažku a katalyzátora **12** v 67 % výťažku (Obr.4).



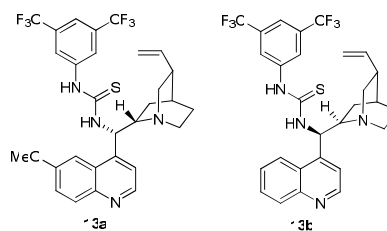
Obr. 4 Syntéza tiomočovín druhého typu

Takto pripravené katalyzátory sme následne testovali na dvoch modelových Michaelových adíciách v podmienkach s rozpúšťadlom alebo bez rozpúšťadla v guľovom mlyne (Obr.5). Na reakciách boli vyskúšané aj katalyzátory pripravené v našej výskumnej skupine (Obr. 6). Reakciou indolu **1** s nitrostyrénom **2** za prítomnosti katalyzátorov sme

získali výt'azky v intervale 18 – 95%, pomery enantiomérov sú uvedené v tabuľke 1.



Obr. 5 Modelové Michaelove adície



Obr. 6 Testované katalyzátory

Tab. 1: Výsledky Michaelových adícií I.

Exp	Katalyzáto r	Podmienky	Výt'azok (%)	e.r.
1	6	DCM, RT, 3 dni	55	50:50
2	7	DCM, RT, 3 dni	83	48:52
3	8	DCM, RT, 3 dni	95	52:48
4	9	DCM, RT, 3 dni	95	45:55
5	10	DCM, RT, 3 dni	56	21:79
6	11	DCM, RT, 3 dni	95	54:46
7	12	DCM, RT, 3 dni	90	50:50
8	13a	DCM, RT, 3 dní	70	60:40
9	13a	gul'. mlyn, 6 h	42	63:37
10	13b	gul'. mlyn, 6 h	24	10:89
11	6	gul'. mlyn, 6 h	63	50:50
12	7	gul'. mlyn, 6 h	26	49:51
13	8	gul'. mlyn, 6 h	32	40:60
14	9	gul'. mlyn, 6 h	95	47:53
15	10	gul'. mlyn, 6 h	79	42:58
16	11	gul'. mlyn, 6 h	95	52:48
17	12	gul'. mlyn, 6 h	65	53:47

Ako vidíme v tabuľke 1, výsledky reakcií s katalyzátormi **8**, **13a** a **9** indikujú lepšie enantioselektivity v prípadoch uskutočnenia reakcií bez prítomnosti rozpúšťadla za mletia v gul'ovom mlyne. Reakciou dimetyl-malonátu **4** s nitrostyrénom **2** sme získali výt'azky v intervale 60-90%, pomery enantiomérov sú uvedené v tabuľke 2.

Tab. 2. Výsledky Michaelových adícií II.

Exp.	Katalyzátor	Podmienky	Výt'azok (%)	e.r.
1	7	Toluén, -30°C, 3 dni	11	62:38
2	8	Toluén, -30°C, 3 dni	90	51:49
3	10	Toluén, -30°C, 3 dni	74	35:65
4	7	gul'. mlyn, 4,5 h	66	96:3
5	8	gul'. mlyn, 4,5 h	60	46:53
6	9	gul'. mlyn, 4,5 h	89	70:30
7	10	gul'. mlyn, 4,5 h	71	90:10
8	11	gul'. mlyn, 4,5 h	85	86:13
9	12	gul'. mlyn, 4,5 h	85	24:76
10	13a	gul'. mlyn, 4,5 h	78	75:24
11	13b	gul'. mlyn, 4,5 h	65	55:44

Ako vidíme v tabuľke 2, katalyzátory **7** a **10** vykazujú výrazne lepšie enantioselektivity v prípade uskutočnenia reakcie bez prítomnosti rozpúšťadla. Preto budeme aj ďalej pracovať na potvrdzovaní tejto teórie.

Záver

Počas práce bola študovaná Michaelova adícia v podmienkach v rozpúšťadle aj bez rozpúšťadla v guľovom mlyne. V rámci štúdia sme testovali účinok rôznych tiomočovínových organokatalyzátorov a optimalizovali reakčné podmienky. Pri príprave katalyzátorov sa nám podarilo zvýšiť výtťažky oproti výsledkom publikovaným v literatúre. V prípade Michaelových adícií sme optimalizovali reakčné podmienky a pomocou uskutočnenia reakcie mletím v guľovom mlyne znížili reakčný čas z dní na hodiny. Testované katalyzátory poskytovali veľmi dobré výtťažky a dobré enantioselektivity. V prípade niektorých katalyzátorov sa nám podarilo potvrdiť hypotézu vyššej reaktivity a selektivity reakcií bez prítomnosti rozpúšťadla.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Jacobsen E. N., Knowles R. R. (2010) PNAS 107, p. 20678
- [2] Feng X., Liu X., Lin L. (2009) Chem. Commun., p. 6145
- [3] Halpern J., Trost B. M. (2004) PNAS 101, p. 5347
- [4] Wharton C. W., White A. J. (1990) Biochem. J. 270, p. 627
- [5] Organic division awards [Citované dňa 7.1.2013] <
[http://www.organicdivision.org/ama/orig/Fellowship/2009_2010_Awardees/Essays/U
m.pdf](http://www.organicdivision.org/ama/orig/Fellowship/2009_2010_Awardees/Essays/U
m.pdf)>
- [6] Connon S. J. (2006) Chem. Eur. J. 12, p. 5418
- [7] Chen J., McAllister M. A., Lee J. K., et al. (1998) J. Org. Chem. 63, p. 4611
- [8] Sheldon R. A. (2007) Green Chem. 9, p. 1273
- [9] Martins M. A., Frizzo C. P., Moreira D. N., et al. (2009) Chem. Rev. 109, p. 4140
- [10] Chen Z., Zheng D., Wu J. (2011) Org. Lett. 13, p. 848
- [11] Liu J., Wang X., Ge Y., et al. (2011) Tetrahedron 67, p. 636

Interakcie rôznych aniónových foriem fosforu s vybranými adsorbentami

Renata Hodossyová¹, Eva Chmielewská¹, Marek Bujdoš²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra environmentálnej ekológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Ústav laboratórneho výskumu geomateriálov (ÚLVG), Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika, rhodossy@gmail.com

Abstract

The aim of this work is to study the adsorption mechanisms of different phosphorus forms on the surface of zeolite, montmorillonite and oxohydroxide Fe (GEH) and to study the influence of competitive anions on phosphate adsorption from two- and multi-component mixed solutions, particularly in case of zeolite.

Kľúčové slová: adsorpcia; klinoptilolitový tuf; montmorillonit; anióny fosforu; interferencia adsorpcie

Úvod a formulácia cieľa

Hlavná anorganická oxoaniónová forma fosforu, vyskytujúca sa vo vodách, je ortofosforečnan. Ortofosforečnany sú stálym predmetom výskumu, najmä v súvislosti s intenzifikáciou eutrofizácie, ktorá je vyvolaná ich nadmerným prísunom do vôd [1]. Ortofosforečnany sa vo vodách vyskytujú prevažne vo forme PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- , $[\text{CaHPO}_4]^0$, $[\text{MgHPO}_4]^0$, $[\text{FeHPO}_4]^+$ alebo $[\text{CaPO}_4]^-$. V neutrálnej oblasti pH prevládajú v prírodných vodách HPO_4^{2-} a H_2PO_4^- [2]. Ióny PO_4^{3-} sa vyskytujú prevažne v alkalických vodách a prevládajú aj v odpadových vodách, v ktorých sú zvyšky detergentov, saponátov a rôznych zmäkčovačov vody, vytvárajúcich alkalické prostredie.

Fosforečnany sa v prírodných a úžitkových vodách vyskytujú len v malých koncentráciách, ktoré výnimočne preyšujú hodnotu 1 mg.l^{-1} [3]. Táto koncentrácia sa niekoľkonásobne zvyšuje v splaškových vodách, v ktorých pochádzajú fosforečnany prevažne z ľudských fekálií (35 %) a z čistiacich a pracích prostriedkov (60-65 %) [4,5]. Najmä odpadové vody z veľkopráčovni majú zvýšený obsah polyfosforečnanov (cca 100 mg.l^{-1}), ktoré sa rýchlo tepelne degradujú na jednoduché ortofosforečnany. Preto je ich čistenie nevyhnutné. Na odstraňovanie fosforečnanov možno využiť rôzne technologické postupy vrátane adsorpcie. V súčasnosti je adsorpcia považovaná, v prípade vhodne zvoleného a dostupného adsorbenta, za proenvironmentálnu a účinnú metódu odstraňovania nežiaducich látok z vôd. Preto sa predkladaný príspevok zaoberá štúdiom adsorpcie fosforu vo forme oxoaniónov na klinoptilolitový tuf, ODA-zeolit a oxohydroxid železa GEH¹⁰⁴ ako aj vplyvu síranov, chloridov a dusičnanov vo viacložkových zmesiach na ich adsorpčné vlastnosti.

Materiál a metódy

Použité prístroje a zariadenia

Na stanovenie rovnovážnych koncentrácií fosforu (prepočítaných na fosforečnan) sa použil ICP spektrometer Jobin Yvon 70 Plus (Francúzsko) s technikou stanovenia ICP-OES pri vlnovej dĺžke 213.6 nm. Rovnovážne koncentrácie síranov a dusičnanov v modelových roztokoch sa stanovili na izotachofertickom analyzátoze ZK – 02 (Villa Labeco, SR).

IČ a Ramanove spektrá sa zmerali u čistých a fosfátizovaných vzoriek adsorbentov. Do pulverizovanej vzorky s hmotnosťou 10 mg ($\pm 0,0001$ g) bolo pridaných 3 mg KBr. Vzorka s KBr bola zhomogenizovaná v achátovej miske. Homogénny prášok bol zlisovaný do tablety. IR spektroskopia bola zrealizovaná na FTIR spektrometri NICOLET 6700, meraná v strednej IR oblasti ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$) transmisnou technikou. Ramanove spektrá boli merané s totožným metodickým postupom na rovnakom prístroji pomocou ramanovského modulu Nicolet NXR FT-Raman (InGaAs detektor, polovodičový laser, pri 976 nm).

Pri adsorpčných experimentoch sa tiež použili horizontálna laboratórna trepačka Water Bath Shaker Type 357 ELPAN (210 kmitov/min), laboratórne analytické váhy (elektronické) RADWAG (Česká republika) a centrifúga s uhlovým rotorom CENCOM II.

Použité chemikálie

$\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ a $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ (Lachema, Brno, Česká republika) s východiskovou koncentráciou 300 mg.l^{-1} (pre jednotlivé aniónové formy) sa použili na prípravu modelového jednozložkového roztoku. Pre porovnanie kvantitatívneho rozsahu adsorpcie uvedených oxoaniónových foriem fosforu s polyfosforečnanom na klinoptilolitovom tufe, ODA-zeolite a GEH¹⁰⁴ sa použil roztok hexametafosforečnanu sodného (NaPO_3)₆, ktorý bol ekvimolárny s $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$.

Ekvimolárne roztoky fosforečnanov s chloridmi, síranmi a dusičnanmi sa pripravili z nasledovných chemikálií: $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$, NaCl a KNO_3 , ktorých dvoj- a viaczložková zmes bola určená nasledovne:

- I. $\text{PO}_4^{3-} : \text{SO}_4^{2-}$
- II. $\text{PO}_4^{3-} : \text{Cl}^-$
- III. $\text{PO}_4^{3-} : \text{Cl}^- : \text{SO}_4^{2-} : \text{NO}_3^-$

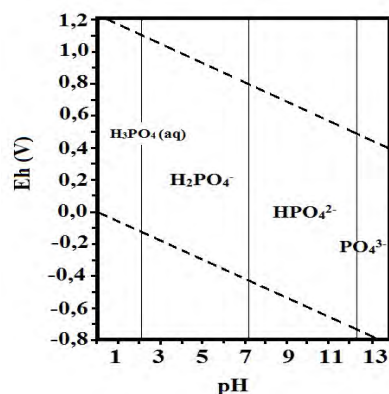
Tiež sa pripravili dvojzložkové roztoky z vyššie uvedených chemikálií, kde hmotnostné koncentrácie aniónov boli rovnaké ($C_0 = 300 \text{ mg.l}^{-1}$).

K nasýteniu jednotlivých adsorbentov fosforečnanom pre účely jeho identifikácie pomocou IČ a Ramanových spektier sa použil roztok $100 \text{ g.l}^{-1} \text{ PO}_4^{3-}$ s 10 g adsorbenta. Táto suspenzia sa ponechala v kontakte v dynamických podmienkach po dobu 3 hodín, pričom

tuhý adsorbent sa následne oddelil, dekantoval v deionizovanej vode a vysušil. Všetky použité chemikálie boli p.a. čistoty.

Výsledky a diskusia

Prevládajúce anióny fosforu i pre nami študované adsorpčné zmesi sú uvedené v Eh-pH diagrame na obr.1 [6].

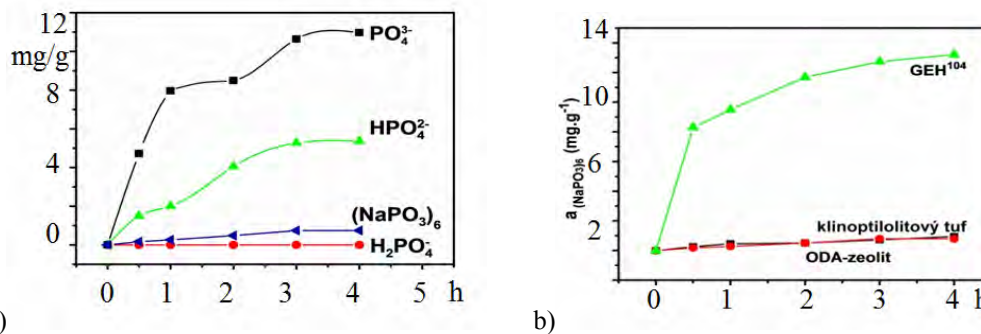


Obr.1 Špeciácia fosforu na základe hodnôt Eh a pH v systéme P – O – H

Na obr.2a je možné vidieť časovú závislosť (kinetiku) adsorpcie fosforečnanu, hydrogén-, dihydrogénfosforečnanu a polyfosforečnanu na klinoptilolitovom tufe. Fosforečnan sa adsorboval na povrchu tufu oveľa efektívnejšie ako hydrogénfosforečnan, ktorého dosiahnutá adsorpčná kapacita bola po 4 hod. nižšia takmer o 50%. Zaujímavé je, že polyfosforečnan a dihydrogénfosforečnan nevykazovali významnú afinitu k povrchu klinoptilolitového tufu a ich adsorpčná kapacita, a to najmä v prípade dihydrogénfosforečnanu, bola v porovnaní s fosforečnanmi a hydrogénfosforečnanmi zanedbateľná.

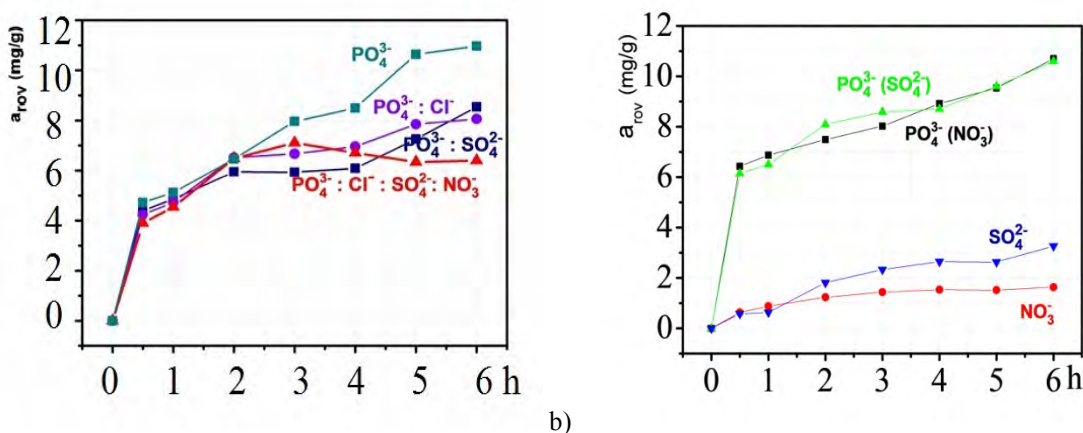
Na obr.2b je porovnaná adsorpčná kapacita klinoptilolitového tufu, GEH¹⁰⁴ a ODA-zeolitu v rôznych časových intervaloch vzájomného kontaktu adsorbenta s fosforečnanom. ODA-zeolit je hydrofobizovaný zrnitý zeolit (typ klinoptilolit), ktorý bol upravený primárnym oktadecylamínovým tenzidom (ODA) [7]. Úprava povrchu zeolitu však neprispela významnou mierou k zvýšeniu adsorpčnej kapacity. Za nízku efektivitu adsorpcie modifikovaným a prírodným zeolitom je pravdepodobne zodpovedná veľkosť polyfosforečnanu, pretože otvory ich pórov sú rádovo menšie ako molekula HMF a tak tento objemný komplex nedokázal penetrovať ani do vonkajších pórov adsorbenta. GEH¹⁰⁴ dosiahol po 4 hod. adsorpcie kapacitu 13,2 mg.g⁻¹, a teda odstránil 12,7 % z pôvodného obsahu polyfosforečnanu, čo naznačuje, že mechanizmus adsorpcie na tento typ adsorbenta je odlišný

ako v prípade zeolitu. Uvedený komerčný adsorbent je na báze oxohydroxidov železa, ktoré majú všeobecne vysokú afinitu ku oxoaniómom, ktoré viažu koordinácnou väzbou.



Obr.2a Adsorpčná kapacita klinoptilolitového tufu pre rôzne aniónové formy v závislosti od času
Obr.2b Adsorpčná kapacita vybraných adsorbentov pre polyfosforečnan v závislosti od času

Fosforečnanom kontaminované vody obsahujú zvyčajne aj ďalšie anióny, ktoré môžu konkurenčne vplyvať na adsorpciu polutantov. Pri štúdiu odstraňovania fosforečnanu z dvoj- a viaczložkových zmesných ekvimolárnych roztokov s dusičnanmi, síranmi a chloridmi sme stanovili rovnovážnu adsorpčnú kapacitu klinoptilolitového tufu pre fosforečnan (obr.3a). Na obr.3b uvádzame zmeny v adsorpčnej kapacite klinoptilolitového tufu pre fosforečnan, dusičnan a síran z ich dvojjzložkových roztokov ako kinetickú závislosť.



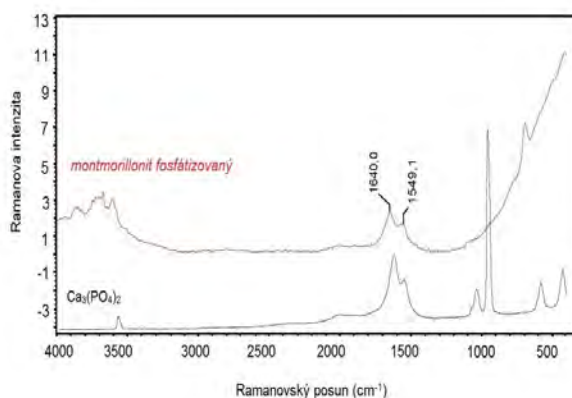
Obr.3a Vplyv sprievodných aniónov vôd na adsorpciu fosforečnanu na klinoptilolitovom tufe vo vzájomných ekvimolárnych zmesiach

Obr.3b Adsorpčná kapacita klinoptilolitového tufu pre odstraňovanie fosforečnanu z ich dvojjzložkových zmesí s dusičnanom a síranom (s rovnakou hmotnostnou koncentráciou pre jednotlivé anióny, $C_0 = 300 \text{ mg.l}^{-1}$) v závislosti od času

Z výsledkov experimentov vyplýva, že v použitých ekvimolárnych roztokoch sa adsorpcia fosforečnanu znížila o 23 % v prítomnosti síranov a o 27 % v prítomnosti chloridov. Pokles adsorpcie po 4 hod. bol významný najmä v prítomnosti zmesi dusičnanov, síranov a chloridov, kedy došlo k zníženiu adsorpcie fosforečnanového aniónu až o 42 %. Zníženie účinnosti adsorpcie študovaného oxoaniónu fosforu na zeolite v prítomnosti iného

aniónu je možné prisúdiť konkurencii o sorpčné pozície na adsorbente a tiež zmenám elektrostatického náboja na povrchu adsorbenta. Tento trend poklesu je v prítomnosti koexistujúcich aniónov pravdepodobne spojený s veľkosťou náboja konkurujúcich aniónov, kedy anióny chloridu a dusičnanu znižujú adsorpčnú kapacitu menej ako sírany alebo jeho zmes s chloridmi a dusičnanmi.

V binárnych roztokoch PO_4^{3-} s NO_3^- a SO_4^{2-} , v ktorých boli ich hmotnostné koncentrácie zhodné, nepreukázala sa žiadna interferencia adsorpcie fosforečnanu zo strany dusičnanov a síranov. Hodnota adsorpčnej kapacity klinoptilolitového tufu pre odstraňovanie fosforečnanu z dvojzložkovej zmesi s dusičnanmi (alebo síranmi) je približne rovnaká ako adsorpčná kapacita z jeho modelového roztoku bez sprievodných aniónov. Z použitých analytických metód (IR, Raman) sa nám doposiaľ podarilo potvrdiť len prítomnosť fosforečnanu vápenatého na povrchu montmorillonitu, ktorého spektrum spolu s čistým fosforečnanom vápenatým uvádza obr.4.



Obr.4 Potvrdenie výskytu adsorbovaného fosfátu na povrchu montmorillonitu pomocou Ramanovej spektroskopie

Záver

Z jednotlivých foriem fosforu sa čistý fosforečnan adsorboval s najvyššou účinnosťou na klinoptilolitovom tufe. Po ňom nasleduje hydrogénfosforečnan, ktorý sa adsorboval v pomerne veľkom rozsahu v porovnaní s jeho protonizovanou formou - dihydrogénfosforečnanom a polyfosforečnanom. Polyfosforečnan bol však pomerne účinne odstránený na komerčnom oxohydroxide železa, ktorého aktívne zložky (akagenit a goethit) pravdepodobne vytvárali s polutantom dostatočne pevné väzby. Náboj aniónu zrejme ovplyvňuje kvantitatívny rozsah adsorpcie, pričom ak je súčin rozpustnosti pKs rôznych aniónov fosfátu s kationmi Ca, Mg alebo Fe z povrchu použitých adsorbentov nižší, tým sa

vytvára intenzívnejšia a pevnejšia väzba resp. afinita týchto špecií k povrchu študovaných adsorbentov.

Pod'akovanie

Práca bola podporená MŠ SR v rámci projektu VEGA 1/0185/12.

Použitá literatúra

- [1] Pitter, P. (2009) Hydrochemie. VŠCHT Praha, Praha, ČR p. 217
- [2] Drtil, M, Hutňan, M. (2007) Technologický projekt - časť Procesy a technológie čistenia odpadových vôd. FCHPT STU, Bratislava, SR, p. 15
- [3] Tölgyessy, J. (1993) Chemistry and biology of water, air and soil. Environmental Aspects. Elsevier, Netherlands, p. 346
- [4] Rybicki, S. (1997) Advanced Wastewater Treatment. Phosphorus removal from wastewaters – A Literature Review. Kungl Tekniska Högskolan, Stockholm, p. 121
- [5] Horváthová – Chmielewská, E. (1995) Čistenie a úprava vôd. Vysokoškolské skriptá Prírodovedecká fakulta UK Bratislava, STIMUL – Centrum informatiky a vzdelávania FF UK Bratislava, p. 32
- [6] Atlas of Eh – pH diagrams. Intercomparison of thermodynamic databases (2005). National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Research Center for Deep Geological Environments, Japan
- [7] Chmielewská, E., Sabová, L., Jesenák, K. (2008) J. Therm. Anal. Calorim. 92 (2), p. 567

Development of Synthesis Methodology and Synthesis of Small-molecule VEGFR-2 Inhibitors of Tumor Angiogenesis Using Cycloaddition Reactions

Jana Holekšiová, Peter Šramel, Andrej Boháč

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika; jana.holeksiova@gmail.com

Abstrakt

Cancer is currently considered to be one of the most dangerous life-threatening diseases. Supporting vascular system, which formation is essential for vitality and progression of cancer cells, is created mainly in a process termed angiogenesis (formation of blood vessels from surrounding existing vessels). VEGFR-2 is the most profound angiogenic receptor, which inhibition through specific small-molecule agents illustrates a perspective method for cancer therapy.

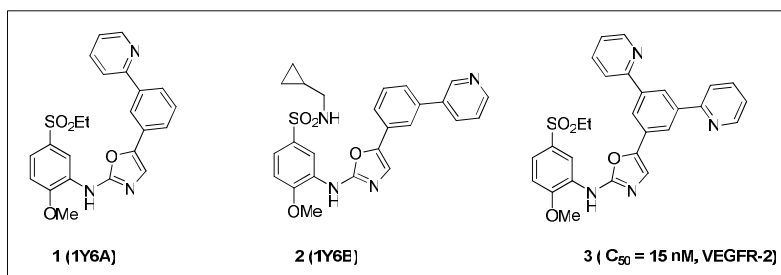
In our paper we describe a developed methodology of the synthesis of aldehyde **18**, which is a precursor of an important oxazolalkyne **6**. We want to use compound **6** to verify a new method of synthesis developed by us angiogenic inhibitor **3** by [2+2+2] cycloaddition reaction. We also describe the preparation method of developed precursor **25** by [3+2] cycloaddition reaction, from which we plan prepare computer predicted N-aryl-1,2,3-triazole derivatives of compound **8**.

Kľúčové slová: *angiogenesis; VEGFR-2 inhibitors; [2+2+2] and [3+2] cycloaddition reactions*

Úvod a formulácia cieľa

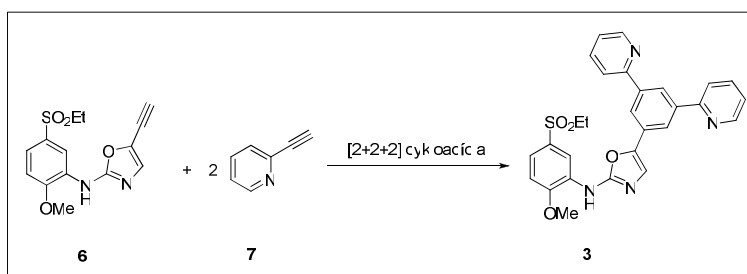
Nádorové bunky, rovnako ako bunky všetkých tkanív, potrebujú pre svoju progresiu a prežitie podporné tkanivá, ktoré im zabezpečujú prísun živín a energie. Dôležitou súčasťou týchto tkanív je cievny systém, ktorý primárne vzniká prostredníctvom procesu, ktorý sa nazýva angiogenéza. Vaskulárne endoteliálne rastové faktory (VEGF) a ich príslušné tyrozínkinázové receptory (VEGFR) zastávajú funkciu centrálnych angiogénnych regulátorov. Signalizácia rastového faktora VEGF prostredníctvom receptora VEGFR-2 patrí medzi kľúčové angiogénne cesty, ktorej inhibícia pomocou špecifických nízkomolekulových látok predstavuje perspektívnu stratégiu liečby rakovinových ochorení [1].

Naša výskumná skupina sa zaoberá vývojom nízkomolekulových zlúčenín, ktoré sú schopné pôsobiť ako ATP-kompetitívne inhibítory intracelulárnej tyrozínkinázovej domény VEGFR-2 receptora. Na základe publikovaných štruktúr komplexov receptor/inhibítora v PDB databáze 1Y6A (**1**) a 1Y6B (**2**) [2], molekulového modelovania a in Silico dokovania sme nedávno vyvinuli VEGFR2 inhibítora **3** [3] (Error! Reference source not found.). Biologické testovanie tejto látky potvrdilo vysokú, koncentračne závislú, inhibičnú aktivitu voči receptoru VEGFR-2 ($IC_{50} = 15$ nM).



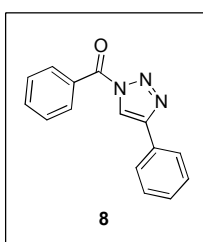
Obr. 1. Štruktúry VEGFR-2 inhibítorov z komplexov v PDB: 1Y6A (**1**) a 1Y6B (**2**), ako aj štruktúra a enzymatická inhibičná aktivita nami vyvinutého inhibítora **3**.

Cieľom nášho projektu je uskutočnenie syntézy nízkomolekulového alkínu **6** a jeho následná premena na cieľový VEGFR-2 inhibítor **3** prostredníctvom [2+2+2] cykloadičnej reakcie s 2-etinylpyridínom (**7**) (Obr.).



Obr. 2. Nový spôsob prípravy cieľového inhibítora **3** prostredníctvom [2+2+2] cykloadičnej reakcie ligandu **6** s 2-etinylpyridínom (**7**).

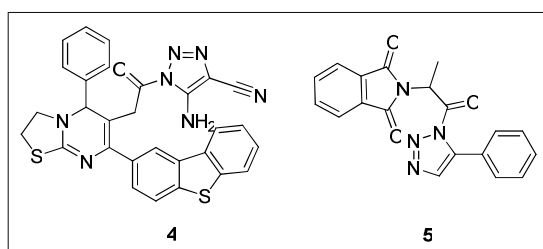
Okrem vyššie uvedeného pracujeme aj na vývoji metodiky na prípravu biologicky zaujímavých N-aryltriazolových zlúčenín typu **8**, ktoré plánujeme pripraviť s využitím [3+2] cykloadičnej reakcie katalyzovanej meďnými soľami (**Error! Reference source not found.**).



Obr. 3. N-aryl-1,2,3-triazolový skelet **8**.

U organických molekúl obsahujúcich triazolový skelet bola pozorovaná antibakteriálna, antivirálna, antimikrobiálna, fungicídna, protizápalová a analgetická aktivita [4]. Hoci niekoľko N-aryltriazolových derivátov už bolo pripravených, ich biologická aktivita zostáva neznáma. Pravdepodobné obmedzenie ich väčšieho výskytu je v náročnosti

ich syntézy, ktorá nie je doposiaľ veľmi opísaná. Napriek tomu, niektoré zlúčeniny obsahujúce karbonylovú skupinu susediacu s jedným z triazolových dusíkov sú v literatúre opísané. Antibakteriálne a fungicídne účinky sú opísané napr. pre inhibítor **4** [5]. Inhibícia rastu buniek *Staphylococcus aureus* a *Aspergillus niger* je známa napr. pre inhibítor **5** [6] (**Error! Reference source not found.**).



Obr. 4. Známe biologicky aktívne N-aryol-1,2,3-triazoly **4**, **5**.

Podľa našich počítačových predikcií sa N-aryol-1,2,3-triazolové deriváty ukazujú ako zaujímavé nosné skelety látok s inhibičným účinkom na tyrozínkinázový receptor VEGFR-2. Metodika na ich priamu prípravu pomocou [3+2] cykloadície aryloylazidov s alkínmi nebola doteraz v literatúre opísaná a ukazuje sa byť neuskutočniteľná za katalytických alebo aj termických podmienok.

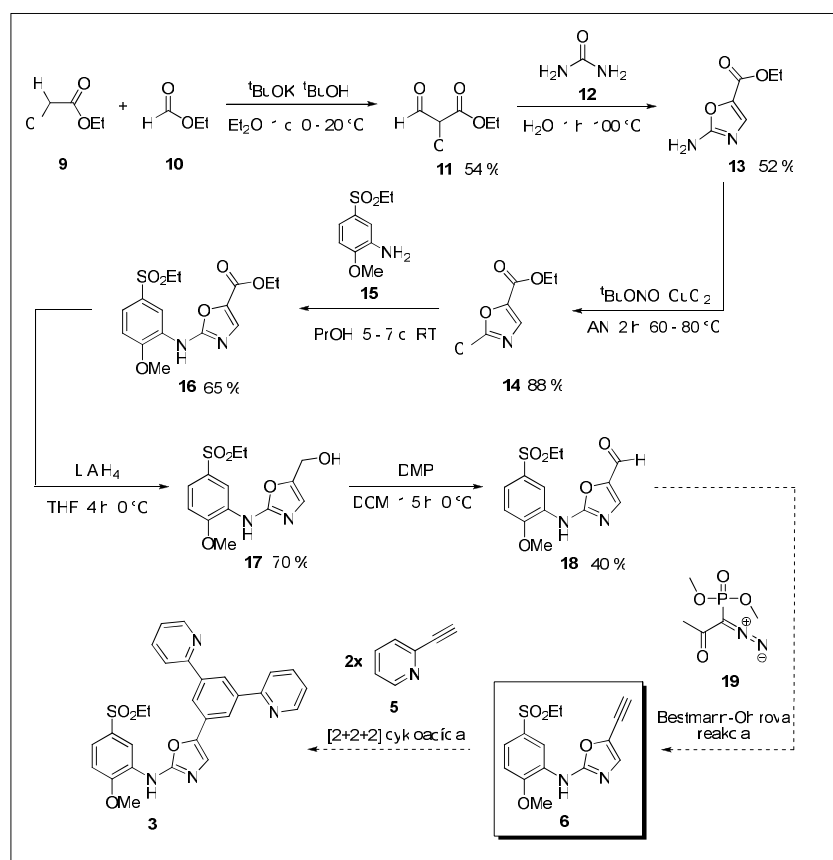
Materiál a metódy

^1H , ^{13}C NMR spektrá boli merané v CDCl_3 , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ a DMSO_{d6} na prístrojoch Varian Gemini (300 a 75 MHz), ako vnútorný štandard bol používaný tetrametysilán (TMS). Priebeh reakcií sme sledovali TLC analýzou (Merck Silica gel 60 F254), na vizualizáciu sa používala UV lampka 254 nm a pary jódu. Na FLC sa používal silikagél Merck 60 (40 – 63 μm). Teploty topenia boli namerané prostredníctvom Koflerovho aparátu a nie sú korigované. Infračervené spektrá boli merané na prístroji FT-IR ThermoNicolet iS10. Všetky použité rozpúšťadlá boli sušené pomocou CaH_2 , alebo sodíka. Komerčne dostupné zlúčeniny boli zakúpené od firmy Sigma-Aldrich.

Výsledky a diskusia

Pri návrhu prípravy nízkomolekulového ligandu **6** a jeho následnej premeny na angiogénny inhibítor **3** sme postupovali retrosynteticky, pričom sme využili údaje z vedeckých databáz Reaxys a SciFinder Scholar, ako aj z primárnej vedeckej literatúry. Za najvhodnejšiu syntetickú cestu sme zvolili postup vychádzajúci z komerčne dostupných

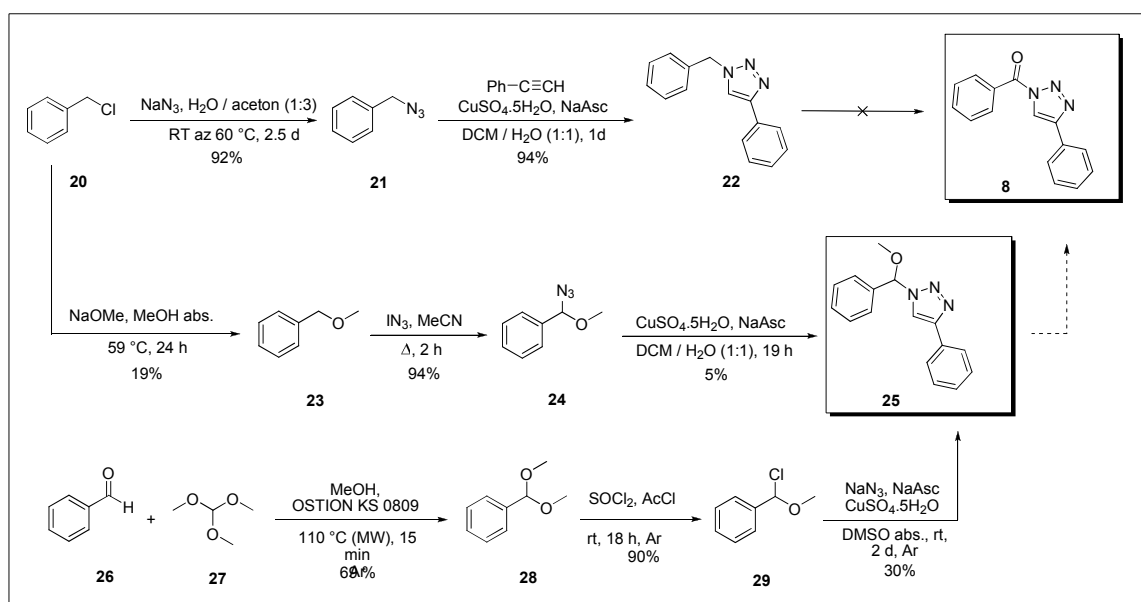
chemikálií chlóractanu etylového **9** a mravčanu etylového **10**, ktoré v bázičkom prostredí poskytl etyl 2-chlór-3-oxopropionát (**11**) vo výťažku 54 %. Tento intermediát po zahriatí reagoval s močovinou **12** za vzniku aminooxazolcarboxylátu **13** s 52 % výťažkom. Zlúčeninu **13** sme reakciou s ^tBuONO a CuCl₂ premenili na chlór oxazolcarboxylát **14** s výťažkom 88 %. Syntéza pokračovala reakciou chlór oxazolcarboxylátu **14** s anilínom **15** za prítomnosti ^tPrOH, a poskytla arylaminooxazolcarboxylát **16** vo výťažku 65 %. Tento sme premenili na arylaminooxazolmetanol **17** redukciou s LiAlH₄ s výťažkom 70 % a následná oxidácia látky **17** s DMP (Dess-Martin Periodinan) poskytla arylaminooxazolcarbaldehyd **18** vo výťažku 40 %. V súčasnosti pracujeme na premene arylaminooxazolcarbaldehydu **18** na alkínový ligand **4** pomocou Bestmann-Ohira reakcie s dimetyl 1-diazo-2-oxopropylfosfonátom (**19**) [7]. Finálnu syntézu angiogénneho inhibítora **3** zamýšľame uskutočniť [2+2+2] cykloadičnou reakciou alkínového ligandu **6** s 2-etinylpyridínom **5** [8] (Obr. 2).



Obr. 2. Schéma syntetického postupu prípravy kľúčového alkínového ligandu **6**, z ktorého chceme prostredníctvom [2+2+2] cykloadičnej reakcie pripraviť angiogénny inhibítor **3**, ako aj modulárne ďalšie predikované VEGFR-2 inhibítory (ich štruktúry nie sú v tomto príspevku uvedené).

Vývoj metodiky na prípravu N-aryl-1,2,3-triazolov sme začali pomocou [3+2] cykloadície katalyzovanej meďnými soľami pomocou ktorej sme si pripravili intermediát **22**,

ktorý sme následne chceli zoxidovať za vzniku požadovanej cieľovej zlúčeniny **8**. Táto oxidácia sa nepodarila uskutočniť hoci bola skúšaná za rôznych reakčných podmienok (oxidácia pomocou $K_2S_2O_8$, $NH_4S_2O_8$, oxón, $KMnO_4$). Oxidácia neprebehla pravdepodobne kvôli silne deaktivujúcemu účinku 1,2,3-triazolového jadra a možnej nestabilite N-aryltriazolu **8** za použitých reakčných podmienok. Následne sme využili druhý syntetický postup (Obr. 3). V tomto prípade sme taktiež vychádzali z benzylchloridu (**20**), pričom sme pripravili kľúčový intermediát **25** z azidu **24** v 5 % výťažku. Vzhľadom na nízky výťažok danej *click* reakcie sme sa rozhodli využiť tretiu syntetickú cestu. Vychádzali sme z benzaldehydu (**26**) a pripravili sme požadovaný intermediát **25** v dostatočnom množstve s výťažkom 30 % po izolácii. Na poslednom oxidatívno-hydrolytickom stupni premeny **25** na produkt **8** pracujeme.



Obr. 3. Schéma prípravy nízkomolekulového ligandu **8** s využitím [3+2] cykloadičnej reakcie.

Záver

Pri príprave nízkomolekulového farmakoforicky dôležitého ligandu **6** sa nám dosiaľ podarilo pripraviť arylaminoxazolkarbaldehyd **18** v 40 % výťažku. V súčasnosti pracujeme na premene aldehydu **18** na alkínový ligand **6** za podmienok Bestmann-Ohira reakcie.

Pri vývoji metodiky prípravy biologicky zaujímavých a v literatúre len veľmi málo opísaných N-aryl-1,2,3-triazolov sa nám podarilo pripraviť príslušné *click* intermediáty **22** a **25** pomocou [3+2] cykloadície katalyzovanej meďnými soľami vo výťažku 30 %. Finálna príprava N-aryltriazolu **8** z kľúčového intermediátu **25** nie je zatiaľ ukončená.

Pod'akovanie

Chceli by sme poďakovať za finančnú podporu Vedeckej grantovej agentúre Ministerstva školstva SR, Grant Univerzity Komenského UK/456/2013 a za počítačové predikcie štruktúr potenciálnych inhibítorov Bc. Jurajovi Dobiašovi a Biomagi, s.r.o.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Lohela M., Bry M., Tammela T., Alitalo K. (2009) *Curr. Opin. Cell. Biol.* 21, p. 154
- [2] Harris P. A., Cheung M., Hunter R. N., et al. (2005) *J. Med. Chem.* 48, p. 1610
- [3] Lintnerová L. (2013) (Dizertačná práca), Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava.
- [4] Shanmugavelan P., Nagarajan S., Sathishkumar M., et al. (2011) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, p. 7273
- [5] Aly A. A. (2008) *J. Heterocycl. Chem.* 45, p. 993
- [6] Abdou W. M., Ganoub N. A., Sabry E. (2009) *Z. Naturforsch., B: Chem. Sci., B: Chem. Sci.*, 64, p. 1057
- [7] Haustedt L. O., Panicker S. B., Kleinert M., et al. (2003) *Tetrahedron* 59, p. 6967
- [8] Li J., Jiang H. (2001) *J. Org. Chem.* 66, p. 3627

Príprava derivátov rigidizovaného trifenylamínu s možným optoelektronickým využitím

Miroslav Horváth, Ivica Sigmundová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie,
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; mirek.horvath@gmail.sk

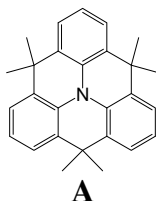
Abstrakt

Materials based on triarylamine have a relatively wide use in the preparation of the compounds for electronic applications, because of their interesting photochemical, electrochemical and optoelectronic properties. Rigidized triphenylamine is generally prepared by addition of alkyl or aryllithium reagent or with Grignard reagent to 2,2',2''-nitrotrisbenzoic acid trimethylester. The resultant tertiary alcohol is then subjected to electrophilic substitution yielding rigidized triphenylamine. The work is focused on the synthesis of new derivatives of rigidized triphenylamine with benzothiazole acceptor group. Synthesis of these compounds has not been described in literature yet.

Kľúčové slová: rigidized triphenylamine; reduction; push – pull system; benzothiazole

Úvod a formulácia cieľa

Rigidizovaný trifenylamín **A** patrí po formálnej stránke k azapyrénom. Premostenie v *orto*- polohách benzénových jadier voči dusíku umožňuje lepšiu konjugáciu, vyššiu rigiditu a planaritu systému [1] (Obr. 1).



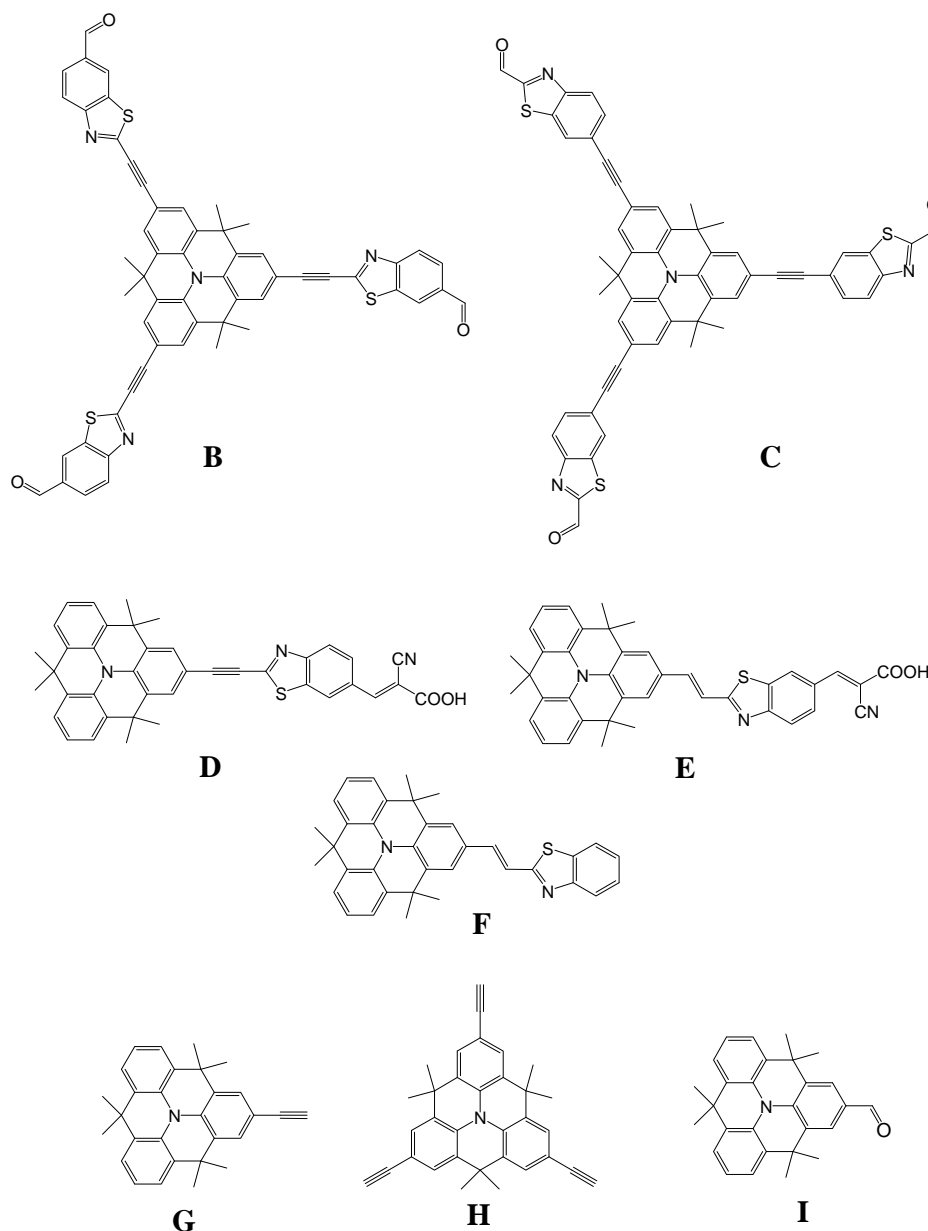
Obr. 1 Rigidizovaný trifenylamín

V poslednom období sa zaznamenáva výrazný pokrok v používaní organických materiálov pre elektronické aplikácie. Tieto materiály našli praktické uplatnenie v rôznych oblastiach života ako napr. vývoj a použitie xerografických technológií, organických tranzistorov (*field effect transistor*) či materiály pre výrobu solárnych článkov. V praxi sa často využívajú pri konštrukcii organických svetlo emitujúcich diód (OLED).

V literatúre je popísaných niekoľko typov zlúčenín obsahujúcich fragment rigidizovaného trifenylamínu, predovšetkým rôzne typy oligomérnych a dendrimérnych štruktúr, ako aj zlúčeniny s potenciálnym využitím pre solárne články [2].

Cieľom projektu je príprava nových derivátov premosteného, rigidizovaného trifenylamínu- oktapolárnych a dipolárnych systémov s benzotiazolovou akceptornou skupinou- štruktúry **B - F**. Prekurzory **G** a **H**, potrebné na syntézu cieľových štruktúr, sa

prípravajú zo základného rigidizovaného trifenylnamínu **A** *couplingovými* reakciami. Prekurzor **I** je vhodný na prípravu zlúčenín s eténovým premostením donorného a akceptorového fragmentu finálnej molekuly (Obr. 2).



Obr. 2 Prekurzory a cieľové zlúčeniny

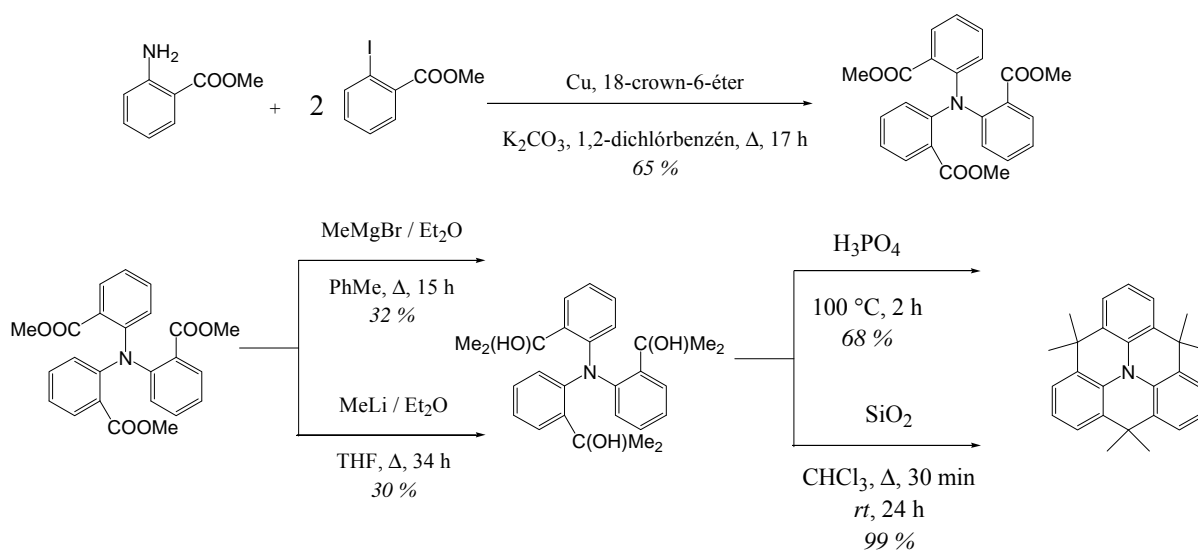
Navrhnuté štruktúry predstavujú nový typ zlúčenín, ktoré zatiaľ neboli ešte opísané literatúrou. Prítomnosť izopropylidénovej premostujúcej skupiny spôsobuje lepšiu planaritu trifenylnamínového fragmentu a tým lepšiu konjugáciu a prenos náboja v molekule. Vďaka tomu by mali mať uvedené zlúčeniny lepšie fyzikálno-chemické a spektrálne vlastnosti ako analogické deriváty jednoduchého trifenylnamínu, s ktorými budú porovnávané.

Materiál a metódy

Zlúčeniny sú charakterizované ^1H spektrami, nové zlúčeniny ^1H a ^{13}C spektrami namerané na prístroji Varian Mercury+ pri frekvencii 300 MHz (^1H) a 75 MHz (^{13}C). Ako vnútorný štandard sa použil tetrametylsilán a ako rozpúšťadlo sa použil CDCl_3 . Priebeh reakcií bol sledovaný tenkovrstvovou chromatografiou (Silufol, vizualizácia s UV 254 nm). Teploty topenia boli namerané na Koflerovom aparáte Bodotávok Electrothermal IA-9200, neboli korigované. UV a *vis* spektrá boli merané na spektrofotometri JENWAY 6705.

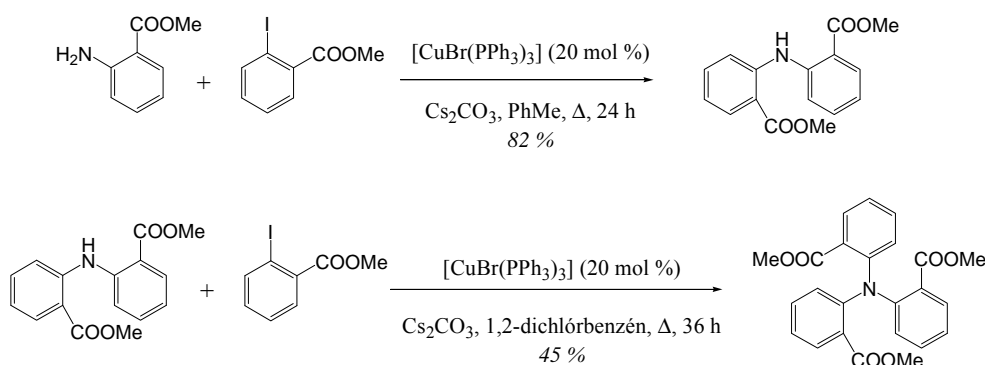
Výsledky a diskusia

Najdôležitejšou úlohou pri syntéze je príprava prekursora- rigidizovaného trifenylnamínu. Syntéza obvykle pozostáva z prípravy trimetylésteru kyseliny 2,2',2''-nitro-trisbenzoovej Ullmanovou reakciou. Následne sa ester redukuje metyllítom alebo metylmagnéziumbromidom a vznikajúci terciárny alkohol sa cyklizuje dehydratáciou v kyslom prostredí. Štandardne sa používa na dehydratáciu kyselina trihydrogenfosforečná, nám sa to však podarilo kvantitatívne s oxidom kremičitým [3] (Obr. 3).



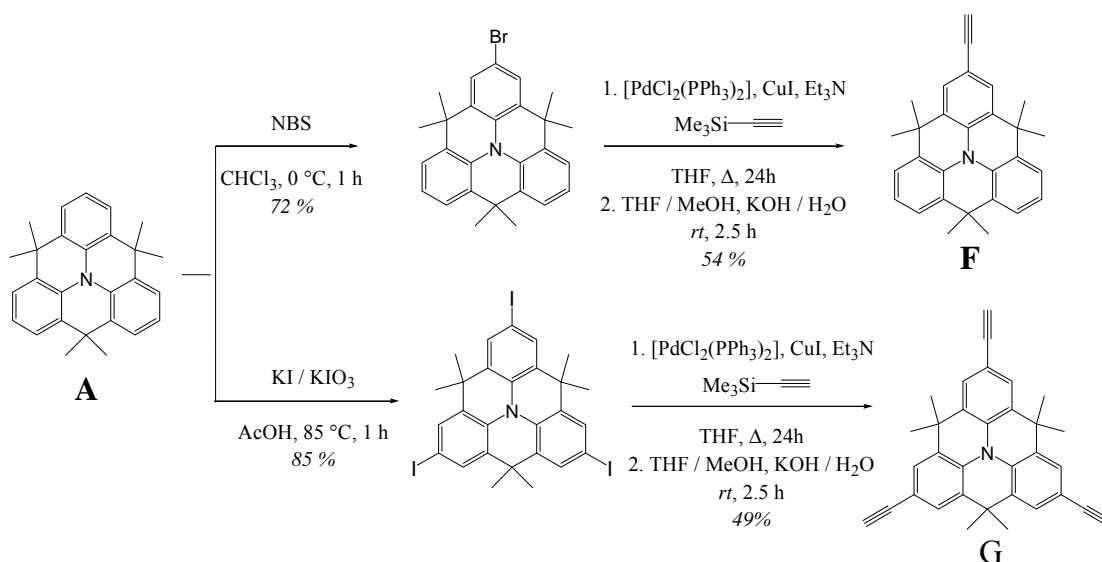
Obr. 3 Syntéza rigidizovaného trifenylnamínu

Príprava trojnásobného esteru je možná aj navrhnutou dvojkrokovou syntézou s využitím komplexnej zlúčeniny medi $[\text{CuBr}(\text{PPh}_3)_3]$ [4] (Obr. 4).



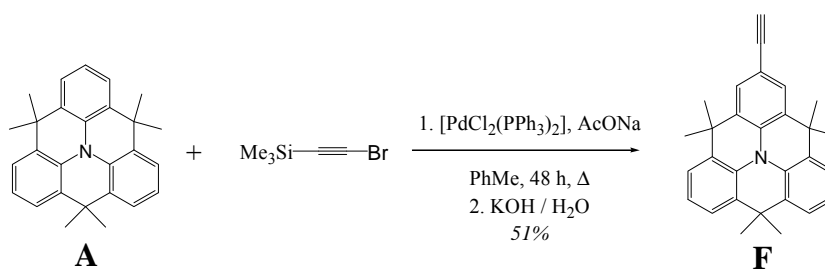
Obr. 4 Syntéza trojnásobného esteru komplexom medi

Ďalším krokom v syntéze bola halogenácia a zavedenie acetylénovej skupiny. Pre prípravu monoalkínu **F** sa osvedčila elektrofilná monobromácia a následný Sonogashirov *coupling* s trimetylsilylacetylénom. Syntéza alkínového prekursora **G** prebiehala zase najprv prípravou trijódderivátu a opäť jeho reakciou s trimetylsilylacetylénom [5] (Obr. 5).



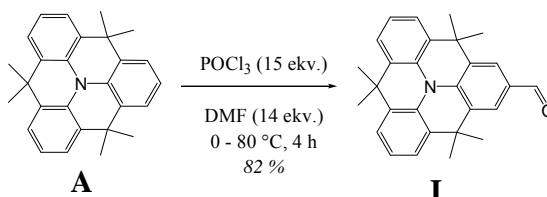
Obr. 5 Príprava alkínových prekursorov F a G

Syntéza prekursora sa nám podarila aj inzerciou paládia do C–H väzby, čo je pre podobné štruktúry inak atypické (Obr.6).



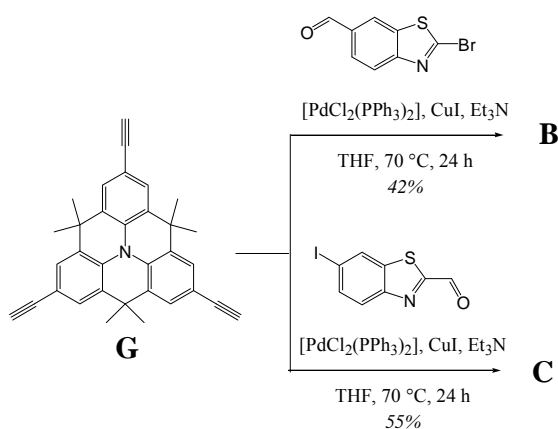
Obr. 6 Príprava alkínového prekursora F inzerciou paládia do C–H väzby

Posledným prekursorom s rigidizovaným trifenylamínom je karbaldehyd **I**, ktorý sa pripravuje Vilsmeier- Haackovou formyláciou (Obr. 7). Aj napriek vyššiemu množstvu chloridu fosforylu (15 ekvivalentov) vzniká prakticky výlučne monoformylovaný derivát.



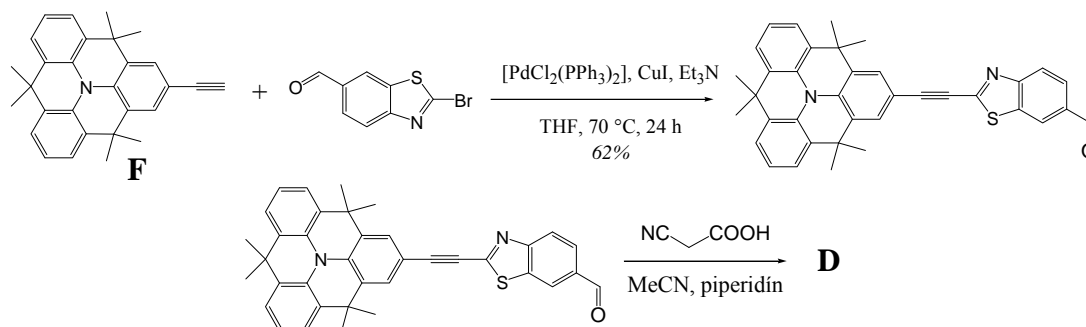
Obr. 7 Vilsmeier- Haackova formylácia

Záverečným typom reakcie je paládiom katalyzovaný *coupling*. Týmto sa pripravujú finálne oktupolárne zlúčeniny **B** a **C** (Obr. 8).



Obr. 8 Syntéza oktupolárnych systémov **B** a **C**

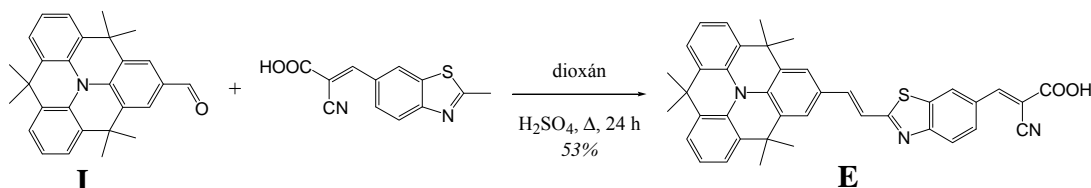
Cross-couplingová reakcia sa využila aj pri príprave dipolárnej zlúčeniny **D**, Voľná aldehydová skupina umožňuje kondenzáciu s mononitrilom kyseliny malónovej (Obr. 9).



Obr. 9 Syntéza dipolárnej kyseliny

Kondenzačnou reakciou bola syntetizovaná dipolárna zlúčenina **E**, s výrazným *push-pull* charakterom u ktorej predpokladáme nelineárne optické vlastnosti a možné využitie pre solárne články. Vzhľadom na prítomnosť karboxylovej skupiny nie je možné uskutočniť

bázicky katalyzovanú kondenzačnú reakciu a zároveň metylová skupina benzotiazolu v polohe 2 nie je dostatočne kyslá a bolo by potrebné použiť silnejšiu bázu. Preto musí byť katalyzovaná kyslým prostredím H_2SO_4 (Obr. 10).



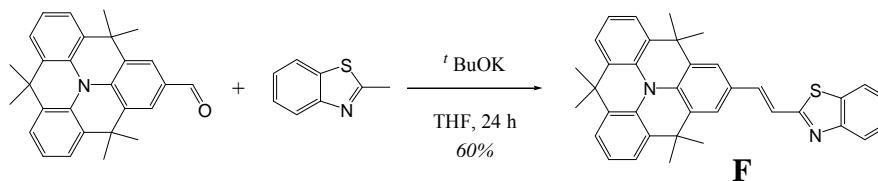
Obr. 10 Kyslo katalyzovaná kondenzácia

Pre štruktúru **E** bolo merané UV/vis spektrum. Namerané hodnoty sú v tab. 1.

Tab. 1 UV/vis parametre zlúčeniny **E** (merané v CHCl_3)

zlúčenina	A	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$	$\epsilon / \text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
E	0,794	495	27 294

Knoevenagelova reakcia 2-metylbenzotiazolu s monoaldehydom **I** poskytuje v bázickom prostredí zlúčeninu **F**. Reakcia uvedená na obr. 11 znázorňuje syntézu s použitím $t\text{BuOK}$ ako bázy. Ako báza bol použitý aj pyridín a KOH , reakcia však neprebehla.



Obr. 11 Knoevenagelova kondenzácia

Záver

Podarilo sa nám úspešne pripraviť nové deriváty rigidizovaného trifenylnamínu **B**, **C**, **E** **F**. Ďalším cieľom je príprava zlúčeniny **D** dodatočnou kondenzáciou pripraveného aldehydu s mononitrilom kyseliny malónovej. Zlúčeniny **D** a **E** majú potenciálne využitie pre solárne články. Preto budú testované na zahraničných pracoviskách, s ktorými spolupracujeme.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Hellwinkel D., Schmidt W. (1980) Chem. Ber. 113, p. 358
- [2] Do K., Kim D., Cho N., Paek S., Song K., Ko J. (2012) Org. Lett. 14, p. 222
- [3] Fang Z., Teo T.-L., Cai L., Lai Y.-H., Samoc A., Samoc M. (2009) Org. Lett. 11, p. 1
- [4] Gujadhur R., Venkataraman D., Kintigh, J. T. (2001) Tetrahedron Lett. 42, p. 4791
- [5] Pramanik T. (2011) Cyclophane and bridged triphenylamine based organic materials for optical applications. (Dissertation) Department of chemistry, National University of Singapore, Singapur, p. 172

Stanovenie ^{129}I pomocou x-ray spektrometrie

Bianka Horváthová, Silvia Dulanská

Univerzita Komenského v Bratislava, Prírodovedecká fakulta, Katedra jadrovej chémie,
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika
horvathovabianka@centrum.sk

Abstrakt

Radionuclide ^{131}I strongly accumulates in the thyroid gland and leads to disruption of thyroid function and formation of tumors not only in the thyroid gland, but also in other endocrine glands and organs functionally associated with the thyroid gland. Highly sensitive measurements of volume activity of radioactive aerosols in the atmosphere detected radioactive substances from nuclear power plant accident in Fukushima in the atmosphere and also within in Slovakia. Nuclear power plant accident in Fukushima resulted in the release of significant radionuclides ^{131}I , ^{134}Cs , ^{137}Cs . Identified activities fissile radionuclides in Europe after the accident in Fukushima were 3- to 4-time lower than activities that were after the accident at Chernobyl.

Kľúčové slová: ^{131}I ; ^{129}I ; štítna žľaza; Fukushima

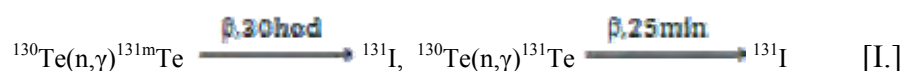
Úvod a formulácia cieľa

Jód je dôležitý biogénny prvok, ktorý je nevyhnutý pre náš zdravý vývoj. Má množstvo izotopov, z ktorých najdôležitejší je ^{131}I . Rádiojódom ^{131}I sa intenzívne sorbuje až do 100%. Akumuluje sa v štítnej žľaze a dokonca pri príjme nevelkých množstiev jódu sa v nej absorbujú veľké dávky žiarenia, ktoré vedú k narušeniu viacerých funkcií štítnej žľazy a vzniku nádorov nielen v štítnej žľaze, ale aj v iných endokrinných žľazách a orgánoch (mliečna žľaza, gonády), ktoré sú funkčne spojené so štítnou žľazou [1]. Testy jadrových zbraní, mnoho jadrových havárií, medzi ktoré patrí aj havária jadrovej elektrárne v Černobyle a jadrovej elektrárne vo Fukushime, mali za následok zvýšenú pozornosť ohľadom aktivity rádiojódu v ovzduší [2]. Bunky štítnej žľazy rádiojódom vychytávajú, metabolizujú a hromadia ho. Pri nečakaných situáciách, keď je ^{131}I uvoľnený do vzduchu by mali byť obyvatelia okamžite upozornení na možné riziká. Rádionuklid ^{131}I patrí do 2. triedy rádiotoxicity. Iné rádionuklidy ako ^{123}I , ^{125}I , ^{129}I patria do 3. triedy rádiotoxicity [3].

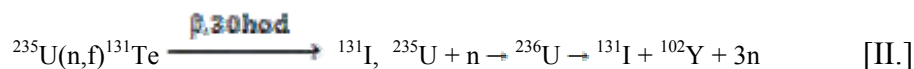
Tab 1 Najvýznamnejšie izotopy jódu [4]

Izotop	Hmotnostné číslo	Doba polpremeny	Typ polpremeny, radiácia, energia, absolútne a relatívne intenzity
^{129}I	128.904989	1.57×10^7 r	β^- 0.15; γ 0.03958 (7.50% A)
^{131}I	130.9061269	8.04d	β^- 0.61, 0.33; γ 0.080183 (2.62% A), 0.284298 (6.06% A), 0.364480 (81.2% A), 0.636973 (7.27% A), 0.722893 (1.80% A)

Izotop ^{131}I sa vyrába v jadrovom reaktore aktiváciou ^{130}Te podľa reakcií [5]:



Môže sa získať aj ožarovaním ^{235}U neutrónmi a následnou štiepnou reakciou [5]:



V diagnostike sa využíva hlavne jeho 364 keV energia gama žiarenia a pre terapiu nádorového a funkčného ochorenia štítnej žľazy je využitá 606 keV energia beta žiarenia [5].

V roku 1986 sa stala nečakaná tragédia - výbuch jadrovej elektrárne Černobyľ. Informovanosť obyvateľov o možných katastrofálnych následkoch z ožiarenia v dôsledku uvoľnenia ^{131}I bola minimálna. Štúdie potvrdili po 25 rokoch po nehode jadrovej elektrárne v ukrajinskom Černobyle, že expozícia ^{131}I zo spadu je zodpovedná za rakovinu štítnej žľazy, ktorá sa stále vyskytuje u ľudí, ktorí žili v oblasti Černobyľu a v dobe nehody boli v detskom alebo dospievajúcom veku [2]. Pri tejto havárii uniklo do ovzdušia množstvo rádionuklidov, medzi ktoré patrí aj izotop jódu ^{131}I . Naša krajina zaznamenala zvýšenú aktivitu jódu v dažďových vodách, ale nie v takom rozsahu aby to bolo nebezpečné pre naše zdravie.

Materiál a metódy

Popis vzorky: Na separáciu ^{129}I bola použitá vzorka tieniacej kazety z odstavenej jadrovej elektrárne V1 v Jaslovských Bohuniciach pod označením č. 4640. Vzorka na separáciu jódu sa pripravila lúhovaním v 40 ml lúčavke kráľovskej.

Úloha I Vzorka tieniacej kazety z odstavenej jadrovej elektrárne V1: Do 5 ml výluhu vzorky č. 4640 sa pridalo $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ nosiča $^{60}\text{Co}^{2+}$ (z dôvodu odstránenia železa aj kobaltu zo vzorky) a $15 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ nosičového roztoku - neaktívneho jódu, v tomto prípade ^{127}I vo forme jodidu draselného KI. Jód sa môže vo vzorke nachádzať vo forme jodidov I^- , jodičnanov IO_3^- alebo jodistanov IO_4^- preto je dôležité upraviť oxidačný stav všetkých foriem jódu. Upravenie oxidačného stavu je možné len v zásaditom prostredí, preto sa do vzorky pridalo 9-10 ml $6 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaOH. Pri pH 9-10 sa zároveň zrážali všetky formy jódu, ktoré sa v roztoku nachádzali. Po vyzrážaní vzorky sa do kadičky pridalo 1g hydroxylamín-hydroxylchloridu, čím sa dosiahla redukcia na I^- formu. pH roztoku sa následne upravilo s $6 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HCl na pH= 4-5. Do roztoku sa následne pridalo $6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ paládia. Vznikla

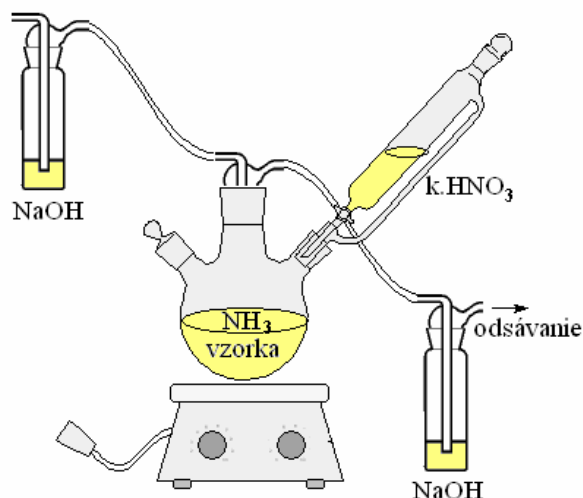
čierna zrazenina, jodid paládnatý PdI_2 . Zrazenina sa scentrifugovala ($6000 \text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$) a premývala 2-krát s $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HCl . Do zrazeniny PdI_2 sa pridalo okolo 5 ml deionizovanej vody a $0,5 \text{ mg Co}^{2+}$ (odstránenie zbytkovej aktivity rádionuklidu ^{60}Co). Následne sa roztok prefiltraval cez filtračný papier. Na dosiahnutie maximálneho výťažku separácie sa centrifugačná skúmavka premývala etanolom. Zrazenina PdI_2 sa odvážila na váhach Sartorius a vypočítal sa chemický výťažok separácie. Aktivita rádionuklidu ^{129}I sa merala na nízkoenergetickom meracom zariadení Silicon (Li) X-Ray detektor SL 12155.

Úloha II Separácia ^{129}I vo vzorkách heterogénneho odpadu: Heterogénny odpad, ktorý sa použil na analýzu pochádza z jadrovej elektrárne v Mochovciach a patrí medzi najzložitejšie vzorky pre rádiochemickú analýzu. Heterogénny odpad s označením č. 4653 bol zložený hlavne z plastov, textílii, rukavíc a kúskov kovu. Dominantnými rádionuklidmi v analyzovanom heterogénnom odpade sú ^{60}Co , ^{58}Co , ^{54}Mn , $^{110\text{m}}\text{Ag}$, ^{95}Zr a ^{95}Nb v rozsahu aktivít od $\text{kBq}\cdot\text{kg}^{-1}$ – $10 \text{ MBq}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Postup: Vzorky boli digerované v prostredí $160 \text{ ml } 6 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaOH po dobu štyroch hodín. Do digerovaných vzoriek sa pridala nosič $15 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 1-2 g hydroxylamín - hydroxylchloridu pre redukciiónu na jodidy. pH roztokov sa upravilo na 4-5 s $6 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HCl . Do roztokov vzoriek sa pridalo $6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ paládia, vznikla čierna zrazenina – jodid paládnatý. Zrazeniny sa spolu s roztokom scentrifugovali ($6000 \text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$). Roztoky nad zrazeninami PdI_2 sa v oboch vzorkách vyliali do zbernej nádoby pre kvapalný rádioaktívny odpad. Zrazeniny sa premyli ešte dvakrát s $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ kyselinou chlorovodíkovou. Centrifugačné skúmavky sa premývali etanolom, aby sa dosiahol čo najvyšší výťažok separácie. Zrazeniny sa odvážili na váhach Sartorius a vypočítal sa výťažok separácie. Aktivita rádionuklidu ^{129}I sa merala na spektrometrickom zariadení Silicon (Li) X-Ray detektor SL 12155.

Úloha III Čistenie jódu destiláciou: Do $10 \text{ ml } 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HCl sa pridalo postupne: $0,6 \text{ g NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, $1 \text{ ml } 15 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ KI , $0,63 \text{ ml } 10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ PdCl_2 . Vzorka so zrazeninou PdI_2 sa scentrifuguje pri $6000 \text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$ a premýva sa $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HCl a dvakrát s 5 ml deionizovanej vody. Roztok nad zrazeninou PdI_2 sa dekantoval a zrazenina sa rozpustila v $3 \text{ ml } 25\%$ amoniaku. Pripravený roztok sa preniesol do varnej banky, ktorá sa následne umiestnila do ohrevného hniezda, vzorka sa ohrievala po dobu 20 min na $180 \text{ }^\circ\text{C}$ spolu s chemikáliami uvedenými v tabuľke 2. K roztoku sa pomaly po kvapkách pridávala koncentrovaná 65% kyselina dusičná až do uvoľnenia I_2 z roztoku (boli pozorované viditeľné

fialové jódové pary I_2). Pomocou jednoduchej aparatury (obr. 1) sa uvoľnený I_2 (g) zachytáva do roztoku NaOH.



Obr. 1 Destilačná aparatura použitá na čistenie jódu

Tab 2 Chemikálie, pridávajúce sa do ohrevnej banky

Číslo vzorky	HNO_3 [$mol \cdot dm^{-3}$] 50ml	$NaNO_2$ [g]	H_2O_2 [ml]	Mo^{6+} [ml]	Vyvíjanie jódu
1.	2	2	-	-	nie
2.	5	2	-	-	nie
3.	8	2	-	-	nie
4.	14,35	2	-	-	nie
5.	1	0,3	-	-	áno
6.	2	0,3	-	-	áno
7.	0,1	0,3	-	-	nie
8.	0,5	0,3	-	-	nie
9.	1	0,6	-	-	áno
10.	2	0,6	-	-	áno
11.	1	-	3	1	nie

Výsledky a diskusia

Výtťažok separácie ^{129}I vo vzorke tieniacej kazety bol 85,7%. Následne sa merala aktivita vzorky na nízkoenergetickom detektore a $<7,3 \text{ Bq} \cdot \text{kg}^{-1}$ (MDA). Keďže ^{129}I je β žiarič, ideálne by bolo meranie na kvapalinovom scintilačnom spektrofotometri, ktorého účinnosť je až 95%. Detekčná účinnosť s nízkoenergetickým detektorom je len 1-2%.

Aktivita vzorky heterogénneho odpadu č. 4652 a č. 4653 bola menej ako minimálne detegovateľná aktivita (MDA), vzorka heterogénneho odpadu č. 4652 (a $<0,57 \text{ Bq} \cdot \text{kg}^{-1}$), vzorka heterogénneho odpadu č. 4653 (a $<0,22 \text{ Bq} \cdot \text{kg}^{-1}$).

Na jednoduchej destilačnej aparatúre sa odskúšala metóda čistenia ^{129}I . Daný postup čistenia I_2 sa v súčasnosti optimalizuje v ďalších experimentoch v rámci diplomovej práce. Cieľom bude dosiahnuť vysokočistú frakciu potrebnú na stanovenie jódu kvapalinovou scintilačnou spektrometriou (TriCARB) s oveľa vyššou detekčnou účinnosťou (95%) oproti meraniu na spektrometrickom zariadení Silicon (Li) X-Ray detektor SL 12155 (detekčná účinnosť = 1%).

Na pripravených modelových vzorkách sa zistilo, že je nutné použiť aj vhodné činidlo na udržanie oxidačného stavu jódu, potrebného na destiláciu. Experimenty dokázali vhodnosť použitia NaNO_2 , a to pri množstvách 0,3 g - 0,6 g NaNO_2 a nižších koncentráciách kyseliny dusičnej 1-2 mol.dm⁻³ (Tab. 2).

Záver

Svet po havárii jadrovej elektrárne vo Fukushima okamžite reagoval a začal sledovať hodnoty ^{131}I , pretože rádioaktívny spad sa blížil k Európe. Aj napriek tomu, že táto havária poznačila značnú časť obyvateľstva Japonska, v európskych krajinách sa našťastie neobjavila zvýšená aktivita rádiojódu, ktorá by ohrozila zdravie ľuďstva. Mnoho krajín prijalo rôzne opatrenia, ktoré by zabránili hrozbe kontaminácie ^{131}I . Naša krajina zaznamenala zvýšenú aktivitu jódu v dažďových vodách, ale nie v takom rozsahu aby to bolo nebezpečné pre naše zdravie. Ak by sa porovnali hodnoty aktivít ^{131}I , pri rádioterapii sa jednému pacientovi podáva aktivita rádovo $1 \cdot 10^6$ Bq. Pri Černobyľskej havárii sa odhaduje celkový únik ^{131}I okolo $1,8 \cdot 10^{18}$ Bq a pri havárii Fukushimy sa odhaduje celkový únik ^{131}I okolo $1,3 \cdot 10^{17}$ Bq [6].

Pod'akovanie

Rada by som sa poďakovala svojej školiteľke RNDr. Silvii Dulanskej, PhD. za stály záujem, trpezlivosť a morálnu podporu, a taktiež môjmu konzultantovi RNDr. Borisovi Remenecovi.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Omega info [citované 23.11.2011].
<http://www.omegainfo.sk/ZAKVARAL09_Kuruc_Labaska_Radiacny_terozrizmus.pdf>
- [2] Fakulta špeciálneho inžinierstva, Žilinská univerzita [citované 26.2.2012].
<<http://www.fsi.uniza.sk/kpi/dokumenty/zph.pdf>>

- [3] ZZ SR, Nariadenie vlády SR č.12/2001 Z.z. o požiadavkách na zabezpečenie radiačnej ochrany.
- [4] Radiochemistry of iodine [citované 5.3.2013].
<<http://large.stanford.edu/courses/2011/ph241/noll1/docs/nas-ns-3062.pdf>>
- [5] Fakulta matematiky, fyziky a informatiky Univerzita Komenského, Bratislava, [citované 8.4.2012].
<http://www.fmph.uniba.sk/fileadmin/user_upload/editors/studium/svk/2009/JTF/bujnova.pdf>
- [6] Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej republiky, [citované 21.11.2011].
<http://www.uvzsr.sk/index.php?option=com_content&view=article&id=1121:aktualna-radiana-situacia-na-uzemi-slovenskej-republiky&catid=70>

Štúdium separácie alifatických a aromatických kyselín v jednom behu metódou kvapalinovej chromatografie

Iveta Hukelová, Radoslav Halko

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava, Slovensko; hukelova.iveta@gmail.com,

Abstrakt

A liquid chromatography with combination of ion exclusion (IEC) and reversed phase (RP) mechanisms for simultaneous separation of thirteen aliphatic acids and twenty three aromatic acids in a single run was developed. The separation of these acids was carried out on reversed-phase silica base analytical column Alltech Prevail™ organic acid, 5µm, 4,6 x 150mm using a gradient elution containing phosphate buffer/methanol mobile phase constituent. All measurements were done at 220 nm. The optimal separation variables such as methanol concentration, buffer solution concentration, pH and column temperature were investigated. The results show the advantage of using this method for separation all aliphatic and aromatic acids in a single run within 45 minutes. The next study of the proposed method can be applied to determination of some acids in various samples (human urine, soil, wine).

Kľúčové slová: kvapalinová chromatografia; alifatické a aromatické kyseliny; separácia

Úvod a formulácia cieľa

Iónovo-vylučovacia chromatografia (angl. ion-exclusion chromatography - IEC) sa často používa na separáciu anorganických a slabých organických kyselín. Analyty sú zvyčajne separované na kationovo-výmennej kolóne naplnenej s vysokokapacitnou sulfónovanou polystyrén-divinylbenzénovou živicom (PS-DVB) a s použitím kyseliny sírovej ako mobilnej fázy. Plne ionizované silné kyseliny sú odpudzované aniónovými funkčnými skupinami na živici, zatiaľ čo slabé kyseliny, predovšetkým v ich neutrálnej forme, penetrujú do vnútra nenabitej živice. Zadržiavanie slabých kyselín na tejto stacionárnej fáze preto závisí od ich pKa hodnôt ako aj od hodnoty pH mobilnej fázy [1].

Slabé hydrofóbne kyseliny akými sú aromatické kyseliny a vyššie alifatické kyseliny sú silno zadržiavané na kolóne v dôsledku spomenutých hydrofóbných interakcií. Na skrátenie elučných časov týchto kyselín je potrebný prídavok organického modifikátora (napr. metanol) do mobilnej fázy. Jeho koncentrácia je však limitovaná v dôsledku negatívneho efektu zmršťovania PS-DVB živice [1, 2].

Alternatívou k PS-DVB živiciam je použitie stacionárnej fázy s reverznou fázou naviazanou na silikagély, kde použitie organických modifikátorov nie je limitované. Otha et al. [3] uviedli, že pri $\text{pH} > 2$ sa silanolové skupiny na povrchu silikagélu správajú ako slabý kationový menič. Ďalšími výhodami silikagélovej kolóny je jej stabilita a inertnosť voči

organickým prídavkom a nižšia hydrofóbnosť v porovnaní s PS-DVB, čo umožňuje rýchlejšiu separáciu aromatických kyselín. Na základe týchto vlastností možno predpokladať, že sa tu uplatňuje zmiešaný mechanizmus na základe ktorého je možná separácia alifatických aj aromatických kyselín.

Cieľom tejto práce bolo štúdium retenčného správania sa vybranej skupiny alifatických a aromatických kyselín separovaných v jednom behu metódou kvapalinovej chromatografie.

Materiál a metódy

Prístroje a zariadenia

Na separáciu alifatických a aromatických kyselín bol použitý kvapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies - Santa Clara, California, USA) zložený z pumpy 1290 Infinity, automatického dávkovača 1290 Infinity, termostatu 1290 Infinity a DAD detektora 1290 Infinity. Systém je kompatibilný so softvérom EZChrom Elite ver. 3.3.2 Na separáciu karboxylových kyselín bola použitá kolóna Alltech PrevailTM organic acid, 5 μ m, 4,6 x 150mm (Grace – Deerfield, USA). Na meranie pH bol použitý pH meter Agilent 3200p (Agilent Technologies - Santa Clara, California, USA). Na prípravu roztokov boli použité automatické pipety Brand 100-1000 μ L, 10-100 μ L, 1-10 μ L, analytické váhy AR 0640 (Ohaus, USA), ultrazvuk UCM 9 (Ecoson, Nové Mesto nad Váhom, SR).

Chemikálie

Použitý metanol (Merck, Darmstadt, Nemecko) bol gradientovej čistoty. Štandardné referenčné roztoky alifatických a aromatických kyselín: (1) šťaveľová, (2) vínna, (3) jablčná, (4) malónová, (5) mliečna, (6) octová, (7) maleínová, (8) citrónová, (9) jantárová, (10) fumarová, (11) propiónová, (12) levulová, (13) metylénjantárová, (14) 1,2,4,5-benzéntetrakarboxylová, (15) galová, (16) 3,4-dihydroxybenzoová, (17) 3,5-dihydroxybenzoová, (18) trimellitic, (19) ftalová, (20) 2,6-dihydroxybenzoová, (21) 2,5-dihydroxybenzoová, (22) 4-hydroxybenzoová, (23) 2,4-dihydroxybenzoová, (24) vanilová, (25) syringová, kávová, (26) trimesic, (27) 2-metoxybenzoová, (28) 4-hydroxyškoricová, (29) benzoová, (30) 4-hydroxy-3-metoxyškoricová, (31) salicylová, (32) 4-metoxybenzoová, (33) 3-metoxyškoricová, (34) 2-metylbenzoová, (35) škoricová, (36) 3-metoxybenzoová. (Merck, Darmstadt, Nemecko) analytickej kvality boli riedené vodou Labconco (Kansas city, USA). Na prípravu fosfátového tlmivého roztoku bol použitý KH_2PO_4 od firmy Merck (Merck, Darmstadt, Nemecko), a 85 % H_3PO_4 (Merck, Darmstadt, Nemecko).

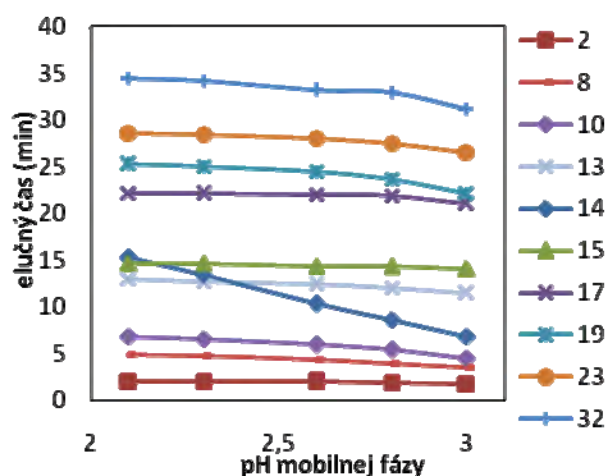
Výsledky a diskusia

Vplyv koncentrácie a pH tlmivého roztoku

Nakoľko karboxylové kyseliny obsahujú ionizovateľnú funkčnú skupinu $-\text{COOH}$ správne zvolené pH tlmiaceho roztoku zabezpečí, že bude táto funkčná skupina v jednej forme, a to buď v iónovej alebo neutrálnej. Z Henderson-Hasselbackovej rovnice [I.] vyplýva, že 99% analytu bude v jednej forme ak je pH tlmiaceho roztoku dve jednotky nad alebo pod hodnotou pK_a analytu.

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{[A^-]}{[HA]}\right) \quad [I.]$$

Na retenciu karboxylových kyselín sa vyžaduje protónovaná, neutrálna forma. Na potlačenie disociácie boli zvolené hodnoty pH tlmivého roztoku nižšie ako pK_a hodnoty kyselín. Na Obr. 1 je znázornená závislosť elučného času vybraných kyselín od meniacich sa hodnôt pH tlmivého roztoku (2,1 – 3,0), z ktorého vyplýva, že so znižujúcim sa pH mobilnej fázy sa elučný čas kyselín skraca. Takéto správanie je spôsobené nárastom hydrofóbnej interakcie medzi analytom a stacionárnou fázou v dôsledku potlačenia disociácie kyselín.



Obr. 1 Vplyv pH tlmivého roztoku na retenciu vybraných karboxylových kyselín. Podmienky: mobilná fáza $25 \text{ mmol.L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4/\text{metanol} + 25 \text{ mmol.L}^{-1} \text{H}_3\text{PO}_4$; prietok 1 mL/min ; dávkovaný objem $20 \text{ }\mu\text{L}$; teplota kolóny 30°C . Identifikácia kyselín vid'. odsek Chemikálie

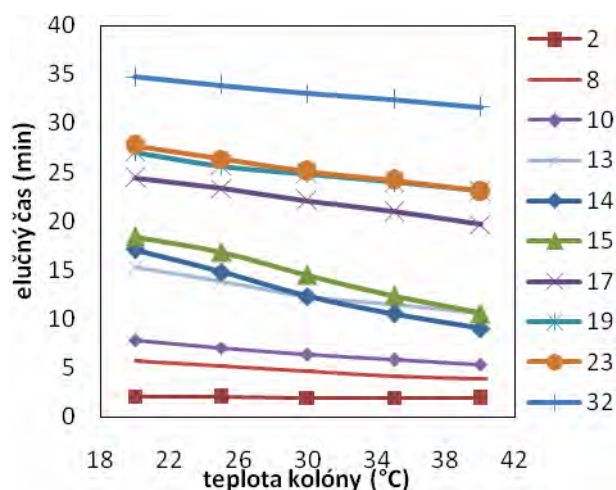
Zmenou hodnoty pH mobilnej fázy sme zároveň pozorovali aj zmenu selektivity separácie. Ako vidieť z Obr. 1. so zmenou pH mobilnej fázy nastala zmena v elučnom poradí kyseliny 1,2,4,5-benzéntetrakarboxylovej (14), ktorá pri hodnote pH 2,1 eluuje na rozdiel od pH 3,0 pred kyselinou metylénjantárovou (13) a kyselinou gálovou (15).

Koncentrácia tlmivého roztoku by nemala byť menšia ako 5 mmol.L^{-1} , pretože by jeho

tlmivá kapacita klesla natoľko, že by nebol schopný udržať pH na požadovanej hodnote, čo by malo za následok nereprodukovateľné výsledky. Horná hranica koncentrácie je limitovaná rozpustnosťou tlmivého roztoku v metanole, čo je dôležité hlavne pri použití gradientovej elúcie, kedy pri použití vyšších koncentrácií metanolu môže dôjsť k vyzrážaniu solí. Vplyv koncentrácie KH_2PO_4 bol sledovaný v rozsahu $0,01 - 0,03 \text{ mol.L}^{-1}$. Zvyšovaním koncentrácie KH_2PO_4 sa elučný čas kyselín skracoval. Na ďalšie štúdie bola zvolená koncentrácia $0,025 \text{ mol.L}^{-1}$.

Vplyv teploty kolóny

Na zlepšenie separačnej účinnosti bol pozorovaný vplyv teploty kolóny na retenciu skúmaných kyselín v rozmedzí od $20 - 40^\circ\text{C}$ (Obr.2). Elučný čas sa skracoval so vzrastajúcou teplotou najmä pre hydrofóbnejšie aromatické kyseliny v dôsledku znižovania hydrofóbných interakcií medzi analytmi a stacionárnou fázou. Elučný čas alifatických kyselín sa skracoval len mierne v dôsledku malých zmien v ich pKa hodnotách [4].



Obr. 2 Vplyv teploty kolóny na retenciu vybraných karboxylových kyselín. Podmienky: mobilná fáza $25 \text{ mmol.dm}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ (pH 2,3)/metanol + $25 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$; prietok 1 mL.min^{-1} ; dávkovaný objem $20\mu\text{L}$. Identifikácia kyselín vid' odsek Chemikálie

Vplyv koncentrácie metanolu

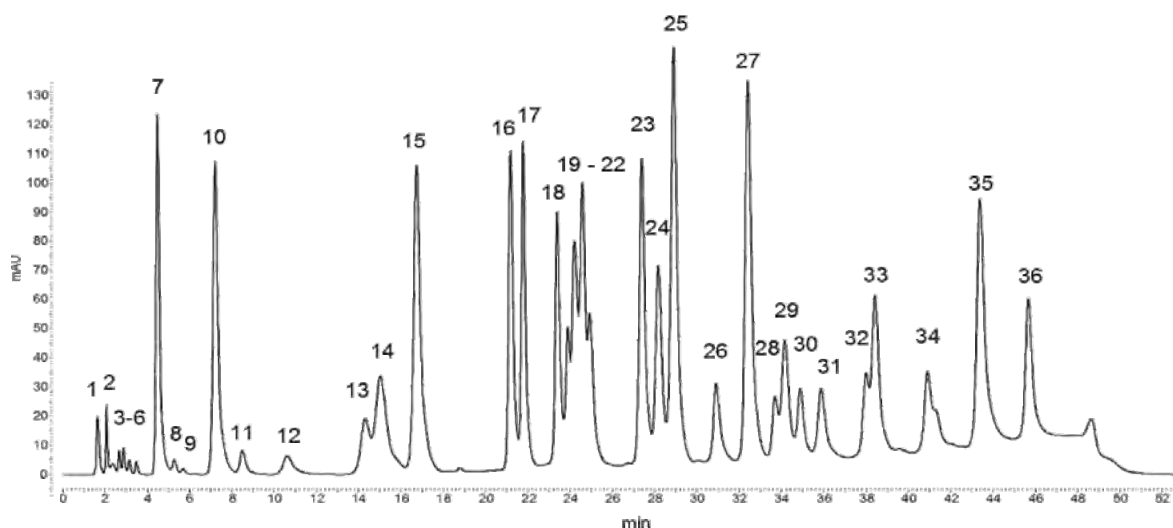
Prídavok organického modifikátora do mobilnej fázy znižuje hydrofóbne interakcie analytov [1]. Na separáciu karboxylových kyselín bol použitý metanol. Sledované boli rôzne koncentrácie metanolu pri rôznej gradientovej elúcií. Alifatické kyseliny sa separovali v tlmivom roztoku bez potreby prídavku metanolu, čo naznačuje, že sa separujú iónovo-vylučovacím mechanizmom. Pre aromatické kyseliny možno vo všeobecnosti povedať, že so zvyšujúcou sa koncentráciou metanolu v mobilnej fáze elučný čas aromatických kyselín klesal.

Výber chromatografických podmienok na separáciu karboxylových kyselín

Na základe hore uvedených výsledkov boli zvolené chromatografické podmienky na simultánnu separáciu alifatických a aromatických kyselín. Použitá bola analytická kolóna Alltech Prevail™ organic acid, 5 μ m, 4,6 x 150mm (Grace – Deerfield, USA). Mobilná fáza pozostávala z 25 mmol.L⁻¹ KH₂PO₄ pH 2,3 a metanolu do ktorého bola pridaná 25 mmol.L⁻¹ H₃PO₄ v pomere 80:20. Separácia prebiehala gradientovou elúciou pri teplote 25 \pm 0,1°C a prietoku 1 mL.min⁻¹. Dávkovaný objem bol 20 μ L. Parametre použitej gradientovej elúcie sú uvedené v Tab.1. Na detekciu bola použitá vlnová dĺžka 220 nm. Získaný chromatografický záznam je zobrazený na Obr. 3.

Tab. 1 Parametre gradientovej elúcie

Čas (min)	0	13	20	45	47	48	53
Fosfátový pufor (%)	100	100	72	35	35	100	100
Metanol (%)	0	0	28	65	65	0	0



Obr. 3 Chromatogram separácie štandardných roztokov alifatických a aromatických kyselín. Identifikácia kyselín vid'. odsek Chemikálie

Kalibračná krivka testovaných kyselín bola získaná vynášaním hodnôt plochy píku ku koncentráciám. Korelačný koeficient (R^2) bol v rozsahu od 0,998 do 1,000 a detekčný limit ($S/N = 3$) bol rádovo 10^{-2} až 10^{-4} mmol.L⁻¹. Opakovateľnosť (relatívna smerodajná odchýlka RSD) sa pohybovala v rozmedzí 0,2 - 7 % okrem kyseliny 2,4-dihydroxybenzoovej, ktorej hodnota RSD bola 9,7 %.

Záver

V tejto práci bola vyvinutá nová kvapalinovo chromatografická metóda na separáciu alifatických a aromatických kyselín v jednom behu. Na základe štúdií možno predpokladať, že pri separácii týchto kyselín sa uplatňujú dva separačné mechanizmy: 1. iónovo-vylučovací pre hydrofilné a slabo hydrofóbne kyseliny a 2. reverzno-fázový (hydrofóbne interakcie) pre silne hydrofóbne čiže aromatické kyseliny. V nasledujúcich štúdiách môže byť navrhovaná metóda aplikovaná na stanovenie vybraných kyselín v rôznych vzorkách (ľudský moč, pôdy, víno).

Pod'akovanie

Táto práca vznikla za finančnej podpory grantovej agentúry MŠ SR VEGA, grant č. 1/1349/12 a Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0583-11 pod záštitou centra excelencie VVCE-0070-07.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Tanaka K, Chikara H., Wenzhi H. (1999) *J. Chromatogr. A.* 850, p. 187
- [2] Novič M., Haddad P. R. (2006) *J. Chromatogr. A.* 1118, p. 19
- [3] Ohta K., Tanaka K, Haddad P. R. (1996) *J. Chromatogr. A.* 739, p. 359
- [4] Chen Z., Adams M. A. (1999) *Analytica Chimica Acta* 386, p. 249

Korózia superzliatiny Incoloy 800H/HT v eutektickej zmesi LiF-NaF-KF s rôznym prídavkom fluoridu chromitého

Martin Kontrík, Viliam Pavlík, František Šimko

*Slovenská Akadémia Vied, Ústav Anorganickej Chémie, Oddelenie Taveninových Sústav,
Dúbravská cesta 9, 846 36 Bratislava
martin.kontrik@savba.sk*

Abstrakt

Thesis deals with investigating the addition of chromium trifluoride to eutectic mixture of LiF-NaF-KF (46.5 - 11.5 - 42 mol%) on the corrosion of superalloy Incoloy 800H/HT with static tests. The corrosion losses of the alloy and type of corrosion attack was observed. It was found that the addition of chromium fluoride into the mixture generally increases of corrosion of the material. Several types of corrosion attacks were observed. On the surface of the samples the spotted, pitting and transgranular corrosions were found. On the cross-sections of the samples the subsurface and lamellar corrosions were detected.

Kľúčové slová: nukleárny reaktor; FLiNaK; prídavok; superzliatina; korózia; Incoloy 800H/HT

Úvod a formulácia cieľa

Z hľadiska udržateľnosti rozvoja na Zemi je potrebné hľadať nové zdroje energie alebo zefektívniť zdroje doteraz využívané. V oblasti jadrovej energetiky sú v súčasnosti vyvíjané tzv. jadrové reaktory IV. generácie, ktorých výhodou oproti konvenčným reaktorom je efektívnejší proces výroby elektrickej energie, ako aj zníženie množstva produkovaného vysoko rádioaktívneho odpadu. Tieto reaktory sa vyznačujú dlhším životným cyklom, zvýšenou bezpečnosťou a tak isto sú aj ekonomicky výhodnejšie [1].

Jedným z plánovaných variantov sú systémy reaktorov chladených roztavenými soľami. Výhody použitia roztavených solí v jadrových reaktoroch spočívajú hlavne v ich chemickej stabilite pri vysokých teplotách, radiačnej stálosti, veľkej špecifickej a tepelnej vodivosti, nízkom tlaku pár. Nevýhodou sú ich korozívne vlastnosti voči konštrukčným materiálom. Ako najvhodnejšie materiály sa javia špeciálne zliatiny, ktoré boli vyvíjané pre rôzne aplikácie v leteckom, chemickom a jadrovom priemysle. Napriek ich zvýšenej odolnosti voči korózii, stále podliehajú koróznemu napadnutiu a pri pomalej kontaminácii korózneho média vzniká zdroj znečistenia, ktorý sa musí priebežne odstranovať. Ak sa toto znečistenie neodstraní môže mať vplyv na ďalší priebeh korózie.

Cieľmi práce je skúmanie vplyvu prídavku fluoridu chromitého ako umelého kontaminantu na koróziu superzliatiny Incoloy 800H/HT a tak isto určenie druhu korózneho napadnutia.

Materiál a metódy

Analyzovala sa zliatina Incoloy 800H/HT, zakúpená vo forme tyčoviny s priemerom 12 mm. Z daného tvaru sa narezali vzorky, ktoré sa následne upravili na experimentálne použitie podľa noriem STN 038102 a STN 038135 [2, 3]. Pre experiment sa použila eutektická zmes LiF-NaF-KF (FLiNaK) so zložením 46,5 mól % LiF - 11,5 mól % NaF - 42 mól % KF. Zmes sa pripravila zmiešaním a následnou homogenizáciou jednotlivých zložiek v uvedenom pomere. Príprava sa uskutočnila v argónovej atmosfére. Na čistenie vzoriek po experimente od zvyškových fluoridov bola použitá zmes LiCl-KCl so zložením 63,75 mól % LiCl - 36,25 mól % KCl.

Upravené vzorky zliatiny sa vložili do korundového téglíka, kde sa zasypali pripravenou fluoridovou zmesou s prídavkom fluoridu chromitého. Takto pripravené téglíky sa zahriali v odporovej peci na teplotu 650°C s výdržou osem hodín. Po experimente boli vzorky vytiahnuté z fluoridovej zmesi a vložené do roztopenej chloridovej zmesi aby sa rozpustili zvyšky fluoridov. Následne sa vzorky opláchli vodou a vyčistili ultrazvukom.

Vplyv prídavku fluoridu chromitého ako umelého polutantu na koróziu zliatiny sa stanovoval vážkovou analýzou. Druh korózneho napadnutia na vzorkách sa zisťoval pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie.

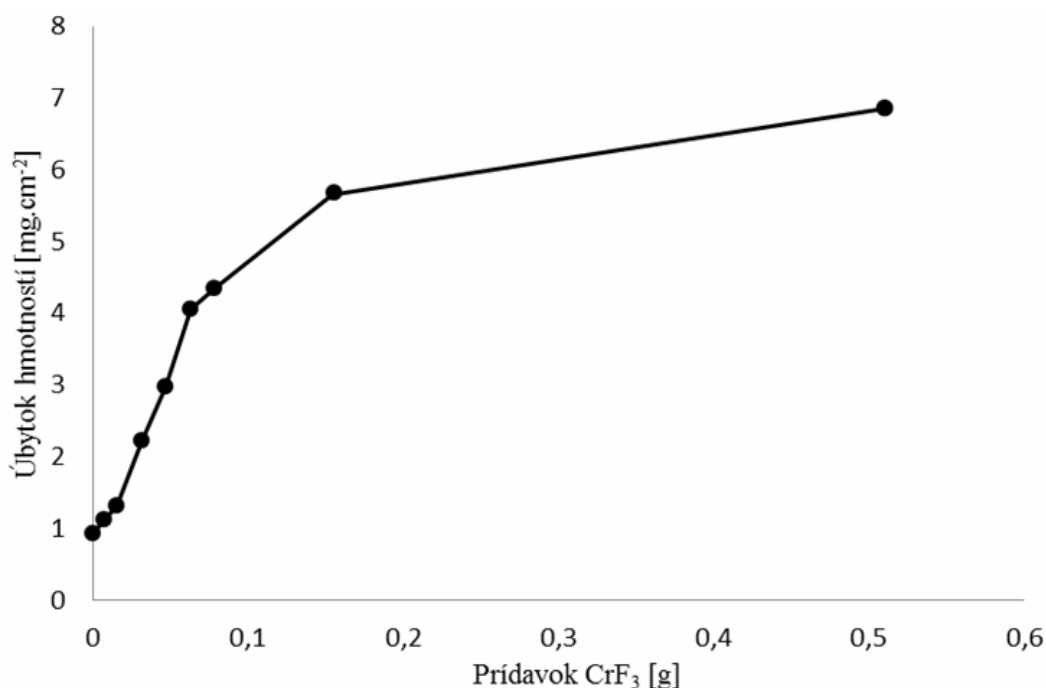
Výsledky a diskusia

Na vzorkách bol sledovaný rozdiel v hmotnosti pred a po korózných testoch. Rozmery vzoriek boli merané mikrometrickým meradlom. Výsledný úbytok hmotnosti bol vztiahnutý na jednotkovú plochu podľa STN 038102. V tabuľke č. 1 sú uvedené priemerné úbytky hmotností v závislosti od vzrastajúceho prídavku fluoridu chromitého do FLiNaKu.

Tab. 1 Priemerný úbytok hmotnosti vzorky zliatiny v závislosti od obsahu CrF₃ v použitej tavenine

Prídavok CrF ₃ [g]	Priemerný úbytok hmotnosti [mg.cm ⁻²]
0	0,9220 ± 0,044
0,0079	1,1147 ± 0,148
0,0158	1,3074 ± 0,009
0,0316	2,2273 ± 0,258
0,0473	2,9810 ± 0,195
0,0629	4,0476 ± 0,330
0,0785	4,3510 ± 0,683
0,1558	5,6682 ± 0,636
0,5100	6,8619 ± 0,299

Hodnoty priemerných úbytkov hmotností vzoriek sa zvyšovali spolu s prídavkami kontaminantu, z čoho vyplýva, že prídavok fluoridu chromitého do zmesi FLiNaK zvyšuje koróziu materiálu. Tento nárast však nemá lineárny ale sigmoidálny charakter. Pri nižších koncentráciách nie je úbytok hmotností vzoriek taký markantný. Pri zvyšovaní koncentrácie kontaminantu v zmesi nastáva prudký nárast úbytkov hmotností a teda aj korózneho napadnutia. V tejto časti sa trend vyznačuje relatívne lineárnym priebehom. Z technologického hľadiska hovorí o výraznom znehodnocovaní povrchu zliatiny pri zvyšujúcej sa koncentrácii kontaminantu vo fluoridovej zmesi. Ak by zároveň nastávali aj zmeny vlastností materiálu, bude sa táto oblasť stávať limitnou. V nasledujúcej časti grafu, aj napriek niekoľkonásobnému zvýšeniu prídavku fluoridu chromitého, nie je úbytok hmotností taký výrazný ako v predchádzajúcej oblasti. To môže naznačovať, že v koróznom médiu sa po istom čase môže vytvoriť rovnováha medzi médiom a materiálom.



Obr. 1 Závislosť úbytku hmotností zliatiny Incoloy 800H/HT od prídavku CrF₃ do FLiNaK

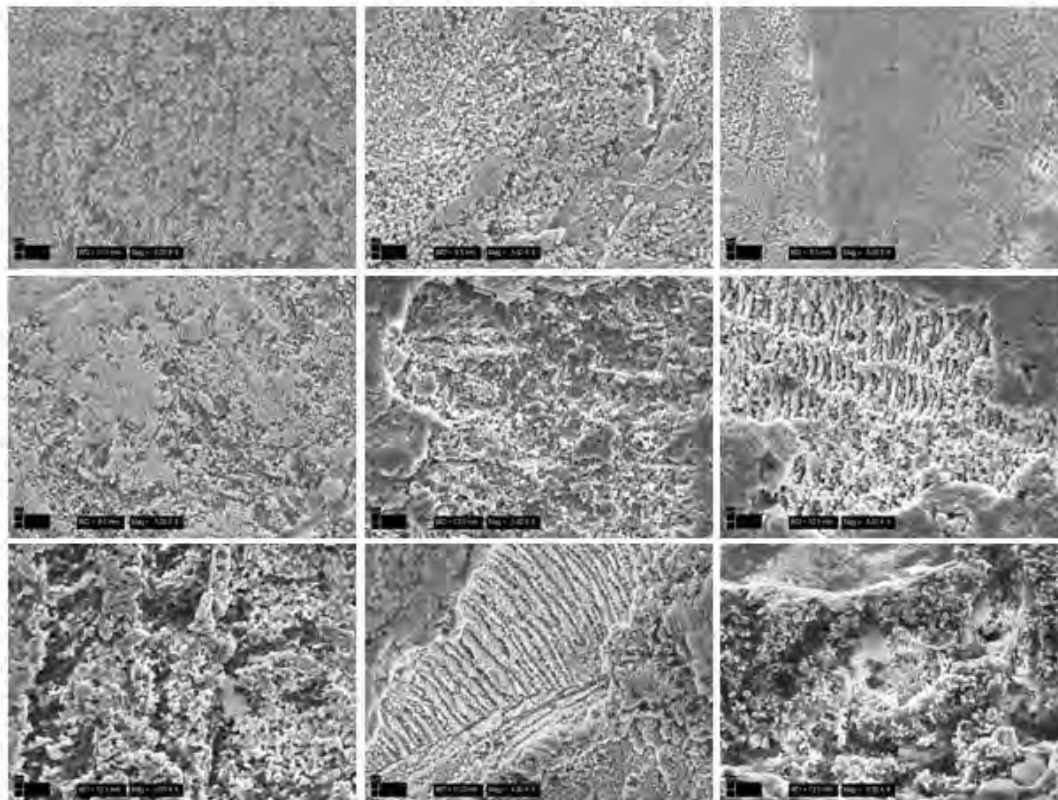
Ak je chróm v nadbytku, môže dochádzať k redukčnej reakcii z Cr^{III+} na Cr^{II+}.



Z uvedených zjednodušených reakcií (1, 2) vyplýva, že prídavok fluoridu chromitého má za následok dodatočné vylučovanie chrómu zo zliatiny. Reakcia môže prebiehať aj

opačným smerom, keďže do uvedených reakcií vstupujú aj iné faktory, napr. nečistoty, prípadne iné súbežne vylučované prvky, napríklad železo, ktoré môžu ovplyvňovať rovnováhu.

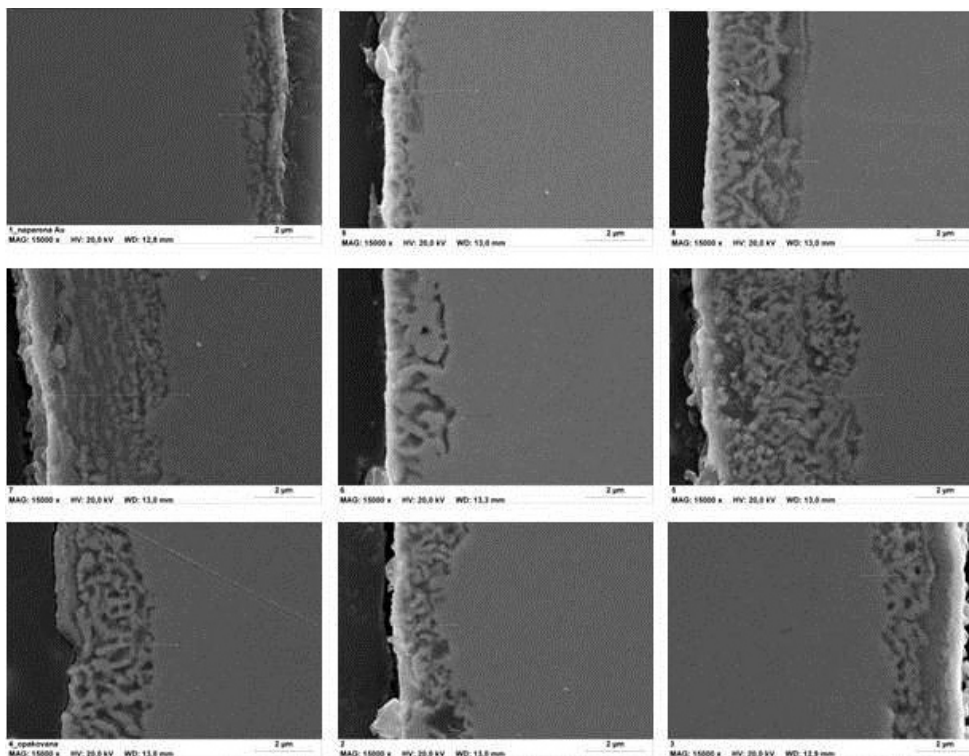
Vzorky boli pozorované skenovacou elektrónovou mikroskopiou. Pozoroval sa povrch vzoriek pri 5000 násobnom zväčšení a následné metalografické výbrusy pozorované pri 15 000 násobnom zväčšení boli analyzované pomocou EDX analýzy.



Obr. 2 Povrchy vzoriek po korózii

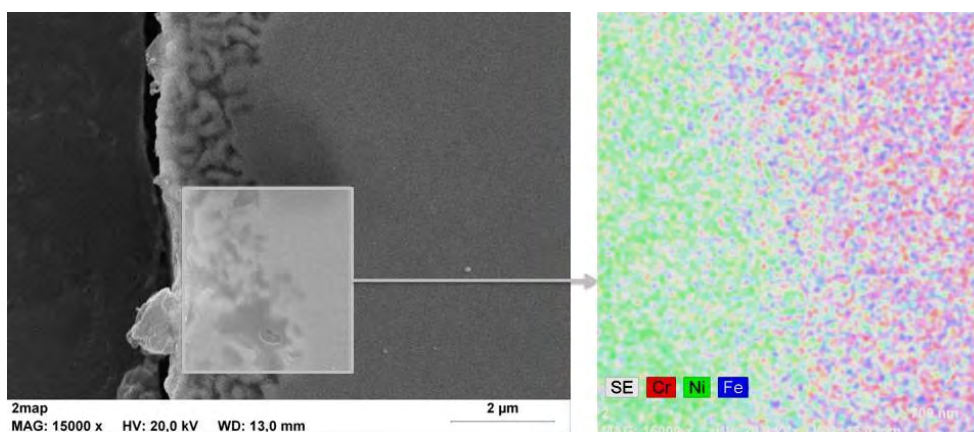
Na povrchoch prvých piatich vzoriek bolo zistené relatívne rovnomerné korózne napadnutie. V oblasti rýh je korózia viacej viditeľná. Na vzorkách je možno vidieť relatívne veľmi málo napadnuté miesta. Povrch vzoriek je napadnutý koróziou jamkového a škvrnitého charakteru.

Na vzorkách č. 6 až 9 bolo pozorované značné korózne napadnutie jamkového charakteru. Na vzorkách č. 6 a 8 bolo pozorované transkryštalové korózne napadnutie.



Obr. 3 Metalografický výbrus jednotlivých vzoriek po korózii

Na metalografickom výbruse je viditeľné podpovrchové korózne napadnutie a korózne napadnutie po vrstvách. Korózne napadnutie sa vyznačuje značne nerovnomernou hĺbkou v rozmedzí 0,8 μm až 7 μm .



Obr. 4 Mapa prvkov v oblasti koróznej vrstvy vzorky

Analýza pomocou mapy prvkov bola vykonaná na vzorke s prídavkom 0,01558 g fluoridu chromitého v koróznej zmesi. Na obrázku č. 4 je zmapovaný obsah chrómu (červená), železa (modrá) a niklu (zelená). Z obrázku je vidieť značný úbytok chrómu a železa z korodovaného materiálu, ktorý korešponduje s literatúrou [4].

Záver

Práca bola zameraná na pozorovanie vplyvu prídavku bezvodého fluoridu chromitého, do fluoridovej zmesi LiF-NaF-KF (46,5 - 11,5 - 42 mol %), na koróziu superzliatiny Incoloy 800H/HT. Z výsledkov vážkovej analýzy je vyplýva, že aj nízky prídavok fluoridu chromitého zvyšuje koróziu materiálu. V ďalšej časti práce boli vzorky skúmané pod elektrónovým mikroskopom, pre určenie druhu korózneho napadnutia. Na povrchu vzoriek bola najpravdepodobnejšie identifikovaná škvrnitá, jamková a transkryštalová korózia. Na metalografických výbrusoch bolo pozorované zväčša podpovrchové korózne napadnutie. Analýza pomocou mapy prvkov urobená na vzorke s prídavkom 0,1558 g fluoridu chromitého ukazuje úbytok chrómu a železa z koróznej vrstvy zliatiny, čo korešponduje s údajmi získanými z literatúry [4].

Ďalší výskum sa bude zameriavať na skúmanie závislostí prídavkov fluoridu železnatého a nikelnatého do FLiNaKu na korózne úbytky superzliatiny Incoloy 800H/HT a vplyv prídavkov týchto zlúčenín na koróziu superzliatiny Hastelloy a Hayness .

PodĎakovanie

Radi by sme poďakovali za finančnú podporu Slovenskej Grantovej Agentúre VEGA č. VEGA-2/0179/10.

Zoznam použitej literatúry

- [1] A technology roadmap for generation IV. nuclear energy systems [Citované: 17. marec 2012] <<http://www.gen-4.org/PDFs/GenIVRoadmap.pdf>>
- [2] STN 03 8135 (1990) Kovy, slitiny a kovové povlaky. Korozní zkoušky v kapalinách a parách. Všeobecné požadavky
- [3] STN 03 8102 (1986) Vyhodnocování korozních zkoušek podle korozních úbytku
- [4] Olson L.C. (2009) Material corrosion in molten LiF-NaF-KF eutectic salt (dizertacná práca) University of Wisconsin, Madison, p. 260
- [5] Kontrík M. (2012) Korózia superzliatiny Incoloy 800H/HT v eutektickej zmesi LiF-NaF-KF s rôznym prídavkom fluoridu chromitého (Diplomová práca) Fakulta Priemyselných Technológií, Trenčianska Univerzita Alexandra Dubčeka, Púchov, p. 66

Syntéza amidů hydroxynaftoových kyselin jako biologicky aktivních látek

Jiří Kos¹, Tomáš Goněc¹, Jan Tengler¹, Iveta Zadražilová^{1,2}, Matúš Peško³, Michal Oravec⁴, Katarina Králová⁵, Alois Čížek², Josef Jampílek¹

¹ *Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Ústav chemických léčiv, Palackého 1/3, 61242, Brno, Česká republika; kosj@vfu.cz*

² *Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinárního lékařství, Ústav mikrobiologie a imunologie, Palackého 1/3, 61242, Brno, Česká republika*

³ *Univerzita Komenského v Bratislavě, Přírodovědecká fakulta, Katedra environmentální ekologie, Mlynská dolina Ch-2, 842 15 Bratislava, Slovensko*

⁴ *Centrum výzkumu globální změny AV ČR, v. v. i., Bělidla 986/4a, 603 00 Brno, Česká republika*

⁵ *Univerzita Komenského v Bratislavě, Přírodovědecká fakulta, Chemický ústav, Mlynská dolina Ch-2, 842 15 Bratislava, Slovensko*

Abstrakt

Infections/diseases caused by invasive pathogens remain a great world problem, thus research efforts are required to develop new compounds as potential antimicrobial agents. The basic strategy of new antimicrobial compounds development is preparation of analogues of clinically used drugs, which would have a better therapeutic index according to SAR study, increased activity against resistant strains, improved bioavailability or a new mechanism of action. The presence of an amide (-NHCO-) group is characteristic of a number of biologically active compounds. The aim of this study was the preparation of series of seventy-five substituted hydroxynaphthanilides. The prepared anilides were sent to screening of biological activity (antimicrobial, herbicide, antifungal, antimycobacterial). Modification of the anilidine part of the molecule resulted in biological activity increase.

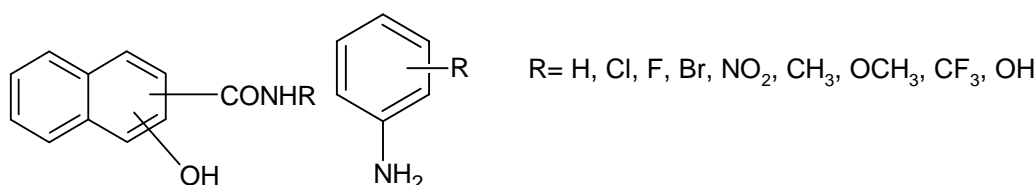
Keywords: *hydroxynaphthanilides; microwave synthesis; antimicrobial compounds*

Úvod a cíl

Vzrůstající rezistence invazivních patogenů vůči stávajícím antimikrobiálním léčivům a zvyšující se výskyt infekcí způsobených multirezistentními mykobakteriálními a bakteriálními kmeny je v současné době stále častější jev. Právě tyto skutečnosti podtrhují důležitost snahy nalézt nová, efektivně působící antimikrobiální chemoterapeutika. Předmětem této studie byla především příprava série substituovaných amidů hydroxynaftoových kyselin (obr. 1), po které následovalo hodnocení jejich biologické aktivity.

Amidové vazby, spojující jednotlivé aminokyseliny v peptidech, se nikterak neliší od jakékoliv jiné amidové vazby. V obou případech se jedná o nebazické látky s delokalizovaným ne vazebným elektronovým párem dusíku. Amidy jsou tak schopné vytvářet stabilní vodíkové vazby a sloučeniny s takovýmto seskupením v molekule by mohli snáze interagovat s příslušnými receptory či enzymy v živých systémech

Příprava amidů z aminu a karboxylové kyseliny patří mezi dobře prověřené metody. Tento proces vždy vyžaduje aktivaci karboxylové skupiny. Konvenčním postupem byla donedávna zdlouhavá syntéza, jejíž délka mohla přesahovat i 24 hodin. Nejčastěji byl nejprve vytvořen acylchlorid pomocí halogenačního činidla jakými například jsou SOCl_2 nebo PCl_3 . S tím potom souvisela leckdy obtížná izolace aktivovaného intermediátu a vznik vedlejších produktů. V poslední době se do popředí dostala syntéza využívající mikrovlnné záření. Touto novou metodou se radikálně zkrátil reakční čas při zachování maximálních výtěžků [1-3].



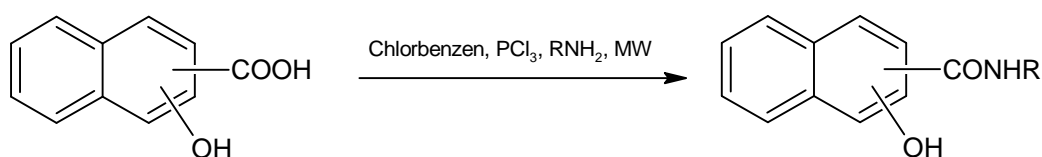
Obr. 1 Obecná struktura syntetizovaných látek.

Materiál a metodika

Práce se zabývala syntézou substituovaných anilidů aromatických hydroxykyselin, především tedy strukturních izomerů hydroxynaftoových kyselin (konkrétně 1-hydroxy-2-naftoové, 2-hydroxy-1-naftoové, 3-hydroxy-2-naftoové). Použité *ortho*-, *meta*- a *para*-substituované aniliny jsou znázorněny na obr. 1.

Obecný postup syntézy sloučenin

Kyselina (5,3 mmol) byla suspendována za laboratorní teploty v suchém chlorbenzenu (30 ml). Do takto vzniklé suspenze byl přidán chlorid fosforitý (2,7 mmol) a poté odpovídající substituovaný anilin (5,3 mmol). Reakční směs byla přemístěna do mikrovlnného zařízení, kde pokračovala syntéza ve třech fázích vzrůstající energie mikrovlnného záření (první fáze: 10 min, 100 °C, 100 W, druhá fáze: 10 min, 120 °C, 500W, třetí fáze: 10 min, 130 °C, 500 W). Rozpouštědlo pak bylo oddestilováno za sníženého tlaku. Získaná krystalická látka byla promyta kyselinou chlorovodíkovou (2 M) a destilovanou vodou. Surový produkt byl následně rekrystalizován ze zředěného ethanolu.



Obr. 2 Obecné schéma syntézy.

Biologická aktivita

Nově připravené látky mohou být rozděleny na základě jejich chemické struktury do třech skupin: Skupina 1 zahrnuje 2-hydroxy-*N*-fenylnaftalen-3-karboxanilidy **JK 1-25**; Skupina 2 obsahuje 2-hydroxy-*N*-naftalen-1-karboxanilidy **CP 1-25** a Skupina 3 zahrnuje 1-hydroxy-*N*-naftalen-2-karboxanilidy **NM 1-25**. U všech látek byla testována herbicidní aktivita jako schopnost inhibice transportu elektronu při fotosyntéze (PET) v chloroplastech listu špenátu (*Spinacea oleracea L.*) podle popsané metody Král'ová *et al.* [4]. Dále byl u těchto sloučenin proveden *in vitro* screening aktivity popsanou metodou [5,6] proti čtyřem bakteriálním druhům *Staphylococcus* (SA = *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, MRSA = methicillin rezistentní *Staphylococcus aureus* 63718, 630 a 3202). Zjištěné hodnoty byly porovnány se standardy 3-(3,4-dichlorfenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU, Diurone®), ampicilin (APC) a ciprofloxacin (CPX). Dále byly látky zaslány na hodnocení antimykobakteriální aktivity, jejichž kompletní výsledky zatím nejsou k dispozici. Nejúčinnější látky budou následně hodnoceny na cytotoxicitu.

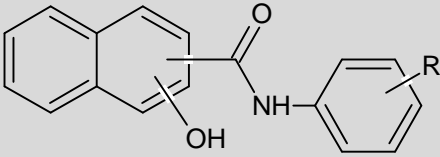
Výsledky

Celkem bylo touto výše popsanou metodou připraveno 75 finálních krystalických anilidů hydroxynaftoových kyselin, jejichž totožnost byla ověřena pomocí NMR, MS a IČ spektrometrie. U všech látek jsou postupně prováděny výše uvedené testy biologické aktivity. Všechny připravené sloučeniny vykazují široké spektrum biologické aktivity. Vybrané výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Závěr

Nejzajímavější herbicidní vlastnosti vykázal *N*-(3-trifluormethylfenyl)-1-hydroxynaftalen-2-karboxamid (**NM 22**), který se tak svou aktivitou nejvíce blíží standardu. Jako nejlepší potenciální antimikrobní látka se ukázal být *N*-(2-methoxylyfenyl)-3-hydroxynaftalen-2-karboxamid (**JK 5**) zejména pro svou stabilní a neměnnou inhibiční koncentraci pro všechny použité bakteriální druhy. Podrobná studie vztahů mezi strukturou a antibakteriální aktivitou, resp. inhibicí transportu elektronu (PET) v chloroplastech listu špenátu sloučenin **JK 1-25** je diskutována v příspěvku Kos *et al.* [7].

Tab. 1 Biologické aktivity vybraných látek v porovnání se standardy 3-(3,4-dichlorfenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU, Diurone[®]), ampicilin (APC) a ciprofloxacín (CPX).

						
Látka	R	PET inhibice IC ₅₀ [μmol/L]	MIC [μmol/L]			
			SA	MRSA 63718	MRSA 630	MRSA 3202
JK 5	2-OCH ₃	59.5	55	55	55	55
JK 20	2-CF ₃	105.2	>773	>773	>773	97
JK 24	3-NO ₂	16.9	>830	>830	>830	>830
CP 19	4-Br	101.8	47	187	47	94
CP 20	2-CF ₃	152.6	97	193	97	193
CP 21	3-CF ₃	45.6	>748	187	374	94
CP 22	4-CF ₃	29.0	>748	94	94	47
CP 23	2-NO ₂	120.6	26	415	104	52
CP 24	3-NO ₂	86.4	208	26	208	208
NM 2	2-OH	410.2	>917	>917	917	14
NM 15	3-Cl	7.9	>860	>860	430	107
NM 20	2-CF ₃	126.1	97	>773	>773	193
NM 21	3-CF ₃	5.3	94	374	187	748
NM 22	4-CF ₃	36.5	94	>748	>748	>748
DCMU	–	1.9	–	–	–	–
APC	–	–	5.723	>45.791	>45.791	>45.791
CPX	–	–	–	>48.287	>48.287	>48.287

Seznam použité literatury

- [1] Ferriz J. M., Vávrová K., Kunc F., et al. (2010) *Bioorg. Med. Chem.* 18, p. 1054
- [2] Larhed M., Hallberg A. (2001) *Drug Discov. Today.* 6, p. 406
- [3] Mavandadi F., Pilotti A. (2002) *Drug Discov. Today.* 7, p. 373
- [4] Králova K., Sersen F., Sidoová E. (1992) *Chem. Pap.* 46, p. 348
- [5] National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, 5th Edition: Approved Standard M7-A5. NCCLS: Wayne, PA, USA, 2000
- [6] National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 12th Informational Supplement M100-S12*. NCCLS: Wayne, PA, USA, 2002
- [7] Kos J., Zadrazilova I., Pesko M., et al. (2012) *Proceedings of the 16th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*, Sciforum Electronic Conferences Series, Basel, Švajčiarsko, p.1

Sorption of uranium cationic species from aqueous solutions on Slovak bentonite Jelšový potok

Adrián Krajňák¹, Eva Viglašová¹, Michal Galamboš¹, Oľga Rosskopfová¹

¹Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Nuclear Chemistry, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovakia; Krajnak.A@gmail.com

Abstract

Bentonite deposit Jelšový potok in Slovakia has great potential for use as an engineering barrier in the multibarrier system of deep geological repository for high level radioactive waste and spent nuclear fuel. In this study, the adsorption equilibrium and kinetics of U(VI) ions on Slovak bentonite Jelšový potok (J15) was examined. The removal of uranium cationic species from aqueous solutions (initial concentration: 10–1,000 mg/L) by J15 was studied in the absence of background electrolytes at initial pH (pH_{mit}) 2.5. The amount of the sorbed U was determined spectrophotometrically using the Arsenazo III method. The maximum uptake capacity observed was 30.15 (mg/g) at 298 K. Experimental results were analysed by the Langmuir, Freundlich and Dubinin–Redushkevich isotherm. The kinetics of adsorption of U(VI) ions was also discussed using the pseudo-first-order and the pseudo-second-order at three different temperatures. The experimental data fitted very well the pseudo-second-order kinetic model. The activation energy of the sorption was calculated as 11.316 kJ.mol⁻¹ for J15.

Key words: adsorption, bentonite Jelšový potok, uranium, equilibrium, isotherm, kinetic

Introduction and formulation of objective

Significant producers of high-level radioactive waste (HLRW) and spent nuclear fuel (SNF) in Slovak Republic are nuclear power plants located in Bohunice and Mochovce. These plants currently operate with four reactors of type VVER 440. Two reactors of the same type are under construction in NPP Mochovce. Fuel is low enriched (ca. 2.4–4.4 % ²³⁵U) uranium dioxide (UO₂) or equivalent pressed into pellets and assembled into fuel rods. It is assumed that blocks of individual nuclear power plants in Slovakia will produce during their project operation period 2,500 t of SNF and 3,700 t of RW [1, 2].

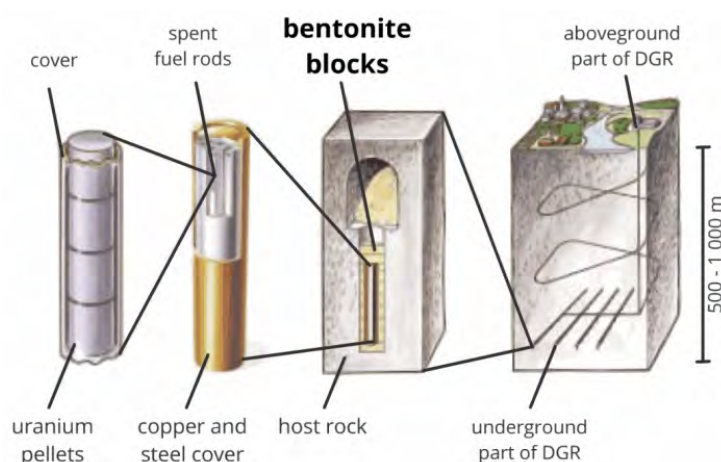


Fig. 1 Swedish concept of DGR

The most common uranium ionic forms are U^{3+} (brown-red), U^{4+} (green), UO^{+2} (unstable), and UO_2^{+2} (yellow), for U(III), U(IV), U(V), and U(VI), respectively. The UO_2^{+2} ion represents the uranium(VI) state and is known to form compounds such as uranyl carbonate, uranyl chloride and uranyl sulfate. The interactions of carbonate anions with uranium(VI) cause the Pourbaix diagram to change greatly when the medium is changed from water to a carbonate containing solution [3].

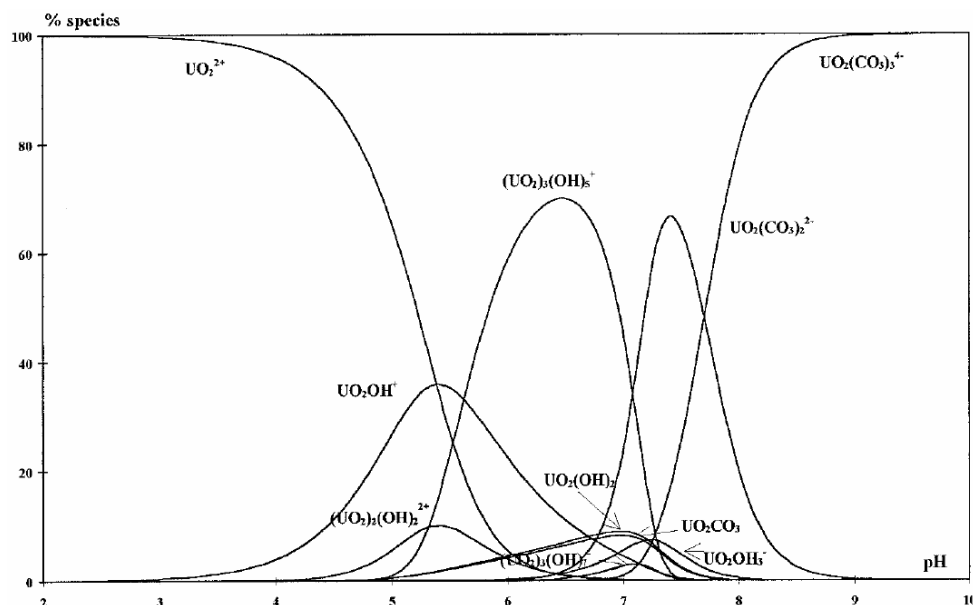


Fig. 2 Speciation diagram of uranium form in aqueous solution [4]

Bentonites are useful as engineering barriers in multi-barrier system of deep geological repository (DGR) for HLRW and SNF from nuclear power facilities. In Slovakia is several bentonite deposits of Central European importance, which might find use for storing HLRW and SNF in DGR. There is the most popular and long mined bentonite deposit located in the Slovak upland in the locality Stará Kremnička: Jelšovský potok. It is mainly composed of Al-Mg montmorillonite and its overall presence of bentonite in the range 45 to 85 % [5-7].

In practice, usability natural adsorbents depends on the kinetic of the adsorption process on their surface. Adsorption process on a solid phase boundary is usually described by means of isotherms, which represents the amount of adsorbate on the adsorbent as a function of its pressure (for gases) or concentration (for liquids) at constant temperature. Several models can be used to express the mechanism of solute sorption onto a sorbent [8].

The kinetics of adsorption of uranium and its fission and activation products is needed to clarify their migration in the environment and is essential to a comprehensive characterization of the adsorption properties of engineering barriers for DGR [9-11].

Objective of this work is to study the adsorption of uranium(VI) from aqueous solutions at $pH = 2.5$ on Slovak bentonite Jelšovský potok.

Materials and methods

As the adsorbent studied smectited bentonite from Jelšový potok (Tab. 2, 3), with a grain size below 15 microns, (the label J15).

Tab. 1 Chemical analysis [%] of J15 [12]

SiO ₂	Al ₂ O ₃	CaO	Fe ₂ O ₃	MgO	MnO	Na ₂ O	K ₂ O	TiO ₂	P ₂ O ₅	SO ₃
67.90	21.12	1.61	2.88	3.44	0.08	0.64	1.67	0.16	0.32	0.21

Tab. 2 The mineral composition (in wt%) of the J15 [12]

Smectite	Quarz	Illite	K-feldspars	Biotite	Kaolinite	Cristobalite
76	9.5	-	8.5	1.5	3	1.5

For the sorption experiments using batch technique, 50 mg of the J15 were contacted in polypropylene tubes for 24 h with 10 mL of uranium solutions (c_{init} : 10 – 1,000 mg U/L, pH_{init} 2.5 adjusted using HCl at room temperature). The uranium solutions were prepared by dilution of a stock $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solution (Merck pro analysis) with bi-distilled water. After separation of the solid and liquid phases by centrifugation, the equilibrium pH (pH_{eq}) was measured and the uranium concentration determined spectrophotometrically by means of the Arsenazo III method at 660 nm [13]. The obtained data were used to calculate the uptake capacity in mg/g and construct the corresponding sorption isotherms. The uranium uptake data were modeled using number of 2-parametric non-linear isotherm equations (Table 3).

Tab. 3 Lists of adsorption isotherms models

Model	Equation
Langmuir (L)	$q_e = \frac{Q_0 b C_e}{1 + b C_e}$
Freundlich (F)	$q_e = K_F C_e^{1/n}$
Dubinin– Radushkevich (D–R)	$q_e = (q_s) \exp(-k_{ad} \epsilon^2)$

Tab. 4 Nomenclature

q_e	amount of adsorbate at equilibrium (mg/g)
Q_0	maximum monolayer coverage capacities (mg/g)
b	Langmuir isotherm constant (dm^3/mg)
C_e	equilibrium concentration (mg/L)
K_F	Freundlich isotherm constant (mg/g)
n	adsorption intensity
q_s	theoretical isotherm saturation capacity (mg/g)
k_{ad}	D–R isotherm constant (mol^2/kJ^2)
ϵ	D–R isotherm constant

The sorption kinetics was also investigated and modelled using the pseudo-first and pseudo-second order equations. The kinetics model parameters were determined by linear regression. The kinetics of uranium sorption by the J15 was investigated using a batch technique. The 500 mg of the J15 came in contact with 100 mL of uranium solution of c_{init} 500 mg U/L and pH_{init} 2.5 at room temperature, 35 and 45°C. At pre-determined time intervals (2 – 180 min) a 2 mL sample was withdrawn and the amount of U was determined by means of the Arsenazo III method.

Results and discussion

The experimental results demonstrated that bentonite Jelšový potok can remove cationic uranium species from aqueous solutions at pH 2.5. The analysis of the isotherms data by fitting them into different isotherm models is an important step to find the suitable model that can be used for design process. Figure 3 shows the plots of q_e versus of C_e for the adsorption isotherms of U(VI) on J15 at room temperature (298 K). Based on the correlation coefficient of the determination (R^2), the best approximation was obtained for the Langmuir model with $q_{e,L}=50.71$ (mg/g). On the other hand, approximation was obtained for the D-R model and calculation of $q_{e,D-R}=36.08$ (mg/g) were closest to the experimental value $q_{e,exp}=35,51$ (mg/g).

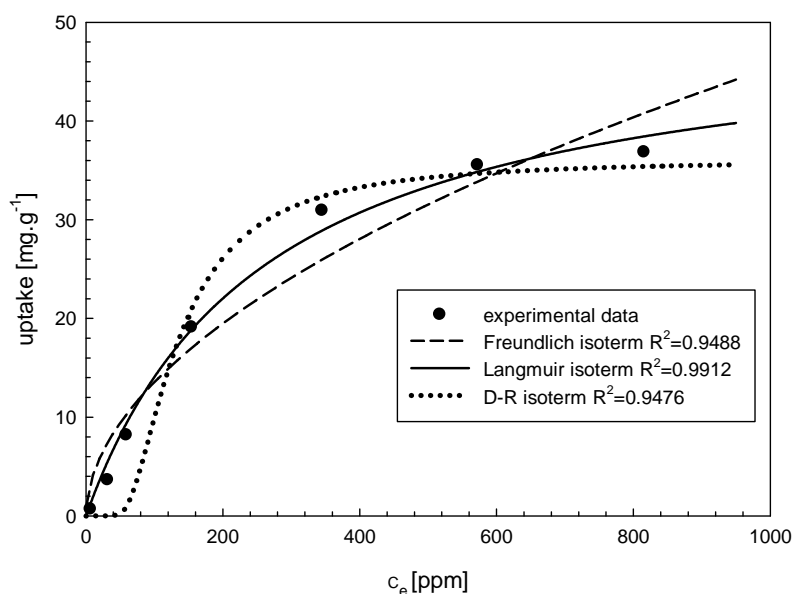


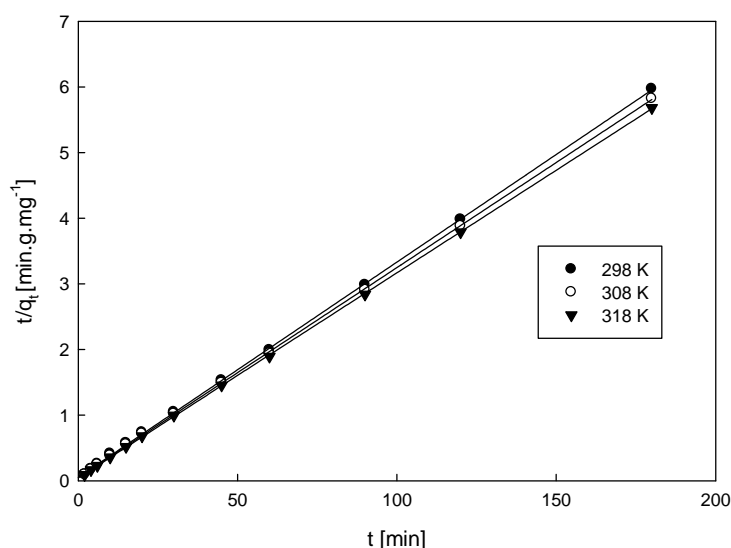
Fig. 3 The adsorption isotherms of U(VI) on J15

Kinetic models can be helpful to understand the mechanism of metal adsorption and evaluate performance of the adsorbents for metal removal. The uranium uptake by the investigated sorbent J15 was fast. In the first 2 min ca. 65 % of maximum uptake of uranium could be removed from the solutions. The equilibrium was established in <45 min. First, the kinetics of adsorption was analyzed by the pseudo-first-order. The R^2 values obtained were lower than that of the pseudo-second-order kinetic model and the experimental q_e values did not agree with the calculated values obtained from the linear plots (Tab. 5). This indicates that the adsorption of U(VI) on J15 does not follow pseudo-first-order kinetics.

Tab .5 Comparison of the pseudo-first order and pseudo-second order models for U(VI) on J15 (298 K)

<i>kinetic model</i>	$q_{e,exp} (mg \cdot g^{-1})$	$q_{e,cal} (mg \cdot g^{-1})$	R^2
pseudo-first order	30.15	2.69	0.9885
pseudo-second order	30.15	30.58	0.9999

The kinetic data of the U-sorption by J15 under investigation could be very well fitted by the pseudo-second order equation. Figure 4 illustrates pseudo-second-order sorption kinetics of adsorption of U(VI) on J15 at various temperatures. The values of R^2 , obtained from the plots of pseudo-second order kinetics given in Fig. 4 are greater ($R^2 > 0.99$) than that of the pseudo-first order. It also showed a good agreement between the experimental and the calculated q_e values (Tab. 5).

**Fig. 4** Pseudo-second-order sorption kinetics of adsorption of U(VI) on J15 at various temperatures

Activation energy of the sorption for U(VI) on J15 can be estimated by Arrhenius equation [I.] providing the relationship between rate constant and temperature.

$$k = A \exp - \frac{E_a}{RT} \quad [I.]$$

In this study, activation energy of sorption process was calculated using the values of the rate constant from a pseudo-second order kinetic equation at three different temperatures. The values of E_a from the Arrhenius plot described by linear plot $\ln(k^2)$ versus $1/T$ (figure not shown) was calculated from slope and for J15 is $11.316 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Conclusion

Slovak bentonite Jelšový potok showed considerable ability to remove uranium from aqueous solutions of initial pH 4.5. Langmuir, Freundlich and Dubinin–Redushkevich isotherm models were used to represent the experimental data, and the models fitted well. The sorption of uranium on J15 was fast and found to be well described by the pseudo-second order kinetics. The activation energy of sorption was calculated using the pseudo-second-order rate constant, and it was found to be $11.316 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Thanks

This work was supported by grant VEGA 1/0828/13. This experimental work was developed at the Aristotle University of Thessaloniki, Greece, led by Professor Panagiotis Misaelides during foreign scientific internship LPP/Erasmus. This internship was supported by Scholarship program N-SPP Hlavička 2011/2012; zmluva č. 80/2012.

References

- [1] Galamboš M., Roskopfová O., Kufčáková J., et al. (2011) *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 288(3), p. 765
- [2] Krajňák A., Galamboš M., Roskopfová O., et al. (2012) *European Nuclear Conference ENC 2012, Young Generation Transaction, Manchester, UK*, p. 135
- [3] Seaborg G. T. (1968) *The Encyclopedia of the Chemical Elements*. Skokie : Reinhold Book Corporation, p. 773
- [4] Moulin Ch., Laszak I., Moulin V., et al. (1998) *Appl. Spectrosc.* 52-4, p. 528
- [5] Adamcová R., Frankovská J., Durmeková T. (2009) *Acta geologica slovacica* 1,2, p. 71
- [6] Melichová Z., Hromada L., Brtáňová A. (2010) *Acta Universitatis Matthiae Belli* 12, p. 15
- [7] Slaninka I., Hók J., Franzen J. (2007) *Acta Montanistica Slovaca* 12(1), p. 17
- [8] Atkins P. W. (1999) *Fyzikálna chémia: 3. časť*. STU Bratislava, Bratislava, p. 761
- [9] Galamboš M., Kufčáková J., Rajec P. (2009) *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 281(3), p. 347
- [10] Galamboš M., Kufčáková J., Roskopfová O., et al. (2010) *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 283(3), p. 803
- [11] Krajňák A., Roskopfová O., Galamboš M. (2011) *Študentská vedecká konferencia Prif UK 2011, Zborník ŠVK Prif UK 2011, Bratislava*, p. 926
- [12] Galamboš M., Kufčáková J., Roskopfová O., et al. (2010) *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 283, p. 803
- [13] Savvin S. B. (1964) *Talanta*, 11, p.1

Analýza fenolových zlúčenín v rôznych druhoch čajov využitím techniky LC-MS

Katarína Krčová, Jozef Marák

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie,
Mlynská dolina, 842 15, Bratislava, Slovenská republika,
krcova@fns.uniba.sk*

Abstrakt

This paper provides an applicable approach for characterization and identification of phenolic compounds present in selected tea varieties. The content of individual phenolic compounds in the selected tea varieties is highly variable which is caused of different geographical region, fermentation procedure and growing season. In this study, a simple and rapid high performance liquid chromatography (HPLC) separation combined with mass spectrometric (MS) detection was used to analyze different types of tea (black teas and green teas). HPLC-MS analyses of selected tea samples and their phenolic profiles were performed by using Shimadzu LCMS-IT-TOFTM analyzer equipped with positive and negative electrospray ionization (ESI). HPLC experiments were performed on Kinetex XB-C18 column (100 x 2.1 mm; 2.6 μ m) with gradient elution (water + 0.1% formic acid – acetonitrile + 0.1% formic acid) with a 0.2 ml/min flow rate. Data was acquired automatically in the MS experiments within 50-1000 m/z values in both the positive and negative modes and within 190-400 nm wavelengths during DAD detection.

KLúčové slová: *zelené a čierne čaje; fenolové zlúčeniny; HPLC-MS analýza; identifikácia*

Úvod a formulácia cieľa

Pojem fenolové zlúčeniny zahŕňa mnoho látok počnúc fenolovými kyselinami (deriváty kyseliny benzoovej) až po zložité polyfenoly [1, 2]. Fenolové zlúčeniny sú sekundárne rastlinné metabolity, ktoré významne ovplyvňujú nutričné hodnoty ovocia, zeleniny a iných rastlín [2, 3]. Medzi rastlinné fenoly patria: fenolové kyseliny a ich deriváty, taníny (triesloviny), deriváty kumarínu, flavonoidy, izoflavonoidy, prenylované flavonoidy, deriváty stilbénu a ostatné fenolové látky [4].

Z chemického hľadiska sú fenoly aromatické alkoholy, ktoré majú vo svojej štruktúre –OH skupinu naviazanú na aromatickom jadre [3]. Rastlinné fenoly tvorí jedno alebo viac aromatických alebo heterocyklických jadier, pričom vo svojej štruktúre môžu fenoly obsahovať jednu, dve alebo viac hydroxylových skupín [4]. Fenolové zlúčeniny sa vyznačujú antioxidantnými, antibakteriálnymi, antikarcinogénnymi, antialergickými a protizápalovými účinkami a významne ovplyvňujú organoleptické vlastnosti potravín [4, 5, 6]. Navyše fenolové zlúčeniny hrajú významnú úlohu v prevencii kardiovaskulárnych ochorení a preto je analýza a identifikácia takýchto látok veľmi dôležitá úloha analytickej chémie [5, 6].

Hlavnými zdrojmi rastlinných fenolov pre človeka sú červené a biele vína [1], extrakty z čajov (zelený, čierny, biely) a rozličných bylín [6, 7].

Blahodarné účinky čajov na ľudské zdravie sú známe viac ako tisíc rokov a čaje sú po vode jedným z najviac konzumovaných nápojov vo svete vôbec. Zloženie čajov ovplyvňujú predovšetkým geografická poloha, vegetačné obdobie, spôsob spracovania a fermentácie čaju. Čaje môžeme podľa stupňa fermentácie rozdeliť do troch hlavných kategórií: nefermentované (zelený, biely čaj a čaj pu-erh), čiastočne fermentované (čaj „oolong“ a „paochong“) a úplne fermentované (čierny čaj a čaj pu-erh) [8].

V literatúre je možné nájsť niekoľko publikácií, ktoré sa venujú problematike charakterizácie a identifikácie fenolových látok v rôznych rastlinných extraktoch. Atoui a kol. študovali antioxidačnú aktivitu fenolov v deviatich rôznych druhoch čajov pomocou LC-ESI-MS techniky [6]. Analýzu proantokyanidínov v zelených a čiernych čajoch technikou HPLC-ESI-IT-MS vo svojej práci popísali Fraser a kol. [7]. Identifikáciu a kvantifikáciu fenolových látok v zelených čajoch, čaji pu-erh a bielych čajoch vo svojej práci robili Zhao a kol. technikou UPLC-DAD-ESI-MS [8]. Stanovenie katechínov a flavonolových glykozidov technikou HPLC-ESI-TQ-MS v rôznych druhoch čínskych čajov popísali Wu a kol. [9]. Charakterizáciu fenolových antioxidantov v čaji *Orthosiphon grandiflorus* technikou LC-ESI-MS/MS robili Neungchamng a kol. [10]. LC-ESI-IT-TOF-MS technika bola použitá napr. pri analýze flavonoidov v bambusových listoch [11], antokyanínov v lupeňoch ruže [12], polyfenolov v zelenom čaji [13] a flavonoidov v extrakte z mandarínok [14].

Cieľom tejto práce bolo štúdium možností aplikovania HPLC-MSⁿ metódy na analýzu fenolových zlúčenín vo vybraných vzorkách čiernych a zelených čajov pochádzajúcich od rôznych výrobcov.

Materiál a metódy

HPLC-MS analýzy boli uskutočnené na prístroji LCMS-IT-TOFTM analyzátor (Shimadzu, Kyoto, Japonsko), ktorý ako iónový zdroj využíva ESI ionizáciu. LCMS-IT-TOFTM analyzátor kombinuje technológiu iónovej pasce a analyzátoru doby letu, čím umožňuje vykonávať vysoko presné a citlivé MSⁿ analýzy. Ďalšou výhodou tohto MS analyzátoru je vysoké rozlíšenie jednotlivých iónov [15]. Chromatografická separácia fenolových zlúčenín bola uskutočnená na kolóne Kinetex XB-C18 (100x2,1 mm; 2.6 μm), (Phenomenex, Torrance, CA, USA), pričom bola použitá nasledovná gradientová elúcia (voda + 0,1% kyselina mravčia: acetonitril + 0,1% kyselina mravčia). Použitý gradient bol nasledovný: 0 min.: 5% ACN + 0,1% kyselina mravčia; 2 min.: 10 % ACN + 0,1% kyselina mravčia; 6 min.: 40 % ACN + 0,1% kyselina mravčia; 7 min.: 70% ACN + 0,1% kyselina mravčia; 8 min.: 70% ACN + 0,1% kyselina mravčia; 8,1 min.: 5% ACN + 0,1% kyselina

mravčia; 8,2 – 15 min.: 5% ACN + 0,1% kyselina mravčia. Chromatografická kolóna bola termostatovaná na 40 °C. Prietoková rýchlosť bola nastavená na 0,2 ml/min. MS-MS³ experimenty boli uskutočnené s automatickým zberom dát v pozitívnom aj v negatívnom móde, pričom bol využitý rozsah 50-1000 m/z. Spektrofotometrická detekcia bola robená s využitím DAD detektora v rozsahu vlnových dĺžok 190-400 nm. Injektovaný objem vzorky bol 2 µl.

Pre nastavenie MS spektrometra, rovnako ako aj pre zber a vyhodnocovanie dát bol použitý softvér LCMS Solution v.3.51 (Shimadzu). Na porovnanie zloženia jednotlivých vybraných druhov čajov a v nich obsiahnutých fenolových látok bol použitý softvér MS-Xelerator ver.2.4 (MSMetrix, Maarsse, Holandsko).

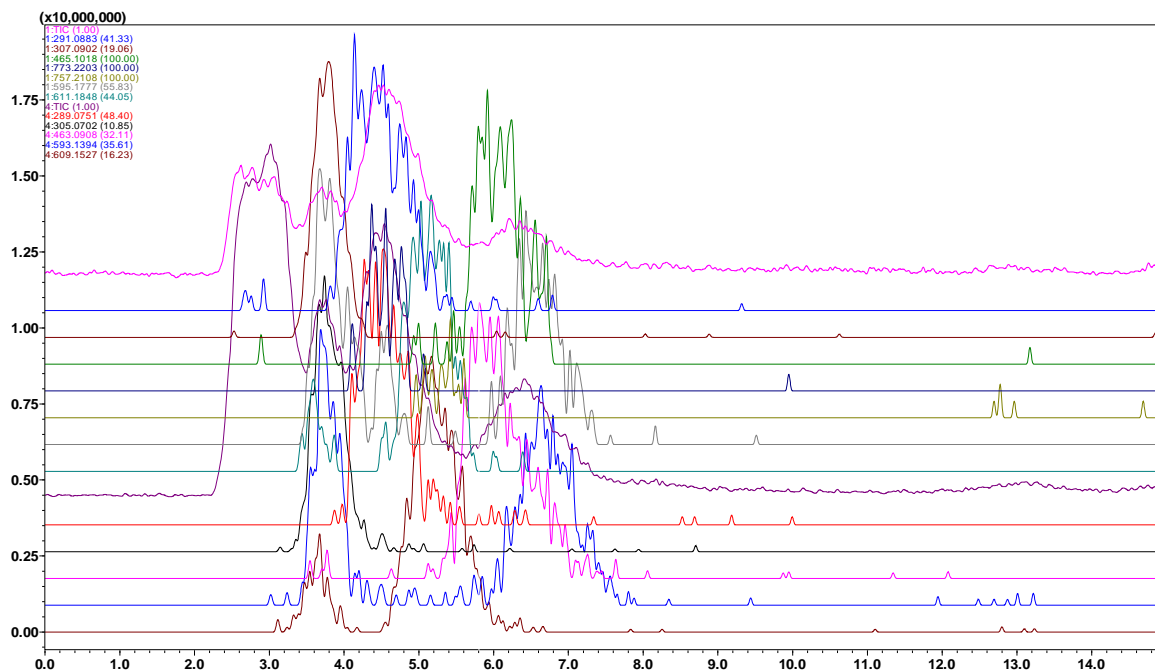
Pri príprave vzoriek bola použitá voda určená pre LC-MS analýzy, acetonitril pre LC-MS (Merck, Darmstadt, Nemecko) a kyselina mravčia pre LC-MS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko).

Vzorky: V predloženej práci bolo analyzovaných viacero druhov čiernych a zelených čajov od rôznych výrobcov, ktoré boli zakúpené v miestnom supermarkete.

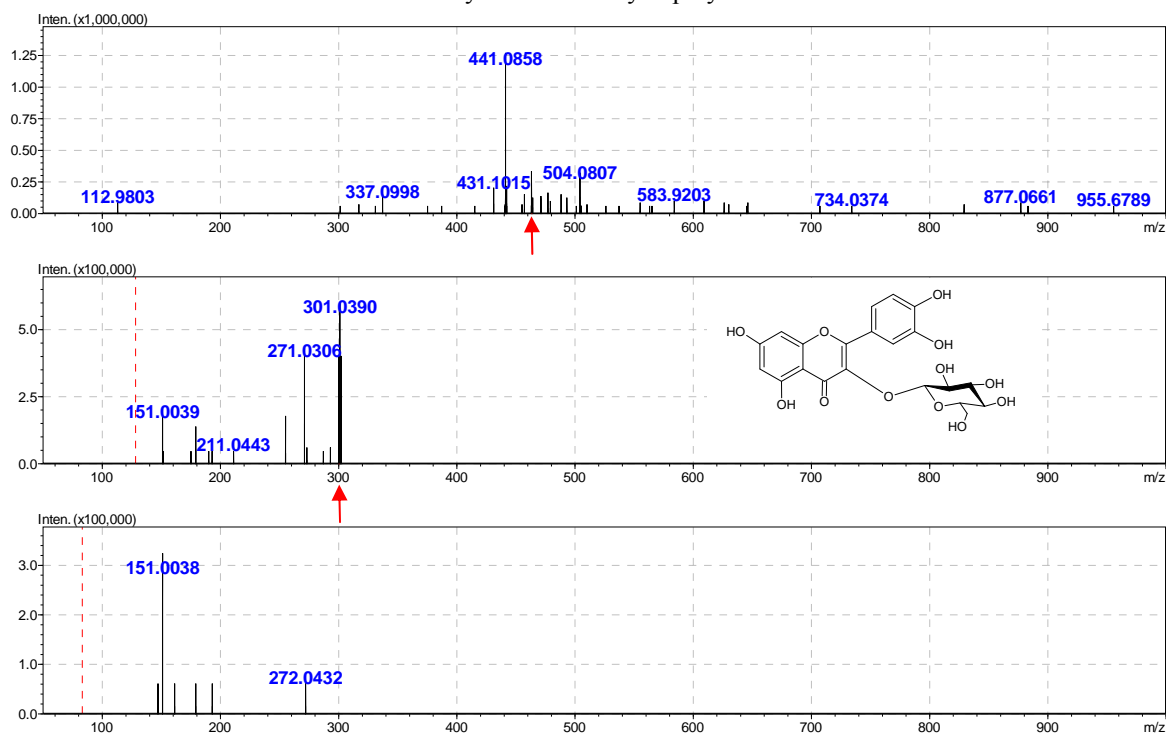
Výsledky a diskusia

Prvou časťou tejto práce bolo nájsť vhodné chromatograficko-separačné podmienky pre HPLC separáciu fenolových zlúčenín vo vybraných vzorkách rôznych druhov čajov. Následne bola uskutočnená hmotnostne- spektrometrická detekcia jednotlivých vybraných druhov čiernych a zelených čajov. Podmienky chromatografickej separácie sú uvedené v časti materiál a metódy. HPLC-MSⁿ analýzy boli uskutočnené v pozitívnom i negatívnom ionizačnom móde, pričom čas analýzy bol 15 minút. Pred samotnou HPLC-MSⁿ analýzou bolo potrebné pripraviť vzorky čajov nasledovne: každé vrecúško čaju o hmotnosti 1,5 g bolo zaliate 150 ml vriacej vody, pričom čas lúhovania bol 5 min. Výluh z čaju sme následne nechali ochladiť na laboratórnu teplotu.

Získané chromatografické záznamy nám umožňujú získať lepší prehľad o zložení jednotlivých vybraných druhov čajov a charaktere a štruktúre v nich obsiahnutých fenolových zlúčenín (viď Obr. 1 a Obr. 2). Odlišné zloženie jednotlivých druhov čajov a pomerné zastúpenie v nich obsiahnutých fenolových látok môže byť spôsobené spôsobom spracovania čajových listov, geografickou polohou a spôsobom fermentácie čajov. Charakterizácia a identifikácia jednotlivých fenolových zlúčenín v čajoch sa uskutočnila pomocou softvéru LCMS Solution v.3.51 (Shimadzu).



Obr. 1 HPLC-MS analýza vzorky zeleného čaju. TIC záznamy v jednotlivých ionizačných módoch a EIC záznamy identifikovaných polyfenolov.



Obr. 2 MS-MS³ spektrá identifikovaného polyfenolu kvercetín-glykozidu.

Záver

Predložená práca bola zameraná na možnosti využitia HPLC-MSⁿ metódy pre analýzu fenolových zlúčenín v jednotlivých druhoch čiernych a zelených čajov od rôznych výrobcov. Analýzy boli uskutočnené na LC-ESI-IT-TOF MS analyzátore. Na základe LC-MS analýz jednotlivých vzoriek čajov sme získali informácie o charaktere a štruktúre v nich zastúpených

fenolových zlúčenín. Zo získaných výsledkov môžeme konštatovať, že HPLC-MSⁿ metóda doplnená príslušným softvérovým vybavením je efektívnym prostriedkom pre charakterizáciu a identifikáciu fenolových zlúčenín vo vybraných druhoch čajov.

Pod'akovanie

Táto práca vznikla za finančnej podpory Agentúry na podporu výskumu a vývoja (projekt VVCE-0070-07, APVV-0583-11) a grantu VEGA 1/1305/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Jaitz L., Siegl K., Eder R., Rak G., Abranko L., Koellensperger G., Hann S. (2010) Food Chem. 122, p. 366
- [2] Ignat I., Volf I., Popa V. I. (2011) Food Chem. 126, p. 1821
- [3] Atlas [Citované: 1. marec 2013]
<<http://referaty.atlas.sk/prirodnevedy/chemia/50908/?print=1>>
- [4] VSCHT [Citované: 4. marec 2013]
<<http://web.vscht.cz/koplikr/Rostlinn%C3%A9%20fenoly%20a%20flavonoidy.pdf>>
- [5] Ginjom I., D'Arcy B., Caffin N., Gidley M. (2011) Food Chem. 125, p. 823
- [6] Atoui A. K., Mansouri A., Boskou G., Kefalas P. (2005) Food Chem. 89, p. 27
- [7] Fraser K., Harrison S. J., Lane G. A., Otter D. E., Hemar Y., Quek S. Y., Rasmussen S. (2012) J. Food Compos. Anal. 26, p. 43
- [8] Zhao Y., Chen P., Lin L., Harnly J.M., Yu L. L., Li Z. (2011) Food Chem. 126, p. 1269
- [9] Wu Ch., Xu H., Héritier J., Andlauer W. (2012) Food Chem. 132, p. 144
- [10] Nuengchamnong N., Krittasilp K., Ingkaninan K. (2011) Food Chem. 127, p. 1287
- [11] Lv Z., Dong J., Zhang B. (2011) BioRes. 7(2), p. 1405
- [12] Shimadzu [Citované: 2. marec 2013]
<<http://www2.shimadzu.com/applications/LCMS,MALDI-TOFMS/SSI-LCMS-003.pdf>>
- [13] Shimadzu [Citované: 3. marec 2013]
<http://www2.shimadzu.com/apps/appnotes/SSI_LCMS_IT_TOF_Green_Tea.pdf>
- [14] Shimadzu [Citované: 2. marec 2013]
<<http://www2.shimadzu.com/applications/lcms/c051.pdf>>
- [15] Shimadzu [Citované: 4. marec 2013]
<<http://www.shimadzu.com/products/lab/ms/oh80jt000000afs0.html>>

Totálna spontánná rezolúcia TBA[VO₂(*N*-sal-DL-Ile)]

Lukáš Krivosudský, Peter Schwendt

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra anorganickej chémie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, krivosudskyl@fns.uniba.sk

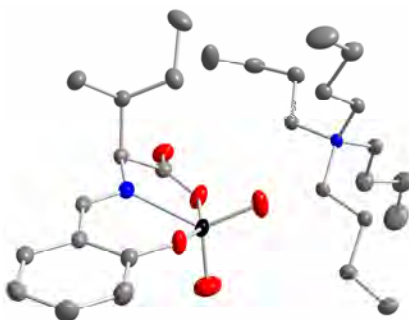
Abstrakt

This work deals with the study of the synthesis and crystallization of the complex TBA(C)-[VO₂(*N*-sal-L-Ile)] from a racemic mixture. With ⁵¹V, ¹H NMR spectroscopies and polarimetry it has been shown that the synthesis of the complex starting from racemic DL-isoleucine is diastereospecific. Repeat of the synthesis and analysis of the isolated products confirmed that the crystallization of the complex from outwardly racemic environment leads to a total spontaneous resolution and out of four stereoisomers expected exclusively one isomer, TBA(C)-[VO₂(*N*-sal-L-Ile)] crystallizes. This statement was proved by polarimetric analysis, ECD and VCD spectroscopy.

Kľúčové slová: *totálna spontánná rezolúcia; komplexy vanádu*

Úvod a formulácia cieľa

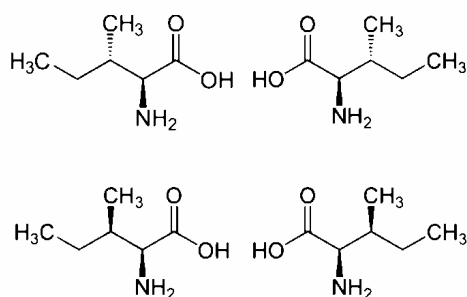
Komplexy vanádu(V) so Schiffovými bázami sú zaujímavé z hľadiska ich využitia v katalýze [1, 2, 3, 4]. Menej pozornosti sa však venuje štúdiu ich stereochemie. Predpokladá sa, že tvorba tetragonálne pyramidálnych a oktaedrických komplexov je diastereošpecifická, čo znamená, že ak ligand koordinovaný na centrálny atóm vanádu(V) obsahuje jedno stereogénne centrum a je enantiomérne čistý a po koordinácii na atóme vanádu(V) vznikne ďalšie stereogénne centrum, v izolovanom kryštalickom produkte sa pozoruje spravidla jeden stereoizomér namiesto dvoch možných diastereoizomérov [5, 6, 7, 8].



Obr. 1 Kryštalová štruktúra TBA(C)-[VO₂(*N*-sal-L-Ile)].

V našej predchádzajúcej práci [9] sme opísali syntézu a charakterizáciu [N(CH₂CH₂CH₂CH₃)₄](C)-[VO₂(*N*-salicyliden-L-izoleucináto)], ďalej len TBA(C)-[VO₂(*N*-sal-L-Ile)] (Obr. 1). V tejto práci bola syntéza zopakovaná s použitím DL-izoleucínu, ktorý je

zmesou štyroch stereoizomérov (Obr. 2): L-izoleucín ($2S,3S$), D-izoleucín ($2R,3R$), L-*allo*-izoleucín ($2S,3R$), D-*allo*-izoleucín ($2R,3S$). Cieľom práce bolo lepšie pochopenie syntézy, stereochemie a kryštalizácie z racemického prostredia. Keďže izoleucín obsahuje dve stereogénne centrá a po koordinácii Schiffovej bázy na atóm vanádu vzniká ďalšie stereogénne centrum na atóme kovu, teoreticky je možný vznik 8 stereoizomérov. Na základe údajov v literatúre sme predpokladali, že aj v našom prípade bude tvorba komplexov diastereošpecifická a očakávali sme 4 stereoizoméry TBA[VO₂(*N*-sal-DL-Ile)].



Obr. 2 Stereoizoméry izoleucínu: L- a D-izoleucín (hore), L-*allo*- a D-*allo*-izoleucín (dolu).

Materiál a metódy

Všetky použité chemikálie boli dodané z komerčných zdrojov a boli použité bez ďalšej úpravy. TBA(C)-[VO₂(*N*-sal-L-Ile)] a TBA[VO₂(*N*-sal-DL-Ile)] boli pripravené podľa [9] s použitím L-izoleucínu alebo DL-izoleucínu (Sigma-Aldrich). Pomer štyroch stereoizomérov DL-izoleucínu bol stanovený pomocou ¹H NMR spektroskopie a polarimetrie. ¹H NMR spektrá boli merané na prístroji Varian Gemini (300 MHz a 600 MHz) v CDCl₃ s interným štandardom tetrametylsilánom, ⁵¹V NMR spektrá boli merané na prístroji Varian Gemini (600 MHz) pri 5 °C s externým štandardom VOCl₃. Špecifická optická otáčavosť bola meraná v CH₃CN roztokoch na prístroji JASCO P-2000 POLARIMETER pri vlnovej dĺžke 589 nm v kyvete s dĺžkou 1 dm, s koncentráciou látky 10,00 mg/ml pri teplote 20,00 °C. ECD a UV-VIS spektrá boli namerané na prístroji JASCO J-815 CD Spectrometer v CH₃CN roztokoch s koncentráciou 10⁻⁴ mol·dm⁻³ v 1 cm kyvete pri laboratórnej teplote. VCD spektrá boli namerané na prístroji Bruker FT-IR Tensor 27 s VCD modulom PMA 50 s MCT detektorom v 0,1 mm BaF₂ kyvete pri koncentrácii 600 mmol·dm⁻³ v CD₃CN.

Výsledky a diskusia

Na základe ¹H NMR spektroskopie bol určený pomer diastereomérov [($2S,3S$), ($2R,3R$)]-izoleucínu a [($2S,3R$), ($2R,3S$)]-izoleucínu 1:1. Keďže pre vodný roztok DL-

izoleucinátu draselného bola nameraná nulová hodnota špecifickej optickej otáčavosti, ani jeden zo štyroch stereoizomérov nemôže byť v nadbytku. Z týchto meraní vyplýva, že pomer stereoizomérov (*2S,3S*), (*2R,3R*), (*2S,3R*), (*2R,3S*) v komerčne dostupnom DL-izoleucíne je 1:1:1:1.

Syntéza TBA[VO₂(*N*-sal-DL-Ile)] poskytovala v priemere menšie výťažky kryštalického produktu (20 – 30 %) v porovnaní so syntézou TBA(C)-[VO₂(*N*-sal-L-Ile)] (> 60 %). Izolovaný produkt zložením zodpovedá TBA[VO₂(*N*-sal-DL-Ile)] a v nechiroptických parametroch sa zhoduje s látkou TBA(C)-[VO₂(*N*-sal-L-Ile)] popísanou v [9]. Po kryštalizácii TBA[VO₂(*N*-sal-DL-Ile)] s obvyklým výťažkom do 30 % bol získaný produkt, ktorého chemický posun v CH₃CN roztoku –533,483 ppm zodpovedá chemickému posunu TBA(C)-[VO₂(*N*-sal-L-Ile)], čo naznačuje, že v produkte sa môžu nachádzať len enantioméry TBA(C)-[VO₂(*N*-sal-L-Ile)] a/alebo TBA(A)-[VO₂(*N*-sal-D-Ile)], ktoré sa svojim chemickým posunom nelíšia. Pri väčšom výťažku kryštalizácie (> 60 %) sa v ⁵¹V NMR spektre nachádzajú dva signály s rozdielom 1 ppm, pričom sa dá predpokladať, že signál –532,585 ppm zodpovedá ďalším dvom možným vzájomným enantiomérom obsahujúcim *D-allo* alebo *L-allo* izoleucín s konfiguráciou na atóme vanádu A alebo C. Diastereomérený pomer je 72:28. Tento záver bol potvrdený aj pomocou ¹H NMR spektroskopie, kde bol zistený diastereomérený pomer 70:30. ⁵¹V NMR spektrum roztoku TBA[VO₂(*N*-sal-DL-Ile)] pred kryštalizáciou poukazuje sa diastereošpecifickú tvorbu samotného komplexu: pomer signálov pre jednotlivé diastereoizoméry je 62:38 v prospech TBA(C)-[VO₂(*N*-sal-L-Ile)] a/alebo TBA(A)-[VO₂(*N*-sal-D-Ile)].

Na základe týchto výsledkov možno usúdiť, že syntéza komplexu TBA[VO₂(*N*-sal-DL-Ile)] pri použití racemického DL-izoleucínu je diastereošpecifická a pri kryštalizácii dochádza k stereošpecifickej diskriminácii – je uprednostňovaný diastereoizomér, ktorý sa nachádza v roztoku v nadbytku. Predpokladáme, že hlavnou príčinou tohto javu je rozpustnosť, čo potvrdzuje aj pozorovanie nižšieho výťažku pri rovnakom postupe syntézy a kryštalizácie v porovnaní s TBA(C)-[VO₂(*N*-sal-L-Ile)] – viac rozpustné komplexy obsahujúce *allo*-izoméry izoleucínu zostávajú v roztoku. Ďalšou príčinou môže byť nepriaznivá situácia pre vznik niektorých diastereoizomérov zo sterických dôvodov.

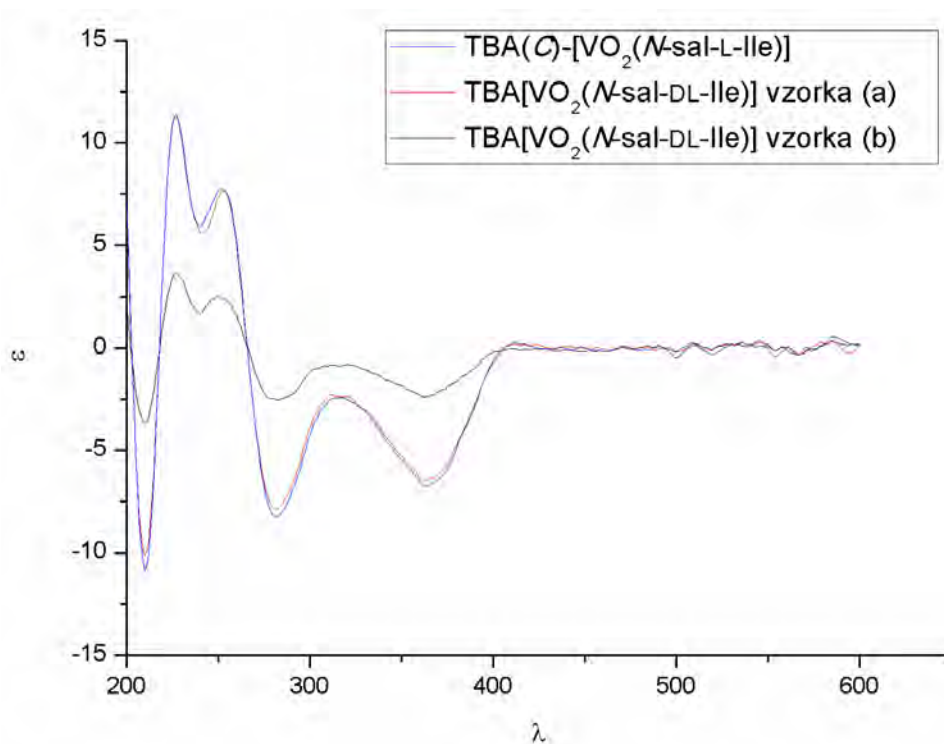
Syntéza TBA[VO₂(*N*-sal-DL-Ile)] bola následne zopakovaná 10 krát a kryštalizácia bola zastavená vždy s výťažkom do 20 %. Polarimetrická analýza získaných produktov (Tab. 1) priniesla jasný dôkaz o tom, že v izolovanom produkte sa nachádza iba jeden z dvoch možných enantiomérov, a to TBA(C)-[VO₂(*N*-sal-L-Ile)], ktorý obsahuje do 3 % prímiesi

iných stereoizomérov.

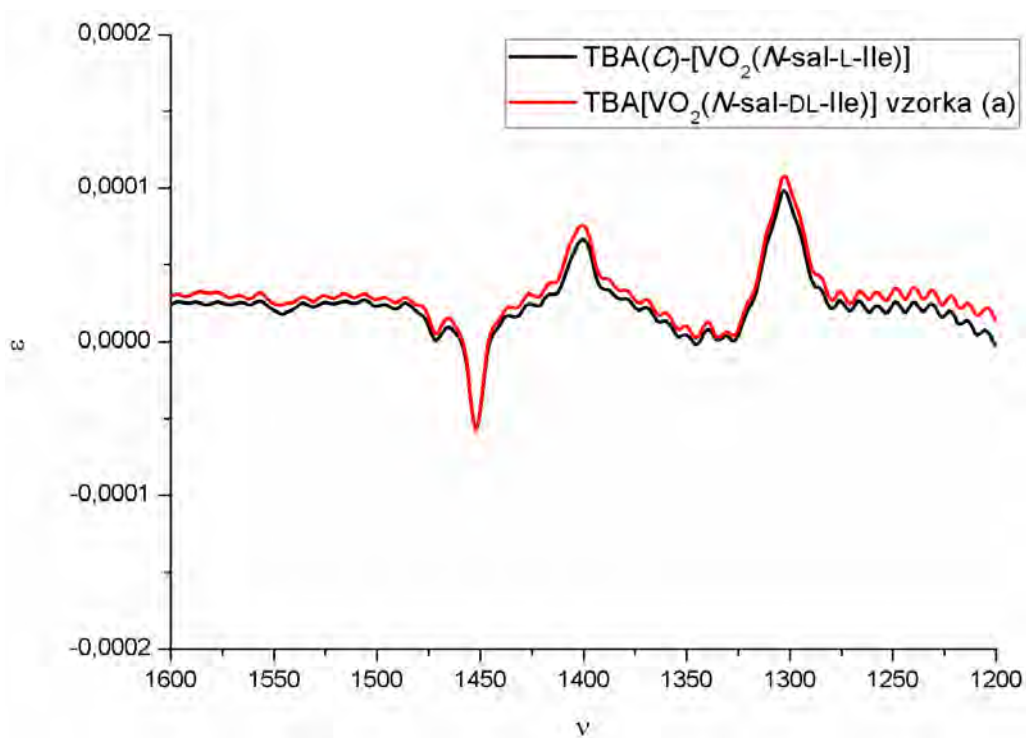
Tab. 1 Polarimetrická analýza TBA[VO₂(*N*-sal-DL-Ile)]

Vzorka	α_D^{20}
1	- 178,42
2	- 176,15
3	- 171,99
4	- 179,52
5	- 175,75
6	- 177,56
7	- 177,95
8	- 175,47
9	- 180,99
10	- 180,45
TBA(C)-[VO ₂ (<i>N</i> -sal-L-Ile)]	- 182,48

Hypotézu, že pri syntéze a kryštalizácii TBA[VO₂(*N*-sal-DL-Ile)] dochádza k totálnej spontánnej rezolúcii a z reakčnej zmesi sa izoluje len jeden enantiomér, TBA(C)-[VO₂(*N*-sal-L-Ile)], sme sa rozhodli overiť pomocou ECD a VCD spektroskopie. Získané spektrá boli porovnané so spektrami TBA(C)-[VO₂(*N*-sal-L-Ile)] získaného syntézou s použitím L-izoleucínu. V ECD spektre látky TBA[VO₂(*N*-sal-DL-Ile)] (Obr. 3, vzorka (a)) dochádza v porovnaní s TBA(C)-[VO₂(*N*-sal-L-Ile)] k nepatrnému zníženiu extinkčného koeficienta vplyvom nečistôt. Polohy, znamienka a intenzity všetkých pásov sa však v princípe zhodujú. Vzorka (b) bola získaná kryštalizáciou s výtťažkom 60 % a teda musí obsahovať aj ďalšie stereoizoméry, čo sa prejavilo výrazným znížením extinkčného koeficienta. VCD spektrum látky TBA[VO₂(*N*-sal-DL-Ile)] sa prakticky zhoduje so spektrom TBA(C)-[VO₂(*N*-sal-L-Ile)] (Obr. 4). Keďže metóda VCD je podstatne menej citlivá ako ECD, mierny rozdiel v intenzitách pásov nemožno brať do úvahy. Vo VCD spektrách sú v oblasti 1200 – 1600 cm⁻¹ dobre viditeľné tri vibrácie pri 1300, 1400 a 1450 cm⁻¹, ktoré v zložitom vibračnom pohybe molekuly zodpovedajú najmä valenčným vibráciám C–O, C=O a C=N.



Obr. 3 Porovnanie ECD spektier látok TBA[VO₂(*N*-sal-DL-Ile)] a TBA(*C*)-[VO₂(*N*-sal-L-Ile)].



Obr. 4 Porovnanie VCD spektier látok TBA[VO₂(*N*-sal-DL-Ile)] a TBA(*C*)-[VO₂(*N*-sal-L-Ile)].

Z porovnania spektier je zrejmé, že izolovaná vzorka (a) TBA[VO₂(*N*-sal-DL-Ile)] obsahuje zo štyroch možných stereizomérov výhradne enantiomér TBA(*C*)-[VO₂(*N*-sal-L-Ile)].

Záver

Štúdium syntézy a kryštalizácie TBA[VO₂(*N*-sal-DL-Ile)] prinieslo jasné dôkazy o nielen diastereošpecifickej tvorbe tohto komplexu, ale aj o totálnej spontánnej rezolúcii komplexu, ktorá bola dokázaná izoláciou jediného enantioméru TBA(*C*)-[VO₂(*N*-sal-L-Ile)] zo štyroch predpokladaných a ôsmich teoreticky možných stereoizomérov. Na základe porovnania s údajmi v literatúre možno považovať desať opakovaní syntézy za spoľahlivý štatistický dôkaz. Získaný produkt bol charakterizovaný pomocou polarimetrie, ECD a VCD spektroskopie. Namerané spektrá budú porovnané s teoretickým výpočtom pre ich lepšiu interpretáciu.

Pod'akovanie

Autori ďakujú za finančnú podporu Vedeckej grantovej agentúre Ministerstva školstva SR (Grant VEGA 1/0336/13).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Conte V., Floris B. (2010) *Inorg. Chim. Acta* 363, p. 1935
- [2] Bolm C. (2003) *Coord. Chem. Rev.* 237, p. 245
- [3] O'Mahony G. E., Kelly P., Lawrence S. E., Maguire A. R. (2011) *Arkivoc* 2011(i), p. 1
- [4] Conte V., Floris B. (2011) *Dalton Trans.* 40, p. 1419
- [5] Bian L., Li L. (2011) *Acta Cryst. Sect. E* 67 p. 274
- [6] Cao Y.Z., Zhao H.Y., Bai F.Y., Xing Y.H., Wei D.M., Niu S.Y., Shi Z. (2011) *Inorg. Chim. Acta* 368, p. 223
- [7] Fulwood R., Schmidt H., Rehder D. (1995) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, p. 1443
- [8] Schulz M., Debel R., Görls H., Plass W., Westerhausen M. (2011) *Inorg. Chim. Acta* 365, p. 349
- [9] Krivosudský L., Schwendt P. (2012) Študentská vedecká konferencia PriF UK 2012, Zborník recenzovaných príspevkov, Bratislava, SR, p. 908

Simultánna chromatografická analýza endogénnych estrogénov v moči

Elena Kupcová, Katarína Reiffová

Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Prírodovedecká fakulta, Ústav chemických vied, Katedra analytickej chémie, Moyzesova 11, 041 54 Košice, Slovenská republika;
elena.kupcova@gmail.com

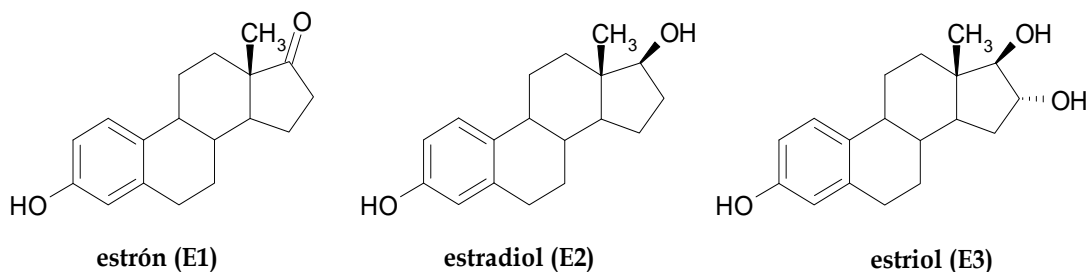
Abstrakt

Endogenous estrogens are essential for regulation of many biochemical processes within organism, therefore their determination plays important role in providing useful information for diagnosis and management of particular human diseases. This work proposes optimized method for the analysis of free estrone, 17 β -estradiol and estriol in human pregnancy urine using thin layer chromatography with densitometric and chemical detection. Optimal conditions of analysis were achieved on silica gel thin-layers developed in the mobile phase toluene – ethanol (9 : 1; v/v). Phosphomolybdic acid in methanol was used as a sensitive detection reagent. Because of low concentrations of estrogens in urine, the samples were pretreated by a solid phase extraction (SPE) protocol. Developed method was used for the analysis of free estrogens in urine samples.

Kľúčové slová: estrón; 17 β -estradiol; estriol; moč; SPE; TLC; detekčné činidlo; LOD

Úvod a formulácia cieľa

Estrón, 17 β -estradiol a estriol (Obr. 1) sú najvýznamnejšími ľudskými estrogénmi, ktoré sú esenciálne pre správnu funkciu reprodukčného systému žien [1].



Obr. 1 Chemická štruktúra endogénnych estrogénov

Primárnym estrogénom v organizme je estradiol, jeho hlavným zdrojom sú vaječníky, v menšej miere vzniká v maternici a prsníkoch, po menopauze je produkovaný periférnym tukovým tkanivom. Estradiol je vzájomne konvertovateľný s estrónom a estriolom, ktoré majú špecifické účinky na organizmus. Najvýznamnejším estrogénom počas tehotenstva je estriol, ktorý je vo zvýšenej miere syntetizovaný placentou [2, 3].

Analytické stanovenie estrogénov má význam z hľadiska hodnotenia mnohých biochemických procesov, ktoré v organizme regulujú (metabolizmus kostí, metabolizmus lipidov) [3]. Estrogény sú tiež zodpovedné za vznik početných rakovinových ochorení, preto je ich monitoring dôležitý [4]. V rutinnej klinickej analýze sú využívané hlavne

imunochemické kvantitatívne analýzy, ktoré sú rýchle a nevyžadujú extrakciu analytu [5, 6], no veľkou nevýhodou je ich nešpecifickosť, ktorá nie je adekvátne pre vedecké účely [7, 8]. Estrogény sú stanovované najčastejšie v sére a v moči, ktorý je ich hlavnou eliminačnou cestou z organizmu. Moč obsahuje predovšetkým konjugáty estrogénov, ale v menšom množstve sú prítomné aj vo voľnej forme [9]. Zvýšené množstvo estrogénnych látok (prírodných aj syntetických) v životnom prostredí a ich nepriaznivé účinky na organizmus viedli k rapídneho rozvoju metód analýzy voľných a konjugovaných estrogénov v environmentálnych vzorkách [10]. Napriek tomu, že je známe množstvo metód pre analýzu estrogénov [10, 11, 12], každý postup má svoje obmedzenia a musí byť optimalizovaný vzhľadom na charakter vzorky.

Cieľom tejto práce bolo navrhnúť jednoduchý komplexný analytický postup pre simultánnu chromatografickú analýzu voľných endogénnych estrogénov v moči.

Materiál a metódy

Na chromatografickú analýzu bola použitá stacionárna fáza (SF) - tenká vrstva so silikagélom na hliníkovej podložke (Alugram Sil G/UV 254, Macherey-Nagel, Nemecko), vertikálna chromatografická komora (Lublin, Poľsko), mikrostriekačka (Hamilton, Švajčiarsko), sušička KCW 100 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika), UV lampa Laborgeräte Vetter GMBH (Wiesloch, Nemecko), denzitometer Shimadzu CS-930 (Kyoto, Japonsko), tlaková komora (Lambda Life, Slovenská republika) napojená na vákuovú pumpu Vacuum Pump XF 54 230 (Merck Millipore, Nemecko) a kolónky RP-Select B (LiChrolut, Merck, Nemecko) so sorbentom C-18. Na prípravu mobilných fáz boli použité: chloroform, metanol, benzén, acetón, etylester kyseliny octovej, cyklohexán, etanol a toluén (Mikrochem, Slovenská republika). Použité rozpúšťadlá boli analytickej čistoty. Na prípravu detekčných činidiel boli použité: etanol, metanol (Mikrochem, Slovenská republika), kyselina sírová, kyselina fosfomolybdénová, síran ceričito-amónny, kyselina fosforečná, chlorid manganatý, vanilín (Multirecom, Slovenská republika).

Vzorky moča tehotných žien boli po odbere skladované pri teplote -10°C a boli spracované najneskôr nasledujúci deň po odbere. Vzorky boli upravené metódou SPE, ktorá pozostáva zo štyroch krokov (Tab. 1).

Tab. 1 Postup úpravy vzorky moča metódou SPE

KROK	APLIKÁCIA ČINIDLA/ VZORKY	OBJEM/ČAS
1. kondicionácia	voda – metanol (1 : 1; v/v)	1 ml/ 10 min.
2. aplikácia vzorky	čistý moč, moč s PZŠ*	1 ml/ 20 min.
3. premývanie	okyslená voda s H ₃ PO ₄ (pH = 2)	3 x 1 ml
4. elúcia	metanol	0,5 ml

*PZŠ – prídavok zmesného štandardu

V práci boli použité zásobné roztoky štandardov estrónu, estradiolu a estriolu (Cayman, USA) s koncentráciou 1 mg.ml⁻¹, pripravené rozpustením v metanole. Pracovné roztoky boli nariedené zo zásobných roztokov. Vzorky moča a pracovné roztoky boli na tenkú vrstvu nanosené mikrostriekačkou v objeme 0,3 µl a vyvíjané v mobilnej fáze (Tab. 2). Vysušené tenké vrstvy boli po vyhodnotení denzitometrom krátko (1 – 2 sekundy) ponorené do detekčného činidla a zahrievané pri teplote 110°C až do vyfarbenia zón estrogénov na chromatograme.

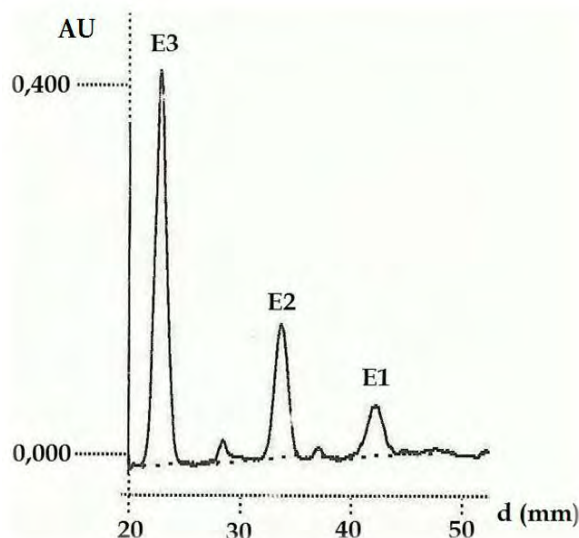
Výsledky a diskusia

Na separáciu estrogénov bolo v práci odskúšaných päť mobilných fáz (MF). Retenčné charakteristiky (R_F hodnoty) jednotlivých estrogénov sú uvedené v Tab. 2.

Tab. 2 Odkúšané mobilné fázy [13,14,15]

Mobilná fáza	R _F hodnoty		
	estrón	estradiol	estriol
1. cyklohexán – etylester kys. octovej – etanol (6 : 4 : 0,25; v/v)	0,75	0,52	0,16
2. benzén – acetón (2 : 1; v/v)	0,83	0,66	0,25
3. toluén – etanol (9 : 1; v/v)	0,75	0,51	0,10
4. chloroform – metanol (19 : 1; v/v)	0,69	0,45	0,11
5. chloroform – etylester kys. octovej – acetón (6 : 2 : 1; v/v/v)	0,43	0,28	0,13

Z odskúšaných mobilných fáz našim požiadavkám vyhovovala dvojjložková mobilná fáza toluén – etanol (9 : 1; v/v), ktorá bola použitá pri všetkých experimentoch. Denzitometrický záznam zmesi estrogénov separovaných v tejto mobilnej fáze je na Obr. 2.



Obr. 2 Densitometrický záznam zmesi estrogénov - SF: silikagél; MF: toluén – etanol (9 : 1; v/v); dávkovaný objem: 0,3 μ l; λ = 280 nm; E1: estrón; E2: estradiol; E3: estriol; AU: signál; d: vzdialenosť od štartu

Okrem densitometrickej detekcie boli estrogény detekované na tenkej vrstve aj pomocou citlivých chemických (detekčných) činidiel. V práci boli odskúšané 4 detekčné činidlá[14 - 16]:

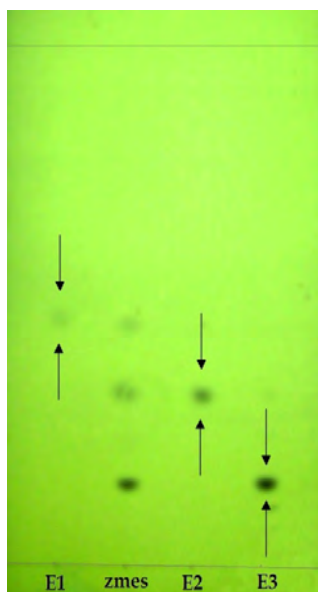
- **MnCl₂ – H₂SO₄** (chlorid manganatý – metanol – kyselina sírová)
- **Vanilín** (vanilín – etanol – kyselina fosforečná)
- **(NH₄)₄Ce(SO₄)₄** (síran ceričito-amónny - kyselina fosforečná)
- **PMA** (kyselina fosfomolybdénová – metanol)

Medze detekcie pre jednotlivé estrogény pri použitých detekčných činidlách sú uvedené v Tab. 3.

Tab. 3 Medza detekcie pre jednotlivé estrogény [17]

Detekčné činidlo	Medza detekcie (ng/ zóna)		
	E1	E2	E3
MnCl ₂ - H ₂ SO ₄	75,00	37,50	4,69
Vanilín	150,00	37,50	18,75
PMA	75,00	9,38	9,38
(NH ₄) ₄ Ce(SO ₄) ₄	150,00	37,50	18,75

Optimálnym detekčným činidlom z hľadiska citlivosti a aplikácie na tenkú vrstvu bol roztok kyseliny fosfomolybdénovej v metanole, ktorý bol použitý aj pri analýze reálnych vzoriek moča. TLC chromatogram štandardných roztokov estrogénov po aplikácii detekčného činidla PMA je na Obr. 3.



Obf. 3 TLC chromatogram štandardov estrogénov po aplikácii detekčného činidla PMA - SF: silikagél; MF: toluén – etanol (9 : 1; v/v); dávkovaný objem: 0,3 µl; E1: estrón; E2: estradiol; E3: estriol

Chromatografickou analýzou vzoriek moča v 34. týždni tehotenstva bolo stanovené množstvo estradiolu denzitometrom aj použitím detekčného činidla PMA, pričom koncentrácia estradiolu sa pohybovala na úrovni 33 ng/ zóna.

Záver

V práci bol navrhnutý jednoduchý postup komplexnej analýzy estrogénov v moči metódou tenkovrstvovej chromatografie s denzitometrickou a chemickou detekciou. Na predúpravu vzoriek moča bola použitá metóda extrakcie tuhou fázou (SPE), ktorá umožňuje zakoncentrovanie analytu a prečistenie biologickej matrice. Na analýzu boli použité tenké vrstvy so silikagélom na hliníkovej podložke a mobilná fáza zmes toluén – etanol (9 : 1; v/v). Vhodným a citlivým detekčným činidlom pre chemickú detekciu estrogénov bol roztok kyseliny fosfomolybdénovej v metanole. Metóda bola použitá na analýzu reálnych vzoriek moča vo vyšších týždňoch tehotenstva.

Pod'akovanie

Práca bola podporená grantom MŠ SR VEGA 1/1096/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Gruber C. J., Tschugguel W., Schneeberger C., Huber J. C. (2002) *N. Engl. J. Med.* 346, p. 340
- [2] Nelson L. R., Bulun, S. E. (2001) *J. Am. Acad. Dermatol.* 45 (3), p. 116
- [3] Simpson E. R. (2003) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 86, p. 225
- [4] Clemons M., Goss P. (2001) *N. Engl. J. Med.* 344 (4), p. 276
- [5] Stanczyk F. Z., Cho M. M., Endres D. B., Morrison J. L., Patel S., Paulson R. J. (2003) *Steroids.* 68, p. 1173
- [6] Ankarberg-Lindgren C., Norjavaara E. (2008) *Eur. J. Endocrinol.* 158, p. 117
- [7] Stanczyk F. Z., Lee J. S., Santen R. J. (2007) *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* 16, p. 1713
- [8] Toniolo P., Lukanova A. (2005) *Breast Cancer Res.* 7, p. 45
- [9] D'Ascenzo G., Di Corcia A., Gentili A., Mancini R., Masatropasqua R., Nazzari M., Samperi R. (2003) *Sci. Total Environ.* 302, p. 199
- [10] Makin H. L. J., Gower D. B. (2010) *Steroid analysis.* Springer, London, UK, p. 605
- [11] Lee J. S., Ettinger B., Stanczyk F. Z., Vitnnghoff E., Hanes V., Cauley J. A., Chandler W., Settlage J., Beattie M. S., Folkered E., Dowsett M., Gredy D., Cummings S. R. (2006) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, p. 3791
- [12] Giese R. W. (2003) *J. Chromatogr. A*, 1000, p. 401
- [13] Cimpoiu C., Hosu A., Hodisan S. (2006) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41; p. 633
- [14] Jork H., Funk W., Fischer W., Wimmer H. (1990): *Thin-Layer Chromatography: Reagents and Detection Methods*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, p. 333
- [15] Williamson J., Orden D., Rosazza J. P. (1985) *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (3), p. 563
- [16] Zarzycki P.K., Wlodarczyk E., Zarzycka M. B., Glod B. K. (2009) *Anal. Sci.* 25 (7), p. 935
- [17] Reiffová K., Kupcová E. (2013) *J. Planar Chromatogr. - Modern TLC* 26 (2) (v tlači)

Distribúcia veľkosti častíc frakcií bentonitu Stará Kremnička – Jelšový potok, získaných sedimentačnou frakcionáciou vodnej suspenzie bentonitu

Matej Kurek, Karol Jesenák

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra anorganickej chémie, Mlynská dolina, 84215 Bratislava, Slovenská republika, kurobag@gmail.com

Abstrakt

With decantation method were from water suspension of bentonite quantitatively separated thin fractions of bentonite defined by Stokes particle size. Subsequently, these fractions were characterized by a particle size distribution, with help of laser particle size analyzer. It was determined, that there is a significant difference between upper and lower limit of separated fractions in measures of Stokes particle size. This difference was more significant for fine-grained fractions. Simultaneously, there was detected contamination of all fractions with objectionable particles, which were out of scale in measure of required dispersion of particles. Because of unavailability of better alternative to method used nowadays, acquired fractions and their granularity characteristics can be used as the starting point for research which will focus on relations between size of bentonite particles and its practically usable physically-chemical characteristics. In this article, term particle is used to identify agglomerated crystallites, which contain mainly clayey material montmorillonite.

KLúčové slová: bentonit; montmorillonit; sedimentácia; distribúcia veľkosti častíc

Úvod a formulácia cieľa

Bentonit je ílová hornina, ktorej hlavnú ílovú zložku tvorí ílový minerál montmorillonit. Kvalita bentonitu, ako aj kvalita priemyselne separovaných bentonitových produktov, sa zvyčajne hodnotí na základe obsahu montmorillonitu. Vysoký obsah montmorillonitu nie je však jediným kritériom jeho kvality, pretože obsah iných ílových minerálov môže aj pri ich nízkych obsahoch túto kvalitu výrazným spôsobom znižovať. Priemyselne najvýznamnejší slovenský bentonit z lokality Stará Kremnička – Jelšový potok, neobsahuje významné množstvo iných ílových minerálov, a preto je kvalita bentonitových produktov negatívne ovplyvňovaná najmä obsahom neílových zložiek. Montmorillonit sa sústreďuje prednostne v jemnozrnných frakciách bentonitu, pričom obsah neílovej zložky kontinuálne vzrastá s veľkosťou častíc a zároveň aj s ich hustotou. Preto existuje úzky vzťah medzi obsahom montmorillonitu a veľkosťou častíc vo frakciách bentonitu. Tento vzťah je dôležitý, pretože metódy stanovenia hmotnostného obsahu montmorillonitu sú vo všeobecnosti náročné a nemožno ich použiť ako rýchle metódy vhodné pre sériové technologické testy.

Praktické využitie tohto vzťahu je v tom, že distribúcia veľkosti častíc, ktorú možno získať rýchlymi a menej náročnými metódami, môže slúžiť ako užitočná kvalitatívna

charakteristika bentonitových frakcií. Predpokladom pre takéto využitie je zistenie vzťahu medzi distribúciou veľkosti častíc a obsahom montmorillonitu pre každý konkrétny typ bentonitu.

Hlavným cieľom tohto príspevku je charakterizácia veľkosti častíc frakcií bentonitu Stará Kremnička – Jelšový potok, ktoré sa získali sedimentačnou frakcionáciou jeho vodnej suspenzie. Získanie týchto charakteristík je hlavnou podmienkou pre zistenie vyššie uvedeného vzťahu medzi veľkosťou častíc a fyzikálno-chemickými vlastnosťami týchto látok. Tento príspevok tematicky nadväzuje na dve staršie práce [1, 2], v ktorých boli použité metódy analýzy z dnešného pohľadu už prekonané.

Materiál a metódy

Sedimentačnej analýze bol podrobený bentonit zo slovenskej lokality Stará Kremnička – Jelšový potok. Z tohto bentonitu boli odstránené častice s veľkosťou nad 2 mm. Jednotlivé frakcie boli získané tzv. dekantačnou metódou, pri ktorej sa z 5 % vodnej suspenzie bentonitu separuje jej vrchná časť. Sedimentačný čas bol vypočítaný z požadovaného Stokesovho rozmeru. Postupným odstraňovaním častíc so zmenšujúcou sa veľkosťou sa získali frakcie s definovaným horným a dolným Stokesovým rozmerom. Tieto frakcie boli charakterizované analýzou veľkosti častíc pomocou prístroja Mastersizer Hydro 2000S od firmy Malvern, ktorý pracuje na princípe vyhodnocovania parametrov rozptylu laserového lúča. Predkladaný príspevok je stručným výberom z veľkého súboru analýz rôznych zrnitostných frakcií bentonitu.

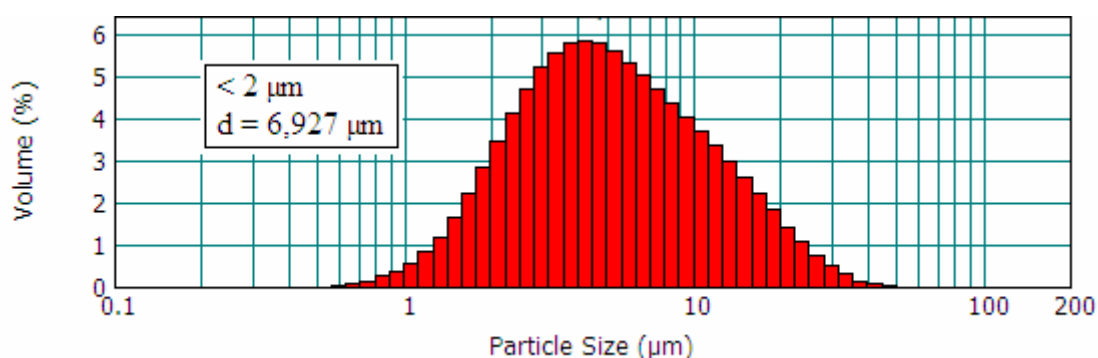
Výsledky a diskusia

Výsledky analýz distribúcie veľkosti častíc jednotlivých frakcií sú na obr. 1 – 7. Histogramy na obrázkoch ukazujú, že existuje viac alebo menej výrazný rozdiel medzi Stokesovým rozmerom častíc a veľkosťou získanou laserovým analyzátorom veľkosti častíc. Horná hranica veľkosti častíc je u všetkých vzoriek vyššia ako je Stokesov rozmer, pričom rozdiel medzi oboma hodnotami je výrazne vyšší u jemnozrnných frakcií bentonitu. S priemernou veľkosťou častíc sa tento rozdiel znižuje. V najjemnejšej frakcii je horná hranica veľkosti častíc viac ako dvadsať násobkom hodnoty vyplývajúcej zo sedimentačnej rýchlosti častíc. V dvoch frakciách s najväčšou priemernou veľkosťou častíc (60 – 80 μm a 80 – 100 μm) je hodnota Stokesovho rozmeru iba o 10 až 20 % nižšia.

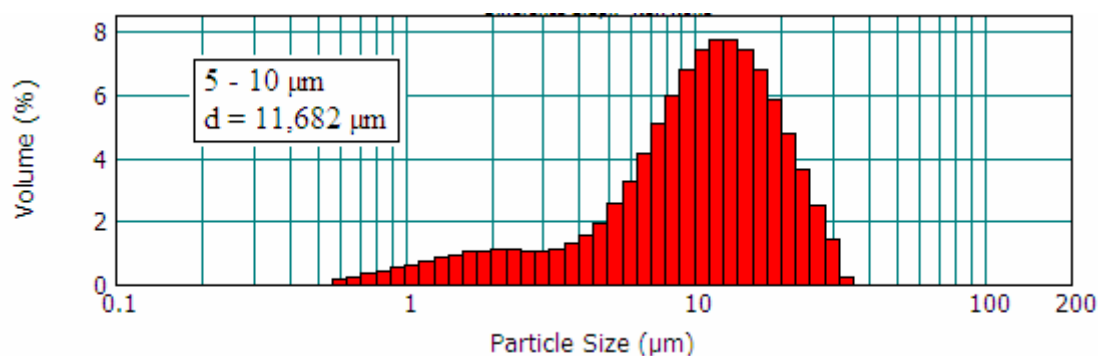
Pretože jemnozrnné frakcie bentonitu možno považovať takmer za monominerálne,

nemožno predpokladať, že na chybách výpočtu Stokesovho rozmeru sa významným spôsobom podieľa zmena hustoty častíc.

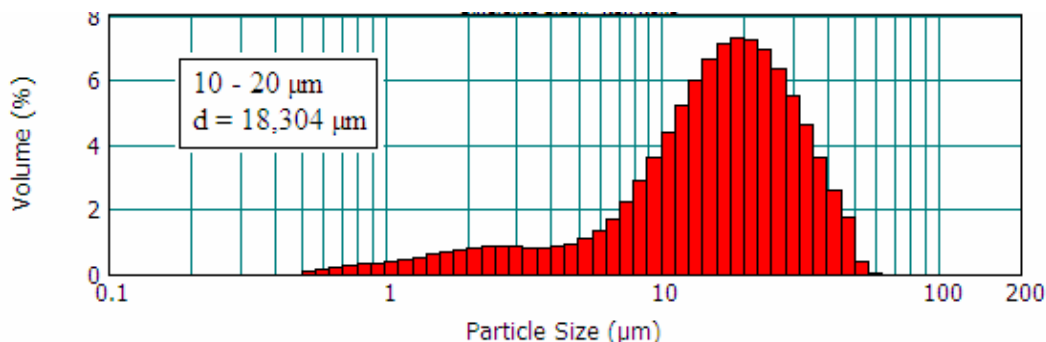
Výsledky analýz ukazujú, že získanie úzkych frakcií bentonitu (z pohľadu rozmerovej variability) je vo všeobecnosti ťažko prekonateľný problém. Súvisí to predovšetkým s ťažkosťami úplného odstránenia jednak najjemnejších a zároveň aj najväčších častíc. Najväčšie častice kontaminujú frakcie tak, že postupne sa uvoľňujú zo stien sedimentačnej nádoby a zároveň sa dostávajú do vyšších častí sedimentačnej nádoby konvexným prúdením kvapaliny. Napriek značne širokej distribúcii častíc vo všetkých izolovaných frakciách bentonitu, je v nich hmotnostné zastúpenie malých častíc mizivé. Taktiež toto zastúpenie veľkých častíc (na pravej strane distribučnej krivky) je nízke.



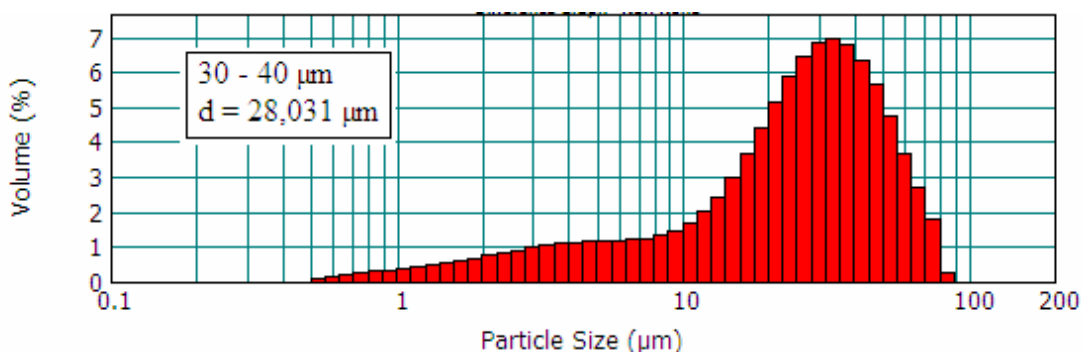
Obr. 1 Distribúcia veľkosti častíc vo frakcii bentonitu Stará Kremnička – Jelšový potok charakterizovanej horným Stokesovým rozmerom 2 µm.



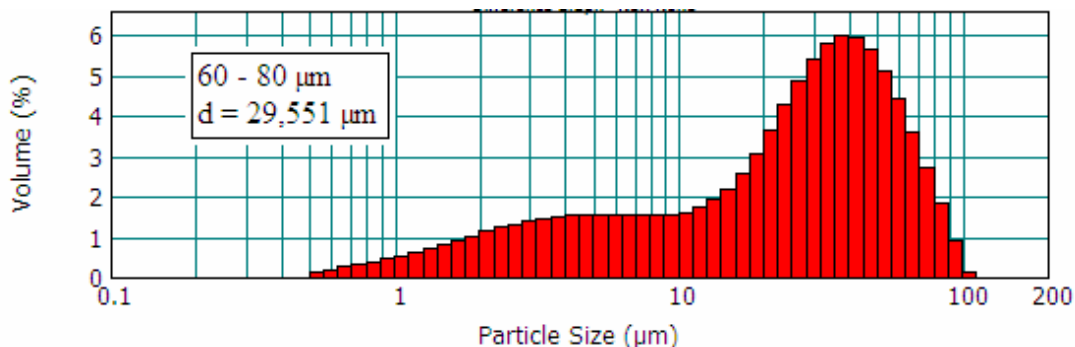
Obr. 2 Distribúcia veľkosti častíc vo frakcii bentonitu Stará Kremnička – Jelšový potok charakterizovanej spodným a horným Stokesovým rozmerom 5 µm a 10 µm.



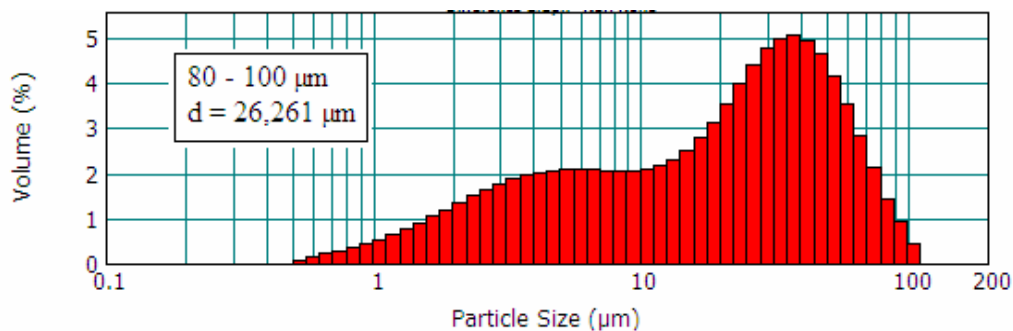
Obr. 3 Distribúcia veľkosti častíc vo frakcii bentonitu Stará Kremnička – Jelšový potok charakterizovanej spodným a horným Stokesovým rozmerom 10 µm a 20 µm.



Obr. 4 Distribúcia veľkosti častíc vo frakcii bentonitu Stará Kremnička – Jelšový potok charakterizovanej spodným a horným Stokesovým rozmerom 30 µm a 40 µm.



Obr. 5 Distribúcia veľkosti častíc vo frakcii bentonitu Stará Kremnička – Jelšový potok charakterizovanej spodným a horným Stokesovým rozmerom 60 µm a 80 µm.



Obr. 6 Distribúcia veľkosti častíc vo frakcii bentonitu Stará Kremnička – Jelšový potok charakterizovanej spodným a horným Stokesovým rozmerom 80 µm a 100 µm.

Size (μm)	Curr In %	Size (μm)	Curr In %	Size (μm)	Curr In %
0.502	0.07	5.024	2.09	50.238	4.16
0.564	0.15	5.637	2.09	56.368	3.54
0.632	0.22	6.325	2.08	63.246	2.84
0.710	0.29	7.096	2.07	70.963	2.13
0.796	0.36	7.962	2.05	79.621	1.45
0.893	0.44	8.934	2.05	89.337	0.92
1.002	0.53	10.024	2.09	100.237	0.42
1.125	0.64	11.247	2.16		
1.262	0.76	12.619	2.29		
1.416	0.89	14.159	2.50		
1.589	1.04	15.887	2.78		
1.783	1.20	17.825	3.14		
2.000	1.35	20.000	3.55		
2.244	1.50	22.440	3.99		
2.518	1.64	25.179	4.41		
2.825	1.76	28.251	4.77		
3.170	1.87	31.698	5.00		
3.557	1.95	35.566	5.08		
3.991	2.02	39.905	4.96		
4.477	2.06	44.774	4.65		
5.024		50.238			

Obr. 7. Kompletný záznam z analýzy veľkosti častíc frakcie bentonitu Stará Kremnička - Jelšový potok definovanej rozmedzím Stokesovho rozmeru častíc 80 až 100 μm , zistený pomocou prístroja Mastersizer Hydro 2000S od firmy Malvern. V ľavých stĺpcoch sú uvedené veľkosti častíc a v pravých stĺpcoch sú objemové zastúpenia častíc detegované v jednotlivých kanáloch pre príslušné rozsahy veľkosti častíc.

Záver

Snaha o sedimentačnú separáciu úzkych frakcií bentonitu má značné obmedzenia, avšak získané frakcie s vyššie uvedenými distribučnými krivkami, sú pravdepodobne maximum, ktoré možno pri využití tejto metódy dosiahnuť. Zároveň toto maximum je nedosiahnuteľné pri využití tzv. suchých separačných metód, ktoré sú základom väčšiny priemyselných technológií.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Jesenák K., Kuchta L., Guller L., Fúsková J. (1997) Mineralia Slovaca 29(6), p. 439
- [2] Jesenák, K. (2007) 9. Konferencie o speciálných anorganických pigmentech a práškových materiáloch 13. 10. 2007, Zrnitostná charakteristika bentonitových suspenzií vodných suspenzií partikulárnych anorganických látok, Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, ČR, p. 38

Syntéza, charakterizácia a fluorescenčné štúdie chemosenzora pre enzýmové stanovenia

Monika Kvaková¹, Michaela Gallee²

¹Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika;

²Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika;
kvakova.m@gmail.com

Abstrakt

Fluorescent chemosensors have multiple advantages including high sensitivity, low cost, ease of application, and versatility. There are known many chemosensors for cations, the spectrum of chemosensors for anions is much poorer. This work is focused on synthesis of 9,10-bis[(2,2-dipicolylamino)methyl]anthracene-zinc complex, its fluorescent properties and applications. Prepared chemosensor was tested in the presence of various molecules, which are common parts of the enzymatic reactions, together with various cations, anions or buffers. The detailed study of prepared chemosensor is oriented to the development of sensitive and fast method for determination of specific enzymes.

Kľúčové slová: chemosenzor; fluorescencia; enzýmový test

Úvod a formulácia cieľa

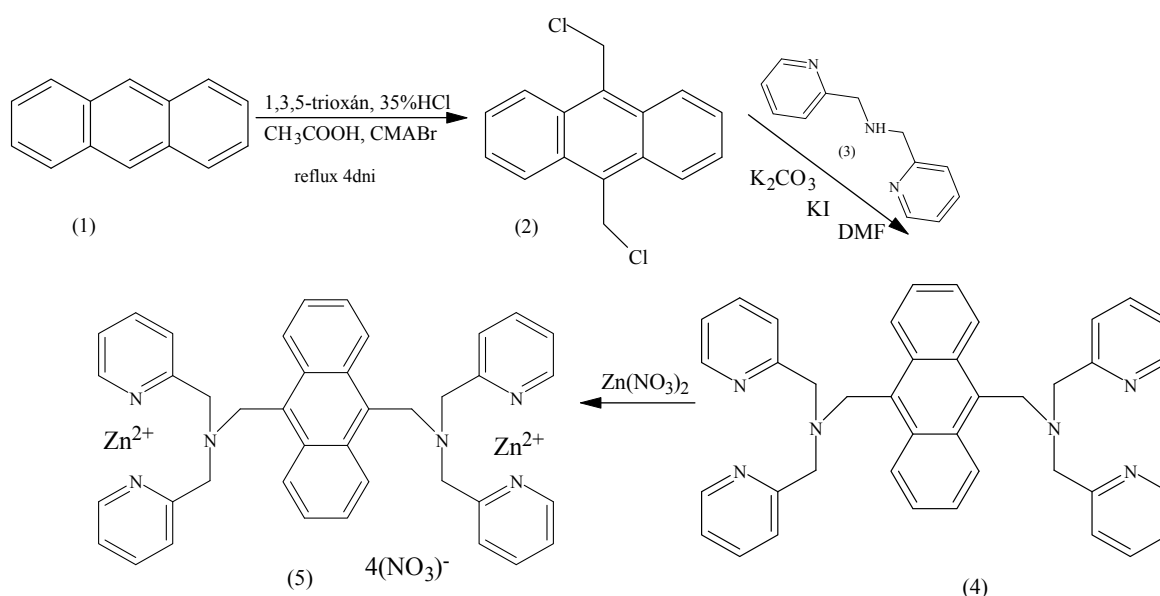
Dipikolylamín-zinočnaté chemosenzory sa využívajú na stanovenie fyziologicky dôležitých molekúl, nukleozidov (AMP, ADP, ATP a pod.) a fosforylovaných peptidov. Tieto molekuly vznikajú enzýmovými reakciami. Schopnosť dipikolylamín-zinočnatých chemosenzorov rozpoznať a viazať sa na tieto molekuly a súčasne emitovať signál ich predurčuje ako účinné chemosondy pre enzýmovú analýzu.

Cieľom našej práce bola syntéza známeho fluoreskujúceho chemosenzora, 9,10-bis[(2,2'-dipikolylamino)metyl]antracén-zinočnatého komplexu viacstupňovou syntézou. Podľa literatúry bol tento chemosenzor testovaný iba na ATP, pyrokatecholovú violet', ktoré pôsobilo ako zhášadlo chemosenzora, fosforylované proteíny a použitý ako senzor na stanovenie glykozyltransferázovej aktivity [1,2,3]. Rozhodli sme sa otestovať vplyv ďalších látok, ktoré sa bežne vyskytujú v reakčných zmesiach alebo v hrubých enzýmových preparátoch, na fluorescenciu chemosenzora.

Materiál a metódy

Bežné chemikálie a ostatné špeciálne boli od firiem Fluka, Aldrich, Merck, Sigma Aldrich, Merck, ICN Biomedicals čistoty p.a.

$^1\text{H-NMR}$ spektrá boli namerané v CDCl_3 na prístroji Varian VX UNITY (300 MHz/75 MHz), Varian VSNMR (600MHz/150 MHz). Ako štandard bol použitý Me_4Si (^1H). Elektrónové spektrá boli namerané na spektrofotometri UVline 9400 (Schott). Fluorescenčné spektrá voľného chemosenzora alebo viazaného v komplexoch boli namerané na spektrofluorimetri F-2000 Hitachi ($\lambda_{\text{ex}} = 380\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 400\text{-}600\text{nm}$), ďalej na Tecan Safire 2 Microplate Reader ($\lambda_{\text{ex}} = 380\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 410\text{-}476\text{nm}$) a na spektrofluorimetri FSP920, Edinburgh Instrument UK ($\lambda_{\text{ex}} = 380\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 400\text{-}550\text{nm}$). Fluorescenčný chemosenzor (**5**) sa syntetizoval viacstupňovou syntézou (Obr.1)

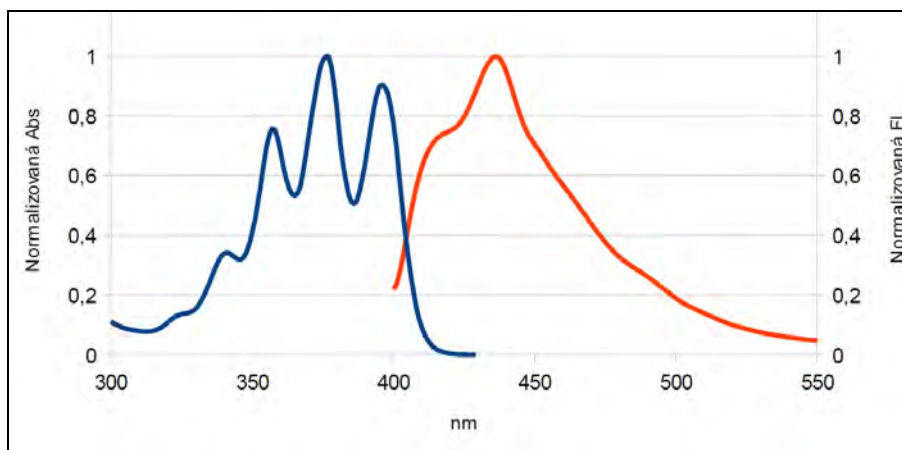


Obr.1 Syntéza fluorescenčného chemosenzora **5**

Príprava 9,10-bis(chlórmetyl)antracénu **2** chlórmetyláciou antracénu sa robila podľa modifikovaného postupu [4]. Ďalším stupňom syntézy bola nukleofilná substitúcia 9,10-bis(bróm/chlórmetyl)antracénu **2** s 2,2'-dipikolylamínom **3** za vytvorenia 9,10-bis[(2,2'-dipikolylamino)metyl]antracénu **4**. V konečnom kroku sa syntetizoval 9,10-bis[(2,2'-dipikolylamino)metyl]antracén-zinočnatý komplex **5**, reakciou 9,10-bis[(2,2'-dipikolylamino)metyl]antracénu **4** s $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ [5].

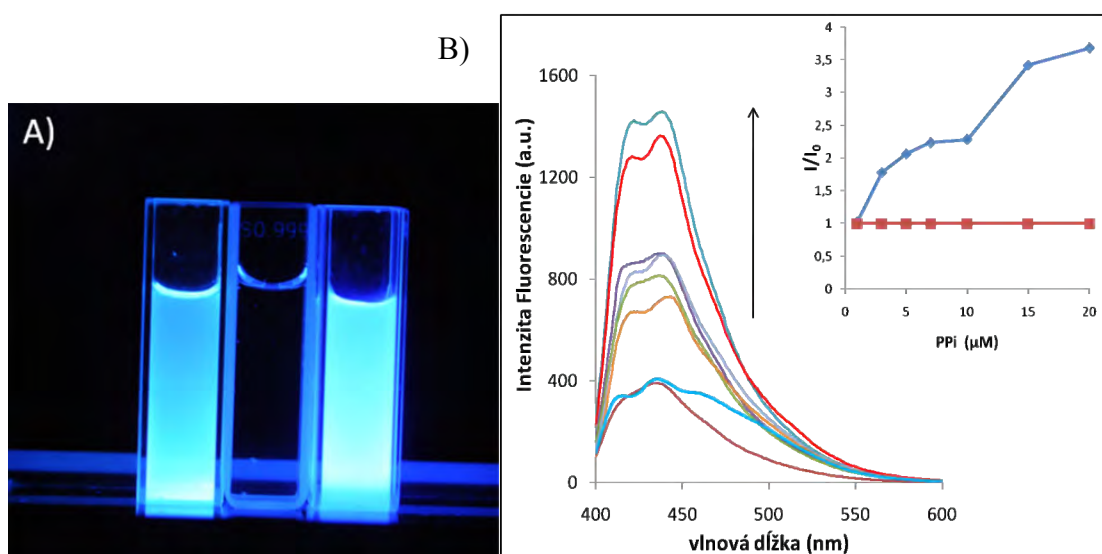
Výsledky a diskusia

Na fluorescenčné merania bol použitý pripravený chemosenzor **5**, čistota medziproduktov bola overená $^1\text{H-NMR}$ čistota zlúčeniny **4** pomocou LCMS-IT-TOF. Pripravený fluorescenčný chemosenzor **5** mal identické spektrálne vlastnosti (Obr.2) ako je uvedené v literatúre [3].



Obr.2 Elektronové spektrum a fluorescenčné emisné spektrum ($5\mu\text{M}$ chemosenzor vo vode; $\text{abs.max}=380\text{nm}$, $\lambda_{\text{ex}}=380\text{nm}$, $\text{fl.em.max}=434\text{nm}$).

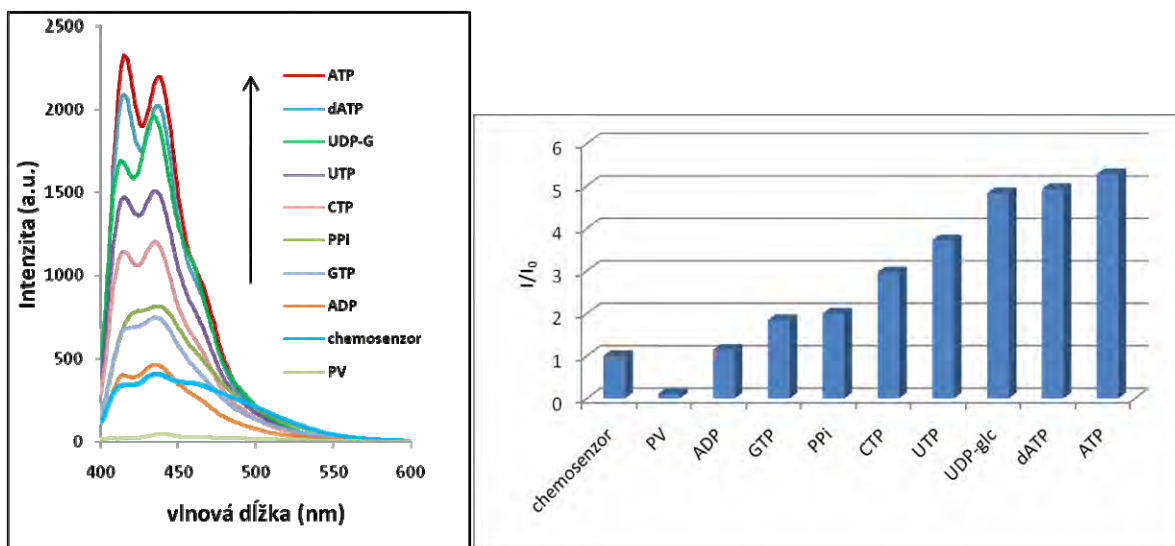
Po ožiarení UV lampou pri 366nm vo vode rozpustený chemosenzor **5** bol výrazne fluoreskujúci (Obr.3,A). Po pridaní malého množstva pyrofosfátu do kyvety s chemosenzorom sa fluorescencia ešte zvýšila. Z fluorescenčných meraní sme zistili, že intenzita fluorescencie chemosenzora vzrastá s koncentráciou anorganického pyrofosfátu (PPi) (Obr.3,B).



Obr.3 (A) Fotografia pod UV lampou pri 366nm - Na fotografii sú tri kyvety ožiarené UV lampou pri 366nm . V prvej kyvete je chemosenzor **5** rozpustený vo vode, v strednej sa nachádza iba voda a v poslednej je chemosenzor **5** po pridaní malého množstva pyrofosfátu.

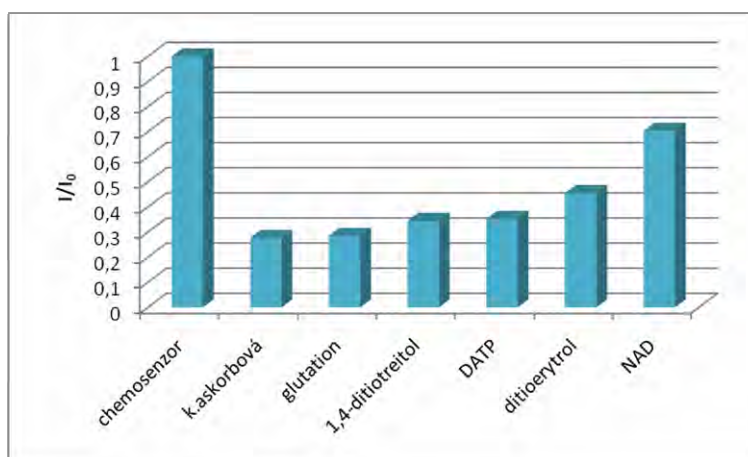
(B) Emisné fluorescenčné spektrum chemosenzora **5** [$5\mu\text{M}$] v prítomnosti pyrofosfátu (PPi): [PPi] $0, 5, 10, 15, 20\mu\text{M}$; $\lambda_{\text{ex}}=380\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=400\text{-}600\text{nm}$. (Vpravo hore) Fluorescenčná titračná krivka **5** (\square) po pridaní PPi (\diamond) ($\lambda_{\text{ex}}=380\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=434\text{nm}$).

Vplyv vybraných molekúl na zmenu intenzity fluorescencie je znázornený na obr.4, pri ekvimolárnej koncentrácii analytov a chemosenzora. Merania potvrdili zhášací účinok pyrokatecholovej violete, a výrazné až niekoľkonásobné zvýšenie intezity fluorescencie v prítomnosti ATP.



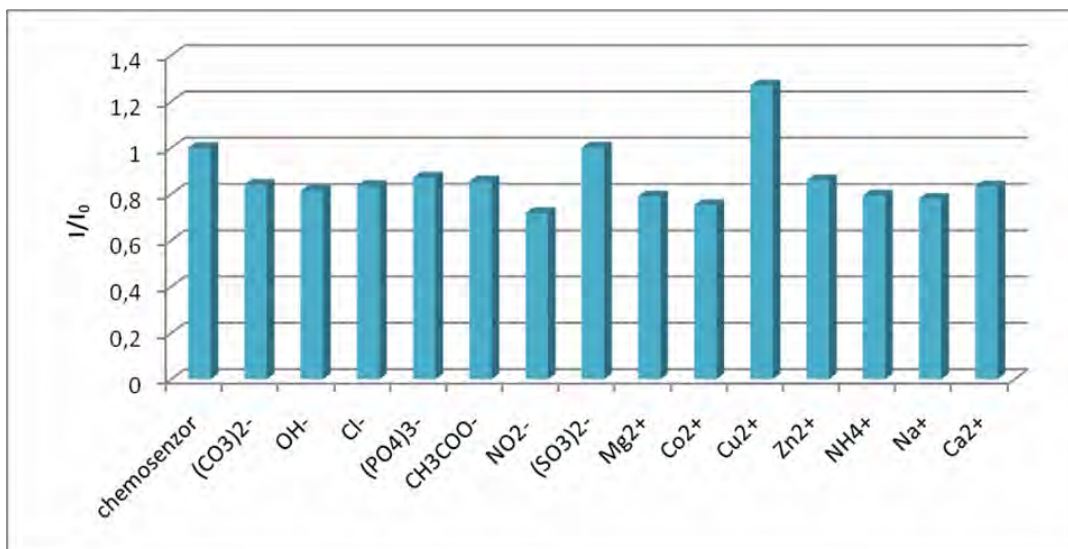
Obr.4 (Vľavo) Emisné fluorescenčné spektrum **5** [5 μM] v prítomnosti aditív [5 μM], 100mM HEPES (pH 7.3), $\lambda_{\text{ex}}=380\text{nm}$. (Vpravo) Porovnanie intenzity emisného žiarenia (I) chemosenzora **5** v prítomnosti aditív pri $\lambda_{\text{em}}=434\text{nm}$, s počiatočnou intenzitou bez pridaných aditív (I_0), $\lambda_{\text{ex}}=380\text{nm}$.

Zo zlúčenín, ktoré sa vyskytujú v enzýmových reakčných zmesiach, spôsobujú zníženie fluorescence chemosenzora [0.5 μM] nasledovné aditíva [1mM]: kyselina askorbová, redukovaný glutatión, 1,4-ditiotreitol, P¹,P⁴-di(adenozín-5'-)tetrafosfát (DATP), 1,4-ditiotreitol a NAD (Obr.5). Zhášací vplyv mohol byť spôsobený aj výrazným nadbytkom analytov oproti koncentrácii chemosenzora.



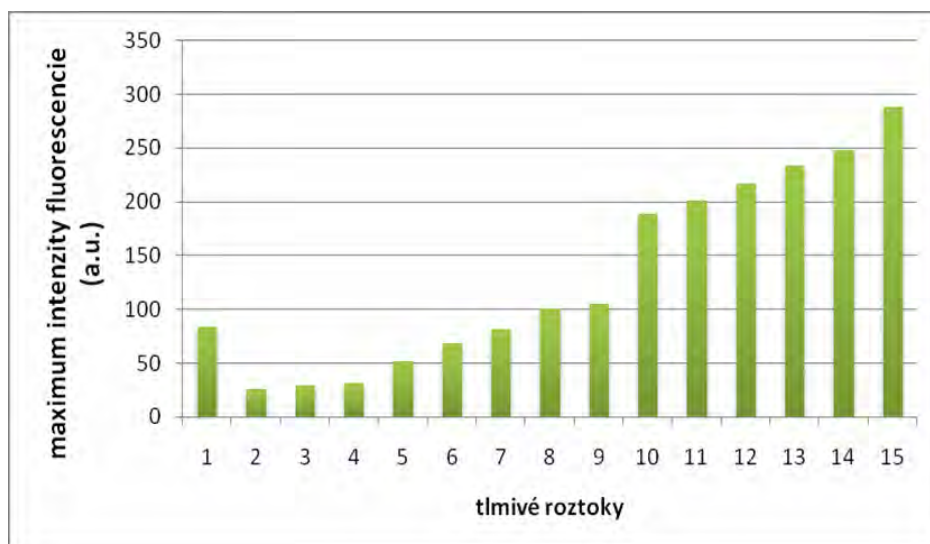
Obr.5 Porovnanie intenzity emisného žiarenia (I) chemosenzora **5** [1 μM] v prítomnosti aditív vybraných zlúčenín [1mM] s počiatočnou intenzitou bez pridaných aditív (I_0) ($\lambda_{\text{ex}}=380\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=434\text{nm}$).

Fluorescenčné merania chemosenzora **5** ukázali, že prítomnosť vybraných kationov, aniónov nemá žiadny vplyv na intenzitu fluorescence (Obr.6).



Obr.6 Porovnanie intenzity emisného žiarenia (I) chemosenzora **5** v prítomnosti vybraných aniónov a katiónov s počiatočnou intenzitou bez pridaných aditív (I_0) ($\lambda_{ex}=380nm$, $\lambda_{em}=434nm$).

Enzýmové reakcie prebiehajú v tlmivých roztokoch s určitým pH, preto sme testovali vplyv vybraných tlmivých roztokov na intenzitu fluorescence chemosenzora (Obr.7). Z nameraných hodnôt vyplýva, že tlmivé roztoky na báze Tris-HCl znižujú fluorescenciu, zatiaľ čo fosfátové tlmivé roztoky zvyšovali fluorescenciu. Ako najvhodnejší roztok sa ukázal HEPES (pH 7.3). Intenzita fluorescence chemosenzora **5** nie je ovplyvnená úmerne vzhľadom k pH roztoku, zmeny sú špecifické pre zloženie konkrétnych tlmivých roztokov.



Obr.7 Vplyv tlmivých roztokov [10 mM] na emisné fluorescenčné spektrá chemosenzora [1 μ M] ($\lambda_{em}=434nm$), kde **1**= chemosenzor **5**, **2-4**= tris-HCl (pH 7, 8, 7.5), **5**= borátový tlmivý roztok (pH 7.7), **6**=Tris-HCl (pH 9.5), **7-8**=HEPES (pH 7.3, 7.7), **9-15**=fosfátový tl.roztok (pH 7.2, 6.8,7.4, 7, 7.8, 8, 7.6).

Záver

Z fluorescenčných meraní sme zistili, že pripravený chemosenzor **5** v prítomnosti fosforylovaných molekúl zvyšuje intenzitu fluorescence, zatiaľ čo niektoré biologicky významné molekuly pôsobia ako zhášadlá. Prítomnosť katiónov (Mg^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , NH_4^+ , Na^+ , Ca^{2+}) a aniónov ($(\text{CO}_3)_2^-$, OH^- , Cl^- , $(\text{PO}_4)_3^-$, CH_3COO^- , NO_2^- , $(\text{SO}_3)^{2-}$) neovplyvňuje fluorescenciu chemosenzora **5**. Ako optimálny tlmivý roztok, ktorý nemal vplyv na emisné spektrum chemosenzora, sa ukázal HEPES (pH 7.3). Výsledky z meraní fluorescenčného chemosenzora **5** ukazujú na široké možnosti aplikácie v rozpoznávaní fyziologicky významných fosforylovaných molekúl. Podrobné štúdium pripraveného chemosenzora možno aplikovať pri vývoji citlivej a rýchlej metódy stanovenia enzýmov, pre ktoré sú fosforylované molekuly výsledkom katalyzovanej reakcie.

Pod'akovanie

Práca bola realizovaná na katedre organickej chémie PriF UK vďaka podpore grantovej agentúry VEGA z grantu VEGA 1/0962/12 (zodp. riešiteľ P. Koiš). Ďakujem RNDr. Marekovi Cigáňovi, PhD z chemického ústavu PriF UK a RNDr. Tomášovi Szemešovi, PhD z katedry molekulárnej biológie PriF UK za pomoc a diskusiu k fluorescenčným meraniam.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Jang H.H., Yi S., Kim M.H., Kim S., Lee H.N., Han M.S. (2009) Tetrahedron Lett. 50, p.6241
- [2] Mito-oka Y., Tsukiji S., Hiraoka T., Kasagi N., Shinkaia S., Hamachi I. (2001) Tetrahedron Lett. 42, p.7059
- [3] Wongkongkatep J., Miyahara Y., Ojida A., Hamachi I. (2006) Angew. Chem. Int. Ed.45, p.665
- [4] Altava, B., Burguete, M.,I., Escuder, B.,Luis, S.,V. (1997) Tetrahedron 53, p.2629
- [5] Ojida A., Mito-oka Y., Inoue M., Hamachi I. (2002) JACS 124, p.6256

Nová fotokatalytická alkyltiolácia arómátov

Michal Májek, Axel Jacobi von Wangelin

Universität Regensburg, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Institut für Organische Chemie,
Universitätsstrasse 31, 93053 Regensburg, SRN; majek.miso@gmail.com

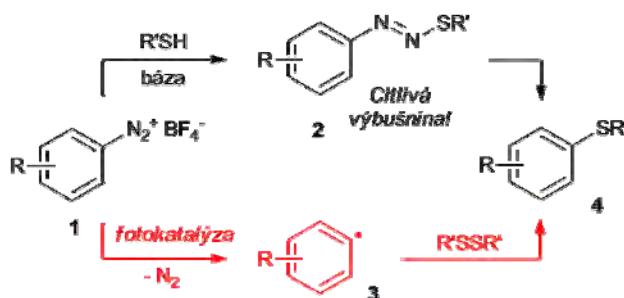
Abstrakt

We have developed a new method for introduction of RS- moiety on the aromatic systems. Method is based on the reaction of disulfides with aryl radical, which is generated from diazonium salts. Until now, transformation of diazo group to sulfide group was performed by reactions, that rely on dangerous intermediates or give mediocre yields. Our method relies on the use of photoredox catalysis, allowing very mild reaction conditions. A number of functional groups is tolerated by the reaction conditions, and as the photocatalyst, cheap and nontoxic organic dye is used.

KLúčové slová: fotokatalýza; diazóniová soľ; disulfid; sulfid; eozín Y

Úvod a formulácia cieľa

Jedným z cieľov dnešnej organickej chémie je vývoj metód, ktoré by boli šetrnejšie k životnému prostrediu – nepotrebovali by zložité substráty, vysokú aktivačnú energiu a negenerovali by veľa odpadu. Väčšina reakcií, ktoré dnes používame pracuje s iónovými intermediátmi. Takéto intermediáty však bohužiaľ často vyžadujú energetické a nestabilné prekurzory. Radikálové reakcie zasa obvykle vyžadujú vysoký energetický vstup na aktiváciu. Jedno z riešení tejto dilemy bol vstup paládiovej katalýzy na pole organickej syntézy. Nevýhodou tohto prístupu je drahý a potenciálne toxický katalyzátor a ligandy. Fotokatalýza predstavuje alternatívu k takýmto dnes používaným prístupom.



Obr. 1 Transformácia aromatických diazóniových solí na sulfidy

Arylsulfidy predstavujú významnú skupinu prekurzorov pre syntézu API, gumárenských chemikálií a chemických špecialít. Tradičnou metódou pre syntézu aryl sulfidov **4** je reakcia tiolu s diazóniovými soľami **1** v neutrálnych až bázických podmienkach. Nevýhodou takéhoto postupu je to, že ako medziprodukt vzniká diazosulfid **2**, ktorý je

výbušný aj vo vlhkom stave. Už niekoľko publikácií upozornilo na toto nebezpečie po katastrofálnych výbuchoch vo výskumných laboratóriách [1]. Rozhodli sme sa vyvinúť metódu, ktorá by umožňovala pri syntéze využitie ľahko dostupných diazóniových solí a zároveň by pri nej ako medziprodukt nevznikala nestabilná látka **2**.

V posledných rokoch došlo k búrlivému rozvoju fotoredoxnej katalýzy [2]. Fotoredoxná katalýza umožňuje využitie svetelnej energie na aktiváciu väzieb v chemických reakciách – čím predstavuje krok k udržateľnej a ekologickej syntéze. Pomocou viditeľného svetla takto možno generovať radikály. Práce v tejto oblasti sa najprv koncentrovali na generáciu radikálov zo stabilizovaných substrátov – ako α -halo ketóny a benzylamíny [3]. Snahou je, aby bolo možné využiť aj menej aktivované substráty obsahujúce Ar-X väzbu. Skupina B. Königa vyvinula metódu, ktorá fotokatalyticky generuje arylové radikály, ktoré potom reagujú s π -elektrónovými donormi [4]. Využitie σ -donorov bolo zatiaľ limitované na jednu prácu, ktorá úspešne využila fotokatalýzu na konštrukciu väzby Ar-B [5].

Naším cieľom bolo využitie fotokatalyticky generovaných arylových radikálov pre vznik väzby Ar-S využitím ľahko dostupných sírnych σ -elektrónových donorov – disulfidov.

Materiál a metódy

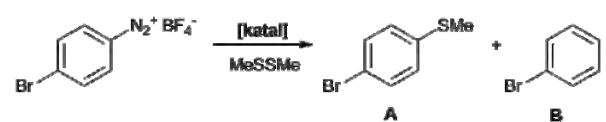
Komerčne dostupné chemikálie a rozpúšťadlá od fyriem Sigma-Aldrich a Fisher boli použité bez ďalšieho čistenia. Vo väčšine prípadov slúžilo ako rozpúšťadlo suché DMSO sušené nad molekulovými sitami (obsah vody <0.005%, Sigma-Aldrich). Na TLC boli použité komerčne dostupné platne (DC60 F254, Merck), platne boli vizualizované pomocou UV. Syntetizované látky boli čistené chromatografiou na silikagéli (Acros Organics, Mesh 35 -70). Čistota látok bola stanovená pomocou ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{19}F NMR (Bruker Avance 400) a GC-MS (EI, Agilent, 6890E). Ako zdroj viditeľného žiarenia slúžili LED diódy (Lumitronix, Cree-XP E, $\lambda_{\text{max}} = 525 \text{ nm}$, $P = 3.8 \text{ W}$).

Výsledky a diskusia

Počiatkové experimenty ukázali, že navrhovaná reakcia je skutočne možná - *p*-brómfenyl diazóniová soľ poskytla reakciou s dimetyl disulfidom (DMDS) očakávaný produkt - *p*-brómtioanizol, keď sme zmes ožarovali zeleným svetlom a použili eozín Y (Obrázok 1) ako fotokatalyzátor. Pre daný substrát sme optimalizovali reakčné podmienky (Tabuľka 1). Pri danom výkone svetelného zdroja nebol substrát doreagovaný po dvoch hodinách (Tabuľka 1, exp. 1), zvýšenie reakčného času na 12 h prinieslo zvýšenie výťažku

(Tabuľka 1, exp. 2). Ďalšie predĺženie reakčnej doby už nevedlo k zmene výťažku (Tabuľka 1, exp. 3). Zmena rozpúšťadla z DMSO na N-metylpyrolidón, alebo acetonitril (Tabuľka 1, exp. 4,5), vedie k zníženiu výťažku, pravdepodobne preto, lebo rozpúšťadlá reagujú s intermediárnymi radikálmi. Keď sme použili ako rozpúšťadlo DMF, pozorovali sme čiastočnú hydrodediazotáciu (Tabuľka 1, exp. 6). V prípade, že sme do reakčnej zmesi nepridali žiaden disulfid, DMF bolo schopné hydrodediazotovať substrát v 81% výťažku (Tabuľka 1, exp 6). Toto je konzistentné s doteraz publikovanými prácami, kde v redukčnom prostredí (napr. Fe^{II} soli) DMF efektívne hydrodediazotovalo podobné substráty [6]. Pozorovaný jav vysvetľuje znížené výťažky, ktoré pozoroval Hari *et. al.* pri predchádzajúcich prácach s π -donormi [4]. Použitie iných fotokatalyzátorov ako eozínu Y viedlo k zníženiu výťažku (Tabuľka 1, exp. 8,9,10). Optimalizovali sme nadbytok DMDS voči diazóniovej soli, ako aj množstvo katalyzátora (Tabuľka 1, exp. 11-14) a našli sme optimálne podmienky (Tabuľka 1, exp. 13).

Tab. 1 Optimalizácia reakčných podmienok.



Exp.	Rozpúšťadlo	Katalyzátor (mol%)	Ekv. DMDS	A / B [%]
1 ^a	DMSO	Eozín Y (5)	5	49 / -
2	DMSO	Eozín Y (5)	5	73 / -
3 ^b	DMSO	Eozín Y (5)	5	71 / -
4	NMP	Eozín Y (5)	5	29 / -
5 ^c	MeCN	Eozín Y (5)	5	65 / -
6	DMF	Eozín Y (5)	5	25 / 27
7	DMF	Eozín Y (5)	0	- / 81
8	DMSO	Fluoresceín (5)	5	25 / -
9	DMSO	N. červeň (5)	5	29 / -
10	DMSO	Ru(bpy) ₃ Cl ₂ (5)	5	69 / -
11	DMSO	Eozín Y (2)	5	72 / -
12	DMSO	Eozín Y (1)	5	63 / -
13	DMSO	Eozín Y (2)	1.5	72 / -
14	DMSO	Eozín Y (2)	1	42 / -
15 ^d	DMSO	-	1.5	- / -
16	DMSO	-	1.5	3 / -
17 ^d	DMSO	Eozín Y (2)	1.5	4 / -

Štandardné reakčné podmienky: 0.5 mmol *p*-brómbenzén diazónium tetrafluóborátu, 0.025 mmol eozínu Y, 2.5 mmol dimetyldisulfidu (DMDS), 2 mL rozpúšťadla, 12 h ožarovania zeleným LED ($\lambda = 525$ nm, 3.8 W); ^a reakč. čas = 2 h; ^b reakč. čas. = 24 h; ^c 7 mL rozpúšťadla; ^d reakcia bez svetelného žiarenia.

Aby sme dokázali, že naša reakcia je skutočne aktivovaná svetelným žiarením, vykonali sme aj slepé pokusy: bez svetelného žiarenia reakcia neprebiehala, a to bez fotokatalyzátora (Tabuľka 1, exp. 15) ani v jeho prítomnosti (Tabuľka 1, exp. 17). Svetelné žiarenie neiniciovalo reakciu bez prídavku fotokatalyzátora (Tabuľka 1, exp. 16). V druhom kroku sme (za optimalizovaných podmienok) overili toleranciu nami vyvinutej metódy voči rôznym funkčným skupinám (Tabuľka 2)

Tab. 2 Screening substrátov



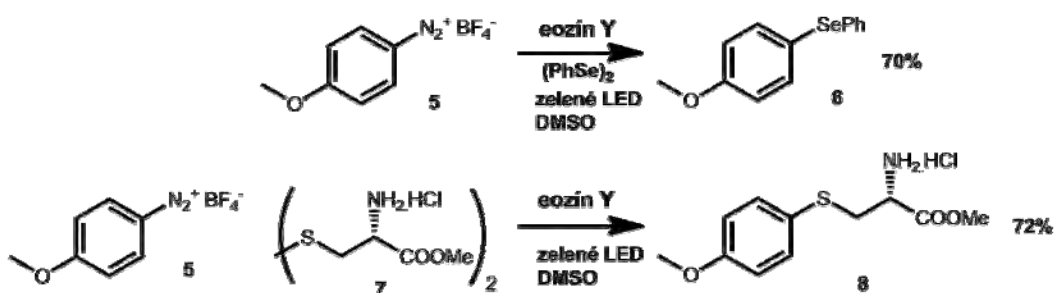
Exp.	R	Produkt	Výt'azok [%]	Exp.	R	Produkt	Výt'azok [%]
4A	<i>m</i> -Cl		89	4J	<i>o</i> -CO ₂ Me		77
4B	<i>p</i> -Cl		85	4K	<i>p</i> -CF ₃		67
4C	<i>p</i> -Br		73	4L	<i>o</i> -CF ₃		58
4D	<i>p</i> -F		59	4M	<i>m</i> -NO ₂		60
4E	<i>p</i> -I		51	4N	<i>o</i> -NO ₂		48
4F	<i>p</i> -OMe		81	4O	<i>p</i> -NO ₂		35
4G	<i>p</i> -OH		57	4P	H		61
4H	<i>o</i> -Me		80	4Q ^a	α -naftyl		21
4I	<i>p</i> -Me		71				

^a bolo izolované aj 11% 1,4-di(metylsulfanyl)naftalénu

Zatiaľ čo chlór a bróm boli dobre tolerované (**4A**, **4B**, **4C**), jódovaný substrát podliehal v reakčných podmienkach rozkladu (**4E**). Tento fakt sa dá vysvetliť nízkou stabilitou jódovaných látok v prítomnosti radikálov. Elektrón donorné skupiny vo všeobecnosti poskytovali vysoké výt'azky (**4F**, **4G**, **4H**, **4I**). Toto súhlasí s ich stabilizujúcim efektom na intermediárny radikál. Elektrón deficitné skupiny obvykle znižovali výt'azok reakcie (**4J**, **4K**, **4L**, **4M**, **4N**, **4O**), opäť v súhlase s vplyvom na stabilitu radikálového medziproduktu. Naftalénové jadro podliehalo dvojnásobnej substitúcii (**4Q**).

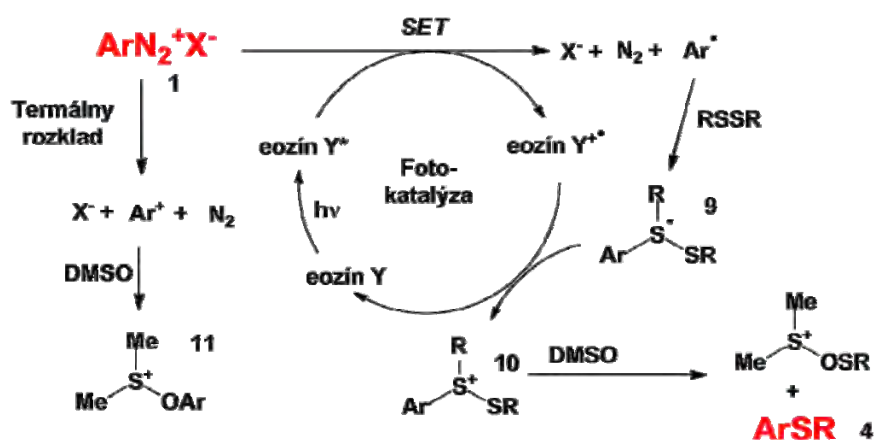
Pravdepodobným dôvodom je, že jeden z elektrón deficitných sírných intermediátov atakuje slabo aromatické, tiolom aktivované jadro.

Pokúsili sme sa dokázať použiteľnosť metódy aj pre derivatizáciu iných, synteticky zaujímavých látok. Za cieľ sme si zvolili iný dichalkogenid a biologicky relevantnú zlúčeninu. Keď sme namiesto dimetyl disulfidu použili difenyl diselenid, pri použití štandardných reakčných podmienok sme dostali očakávaný difenylselenid **6**. Keď sme použili ester cystínu **7**, ktorý mal deaktivované amino skupiny (ako HCl soľ), izolovali sme hladko derivatizovaný cystín **8**.



Obr. 2 Vybrané reakcie

Navrhovaný reakčný mechanizmus (Obrázok 3) vychádza z diazóniovej soli **1**, ktorá prijme elektrón od excitovaného fotokatalyzátora. Vzniká arylový radikál, ktorý reaguje s disulfidom za vzniku radikálového intermediátu **9**. Ten reduktívne regeneruje fotokatalyzátor za vzniku kationu **10**. Rozpúšťadlo nakoniec odštiepi SR skupinu a vzniká žiadaný produkt – arylsulfid **4**. Tejto produktívnej reakčnej ceste konkuruje termálny rozklad, ktorým vzniká arylový kation. DMSO reaguje s kationom za vzniku produktu **11**.



Obr. 3 Návrh mechanizmu tiolačnej reakcie.

Záver

Vyvinuli sme novú metódu pre fotokatalytickú alkyltoláciu aromatických diazóniových solí. Pokiaľ vieme, toto je prvá zmienka o fotokatalytickom procese, ktorý by umožňoval zavedenie sírnej skupiny na aromatické jadro. Nami prezentovaná metodika je bezpečnejšia ako doteraz známe alternatívy, nepoužíva ako katalyzátor žiaden kov a na aktiváciu väzieb používa obnoviteľný zdroj – slnečné žiarenie. Optimalizovali sme reakčné podmienky. Reakcia toleruje funkčné skupiny už prítomné v molekule, pričom obzvlášť zaujímavé je, že prebieha aj v prítomnosti voľných amino skupín v substráte. V budúcnosti sa pokúsime túto metodiku ďalej rozvíjať, napríklad v oblasti domino reakcií.

PodĎakovanie

Za financovanie projektu by som chcel poďakovať grantovej agentúre DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft), ktorej projekt GRK 1626 (Chemical Photocatalysis) umožnil vznik prezentovaných výsledkov.

Zoznam použitej literatúry

- [1] a) Laquidara J., (2001) Chem. Eng. News 79, p. 6; b) Spencer H., (1977) Chem. Brit. 13, p. 240.
- [2] a) Xuan J., Xiao W.-J., (2012) Angew. Chem. Int. Ed. 51, p. 6828; b) Teplý F., (2011) Collect. Czech. Chem. Commun. 76, p. 859; c) Zeitler K., (2009) Angew. Chem. Int. Ed. 48, p. 9785.
- [3] a) Neumann M., Fuedner S., König B., Zeitler K., (2011) Angew. Chem. Int. Ed. 50, p. 951; b) Condie A. G., González-Gómez J. C., Stephenson C. R. J., (2010) J. Am. Chem. Soc. 132, p. 1464.
- [4] a) Hari D. P., Schroll P., König B., (2012) J. Am. Chem. Soc. 134, p. 2958; b) Hari D. P., Hering T., König B., (2012) Org. Lett. 14, p. 5334.
- [5] Yu J., Zhang L., Yan G., (2012) Adv. Synth. Catal. 354, p. 2625.
- [6] Wassmundt F. W., Kiesman W. F., (1995) J. Org. Chem. 60, p. 1713.

Neočakávaná reakcia pri syntéze izochinolinónov: mechanistická štúdia

Michal Májek^a, Pavel Kočovský^b

^aUniversität Regensburg, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Institut für Organische Chemie, Universitätsstrasse 31, 93053 Regensburg, SRN; ^bSchool of Chemistry, University of Glasgow, G12 8QQ, UK; majek.miso@gmail.com

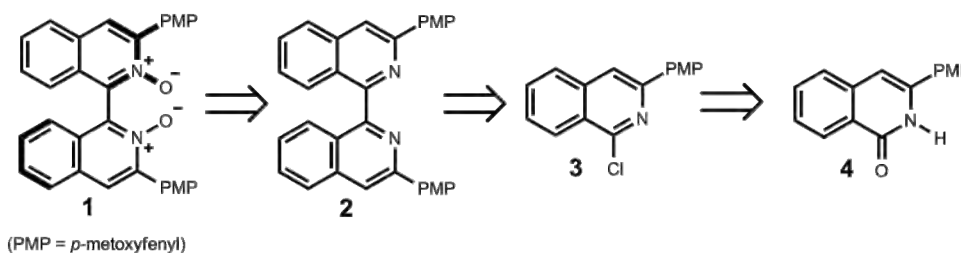
Abstrakt

Reaction of aromatic nitriles with *o*-methylbenzamides is one of the most important synthetic pathways that lead to isoquinolinones. When we tried to employ this reaction during a synthesis of an organocatalyst, we observed unanticipated products. We have performed optimization of this new reaction, and we were able to change the selectivity by factor of more than 100 by a mere change of workup conditions. Successful mechanistic study accompanied with quantum-chemical computations was done in order to rationalize different selectivity of the reaction.

KLúčové slová: izochinolinón, mechanistická štúdia, aminál

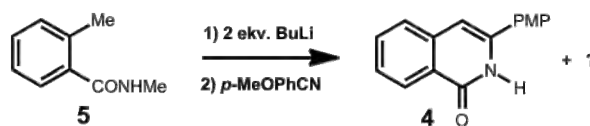
Úvod a formulácia cieľa

Skupina Pavla Kočovského sa zaoberá vývojom organokatalyzátorov – chirálnych Lewisových báz, ktoré môžu slúžiť ako enantioselektívne katalyzátory v reakciách ako je alylácia aldehydov, alebo redukcia imínov [1]. Katalyzátory na báze axiálne chirálnych bisizochinolín N-oxidov sa obzvlášť osvedčili, poskytujúc vysoké enantioselektívne nadbytky pri alylačnej reakcii. Nevýhodou doteraz známych katalyzátorov bola buď ich zložitá syntéza, alebo zložité delenie racemického katalyzátoru na enantioméry.



Obr. 1 Retrosyntéza organokatalyzátoru 1

Rozhodli sme sa preto syntetizovať katalyzátor 1: zatiaľ čo syntéza racemátu (\pm) 1 je pomerne jednoduchá (obr. 1), polárne PMP (*p*-metoxyfenyl) skupiny by mohli interagovať s chirálnym binolom, čím by umožnili jednoduché delenie racemátu 1 vo forme kokryštálov s enantiomérom čistým binolom. Predpokladali sme, že bis N-oxid 1 získame oxidáciou bisizochinolínu 2. Ten možno pripraviť homohaplingom z chlórderivátu 3. Najjednoduchšou cestou, ako získať derivát 3 je dehydratívna chlorácia izochinolinónu 4.



Obr. 2 Heterocyklizačná reakcia

Izochinolinóny patria k významnej skupine látok, ktorá slúži ako prekursor pre API, izochinolinónové jadro predstavuje základ niektorých alkaloidov. Jednoduchý prístup k izochinolinónovému jadru umožňuje reakcia N-alkyl *o*-metylbenzamidov s nitrilmi za pôsobenia silnej bázy [2]. Vďaka nízkej cene prekursorov sú variácie na túto reakciu častým cieľom patentového chránenia v oblasti syntézy liečiv [3]. Keď sme sa pokúsili zopakovať túto reakciu s *p*-metoxybenzonitrilom, naše výsledky boli významne odlišné od popísaných v literatúre [3c]. Okrem očakávaného produktu **4** sme izolovali aj neznámu látku, ktorá doteraz v literatúre nebola popísaná.

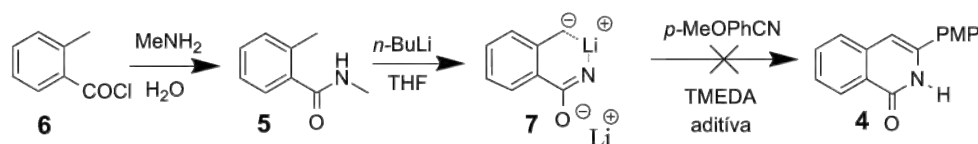
Rozhodli sme sa vyriešiť štruktúru tejto neznámej látky. Ďalej sme sa rozhodli vysvetliť jej vznik pomocou mechanistickej štúdie a optimalizovať reakčné podmienky tejto reakcie, aby sme vedeli selektívne syntetizovať látku **4**.

Materiál a metódy

NMR spektrá boli merané na spektrometri Bruker Avance 400 (^1H pri 400.2 MHz a ^{13}C pri 100.6 MHz), rozpúšťadlo bolo CDCl_3 . Rozpúšťadlá boli pred použitím čistené nasledovne: dietyléter a tetrahydrofurán boli destilované pred použitím z lítiumalumíniumhydridu, toluén bol sušený nad sodíkovým drôtom; bezvodý metanol, dimetylformamid a dimetylsulfoxid boli zakúpené od fy. Aldrich a použité bez ďalšieho čistenia; dichlórmetán, chloroform a acetonitril boli pred použitím čerstvo destilované z hydridu sodného. Identita pripravených látok bola potvrdená pomocou viacrozmerných NMR techník, IČ spektier, MS spektier a röntgenoštruktúrnej analýzy.

Výsledky a diskusia

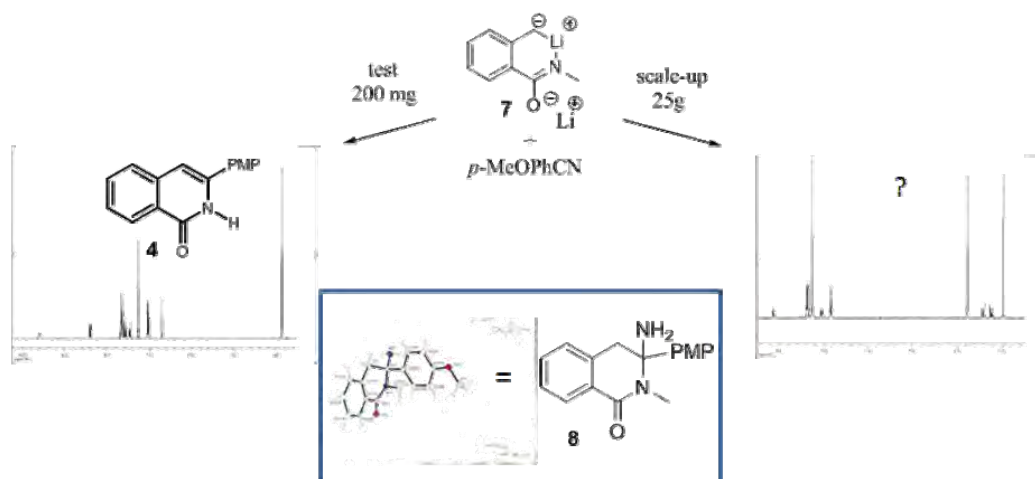
N-metyl *o*-metylbenzamid **5** sme syntetizovali z komerčne dostupného *o*-toulchlchloridu **6** a metylamínu. Prvé pokusy opakovať heterocyklizačný postup popísaný v literatúre [3c] viedli k úplnému nezdaru. Nedošlo k žiadnej konverzii východiskovej látky **5**. Neskôr sa ukázalo, že tomu tak bolo vďaka nevyhovujúcej kvalite THF, ktoré bolo sušené na SPS (solvent purification system). Obsah vody (stanovený titráciou podľa Karla Fishera) presahoval garantovanú hranicu SPS systému o niekoľko rádov.



Obr. 3 Pokus o zvýšenie nukleofilicity 7

Keďže sme sa domnievali, že problémom je aj nízka nukleofilicita lítnej soli, rozhodli sme sa pridať do zmesi TMEDA. Neizolovali sme ale žiaden produkt **4** a to ani potom, čo sme pridalí aditíva ako HMPA a DMPU. Napriek tomu, že reakčná doba bola viac ako 1 deň pri 25 °C, v zmesi sa nenachádzali ani stopy **4**, avšak preukázateľne obsahovala nezreagovaný organolítntny intermediát **7**. Po 10 hodinách varu **7** v THF/TMEDA sme izolovali len stopy produktu **4**, pričom zmes stále obsahovala lítnu soľ **7**. Ukazuje sa, že lítium je v intermediáte **7** komplexované ešte silnejšie než pomocou TMEDA – takže prídavok amínu vedie len k ďalšej komplexácii kationu Li^+ , čím sa úplne znemožní prístup elektrofilu k záporne nabitému uhlíku.

Bez prídavku TMEDA prebehla reakcia úspešne v malej škále – 200 mg. Keď sme sa pokúsili o scale-up o dva rády (25 g amidu **5**), získali sme veľké množstvo bielych kryštálov, ktoré však podľa NMR a MS neboli očakávaný produkt **4**. Vyriešiť štruktúru tejto neznámej látky sme dokázali až pomocou röntgenoštruktúrnej analýzy. Jednalo sa o dovtedy nepopísanú zlúčeninu **8**. Pokúsili sme sa vysvetliť, ako je možné že pri rovnakých reakčných podmienkach vznikla pri scale-upe ku zmene produktu.

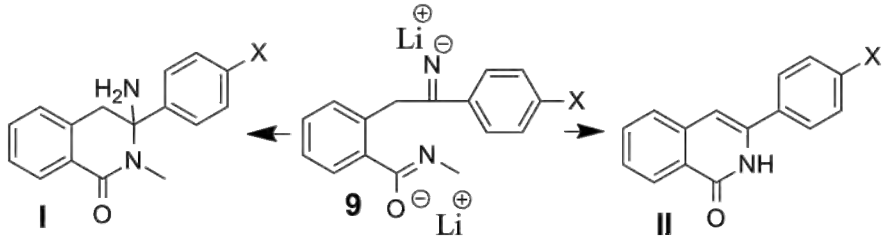


Obr. 3 Zmena selektivity pri scale-upe reakcie

Po rigoróznom preskúmaní reakčných podmienok sme zistili, že selektivita reakcie je určená až posledným krokom – vodným spracovaním reakcie. Ak je po ukončení reakcie pomaly prikvapkaná voda do reakčnej zmesi v aprotickom rozpúšťadle, získame primárne

produkt **4**. Naopak, ak sa reakčná zmes v aprotickom rozpúšťadle pomaly prikvapká do vody, získame primárne produkt **8**.

Tab. 1 Screening nitrilov.



Východiskový nitril (X)	Spracovanie ^a	Typ I	Typ II	I/II
Benzonitril (X=H)	A	8%	65%	0.12
Benzonitril (X=H)	B	73%	4%	18.5
<i>p</i> -metoxybenzonitril (X=OMe)	A	5%	40%	0.13
<i>p</i> -metoxybenzonitril (X=OMe)	B	41%	2%	20.0
<i>p</i> -trifluórmetylbenzonitril (X=CF ₃)	A	4%	33%	0.12
<i>p</i> -trifluórmetylbenzonitril (X=CF ₃)	B	35%	2%	16.5

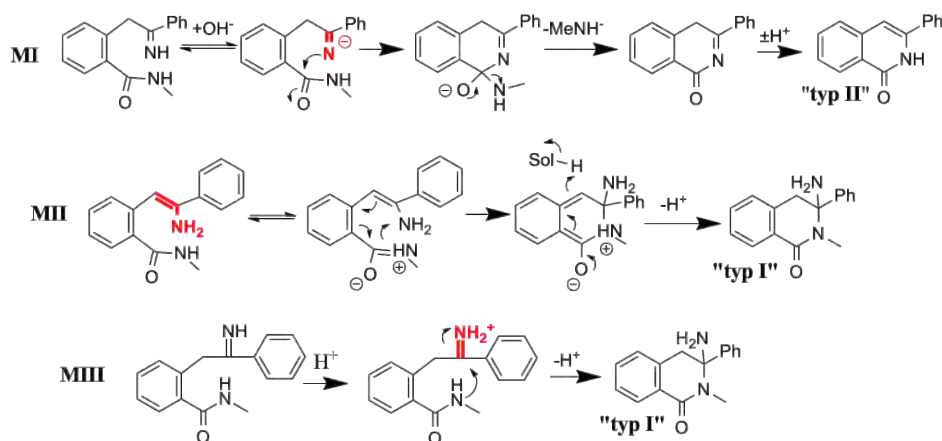
^aA znamená, že nasýtený vodný roztok salmiaku bol prikvapkaný do reakčnej zmesi. B znamená, že reakčná zmes bola prikvapkaná do nasýteného vodného roztoku salmiaku.

Vykonalí sme screening nitrilov a vplyv elektrónových efektov na pomer produktov typu **I/II** (Tabuľka 1). Zistili sme, že zďaleka najväčší vplyv má spôsob spracovania zmesi – zmena selektivity je vždy viac ako 100 krát. Substituenty mali na výťažok nižší vplyv – vyššia elektrónová hustota na nitrile podporovala vznik produktov typu **I**. Intermediát **9** obsahuje (po protonácii) systém, ktorý môže ľahko podliehať imín – enamín tautomérii. Je známe, že rovnováha tejto tautomérie je pre podobné systémy veľmi závislá od polarít rozpúšťadla [4]. Preskúmali sme preto, aký vplyv na tvorbu produktov má voľba reakčného média.

Zistili sme, že voľba aprotického rozpúšťadla nemá vplyv na zloženie produktov. Naopak, ak klesal obsah vody v roztoku, ktorý slúžil pri spracovaní ako zdroj protónov, rástol pomer **I/II** (Tabuľka 2). Na základe týchto nameraných dát sme postulovali reakčné mechanizmy (Obrázok 4).

Tab. 2 Vplyv rozpúšťadla na selektivitu,

Rozpúšťadlo	Spracovanie	Typ I	Typ II	I/II
Toluén	A	2%	70%	0.03
DMF	A	5%	78%	0.06
MeCN	A	4%	76%	0.05
THF	A (100% H ₂ O)	6%	56%	0.11
THF	A (10% H ₂ O v THF)	21%	44%	0.47
THF	A (1% H ₂ O v THF)	33%	37%	0.89



Obr. 4 Reakčné mechanizmy

Mechanizmus **MI** vysvetľuje tvorbu produktu **I**: imín, ktorý vznikol protonáciou intermediátu **9** deprotonuje pôsobením bázy. Tá musí byť dostatočne silná na to, aby deprotonovala imínovú funkciu ($pK_a \approx 25$). Hydroxidový anión (získaný hydrolýzou **9**) dokáže takúto skupinu deprotonovať len ak je nesolvatovaný – preto reakcia prebieha iba v neprotickom médiu za pomalého pridávania vody. Mechanizmus vzniku **II**, **MII** predpokladá tautomerizáciu imínu a následnú cyklizáciu. Očakávali by sme, že v tomto prípade bude mať dielektrická konštanta rozpúšťadla vplyv na selektivitu – čo sme však nepozorovali. Pomocou DFT (6-311G(d), PBE0) sme tiež vypočítali aktivačnú energiu tejto reakcie na 170 kJ/mol, čo je príliš veľká hodnota, vzhľadom k tomu, že reakcia prebiehala pri 25 °C svižne. Tento mechanizmus bol nakoniec vylúčený izotopovým značením – pri spracovaní reakcie ťažkou vodou nedošlo k inkorporácii deutéria do molekuly. Alternatívny

mechanizmus vzniku **II**, **MIII** vychádza z toho, že dôjde k protonácii imínu a následnému ataku amidu. To je však možné len v protickom prostredí. Intermediálny kation je stabilizovaný elektrón donornými skupinami na aromatickom jadre nitrilu, takže by mali zvyšovať pomer **I/II**. To sme skutočne pozorovali. DFT (6-311G(d), PBE0) výpočet ukazoval, že aktivačná energia tejto reakcie je asi 95 kJ/mol, čo je dostatočne nízka hodnota, aby reakcia prebiehala pri laboratórnej teplote. Mechanizmus **MIII** je teda pravdepodobne zodpovedný za tvorbu produktov typu **II**.

Záver

Pri reakcii aromatických nitrilov s *o*-touylamidom v bázičkom prostredí sme pozorovali vznik doteraz neznámeho produktu namiesto očakávaného produktu, ktorý je popísaný v literatúre. Zistili sme, akým spôsobom možno regulovať selektivitu reakcie v prospech jedného alebo druhého produktu. Vypracovali sme mechanistickú štúdiu, ktorou sme vysvetlili selektivitu reakcie pri rôznych spôsoboch spracovania reakcie.

PodĎakovanie

Táto práca by nevznikla bez podpory grantového programu EÚ Socrates/Erasmus, ktorý pokryl náklady môjho pobytu v Škótsku.

Zoznam použitej literatúry

- [1] a) Malkov A. V., Westwater M. M., Guntov A., et al. (2008) Tetrahedron 64, p. 11335; b) Malkov A. V., Vranková K., Stončius S., et al (2009) J. Org. Chem. 74, p. 5839. c) Malkov A. V., Barlog M., Jawkes Y., et al. (2011) J. Org. Chem. 76, p. 4800.
- [2] Poindexter G. S., (1982) J. Org. Chem. 47, p. 3787.
- [3] a) Patent WO 2011045258 (2011) Condensed azine derivatives for treatment of diseases related to acetylcholine receptor; b) Patent KR 2011006033 (2011) Preparation of isoindolo[2,1-*b*]isoquinoline derivatives as antitumor agents; c) Patent US 20080188467 (2008) Preparation of phenyldimethoxyquinoline derivatives and analogs as cardiovascular agents d) Patent WO 2008060927 (2008) Preparation of isoquinolinyloxypropyl tripeptide inhibitors of hepatitis C virus.
- [4] Albrecht H., Rauchsowelbe G., (1971) Tetrahedron Lett. 12, p. 4899.

Hydrotermálna syntéza nanorúrok titanátu sodného

Marián Miškóci¹, Karol Jesenák¹, Mária Čaplovičová²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra anorganickej chémie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika,
marian.miskoci@gmail.com

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra ložiskovej geológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika.

Abstrakt

From suspension of nanoparticles TiO_2 in concentrated water solution of NaOH were prepared by hydrothermal synthesis sodium titanates particles with different shapes. Influence of synthesis duration under temperature 180 °C on the change of particles shapes was observed. The result of experiment showed that one day synthesis resulted to obtained product with high content of nanotubes, but the extension of this period led to the transformation of product's shape into stripes. From the results of experiment follows that as a precursor for TiO_2 nanotubes preparation may be used only products of hydrothermal synthesis, which duration of pressure synthesis was not longer than 24 hours.

Kľúčové slová: titanát sodný; oxid titaničitý; nanorúrky; hydrotermálna syntéza

Úvod a formulácia cieľa

Titanáty alkalických kovov patria medzi najdôležitejšie prekursorzy pre prípravu nanorúrok na báze oxidu titaničitého. Tie sa získavajú termickým spracovaním ich trubičkovitých foriem, predovšetkým však titanátu sodného. Existuje niekoľko metód prípravy titanátov, avšak najväčšiu pozornosť si zasluhujú hydrotermálne syntézy vychádzajúce z nanopráškov oxidu titaničitého a vodných roztokov hydroxidu sodného. Ich hlavná výhoda spočíva v tom, že zvýšenie tlaku nad reakčnou zmesou výrazne zvyšuje rýchlosť reakcie oproti syntézam za laboratórnych podmienok. Hydrotermálne syntézy nanorúrok titanátu sodného sú popísané v mnohých prácach, napríklad v [1, 2]. Vo všeobecnosti sa však v týchto prácach uvádzané podmienky hydrotermálnej syntézy zvyčajne líšia. Rozdiely spočívajú predovšetkým v použitých teplotách syntézy, ktoré sa pohybujú v rozmedzí približne 50 °C (130 °C - 180 °C). Tieto teploty zároveň výrazne ovplyvňujú aj tlak pár nad reakčnou zmesou. Významnou komplikáciou pri snahe o reprodukovanie syntéz popísaných v odbornej literatúre je to, že väčšinou sa tieto syntézy uskutočňujú v neštandardných autoklávoch s rôznymi rozmermi.

Na autorskom pracovisku sa plánujú pripravovať rôzne chemicky modifikované nanorúrky s prímiesou rôznych minoritných aditív, ktoré sa budú testovať na fotokatalytické vlastnosti pri rozklade rôznych organických polutantov. Pre uskutočnenie tohto zámeru je

nutné v prvom kroku zvládnuť hydrotermálnu syntézu nanorúrok titanátu sodného s použitím neštandardných autoklávov, ktoré sú k dispozícii na tomto pracovisku. Cieľom tohto príspevku je informovať o experimente, zameranom na optimalizáciu podmienok hydrotermálnej syntézy tejto látky v týchto autoklávoch.

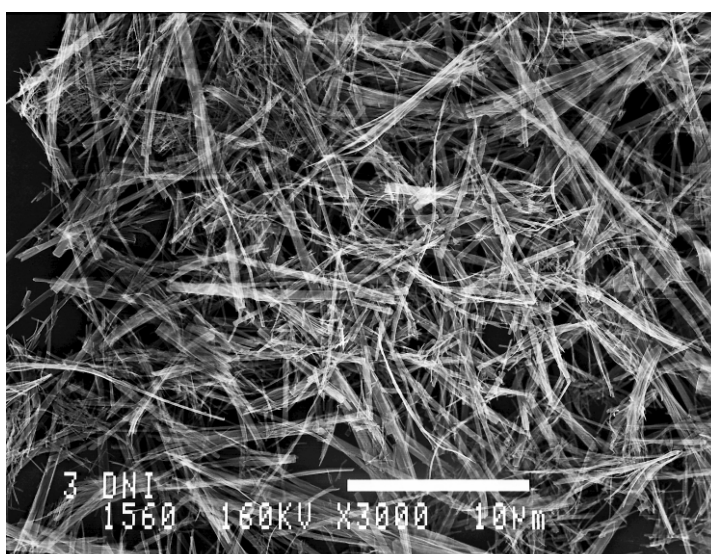
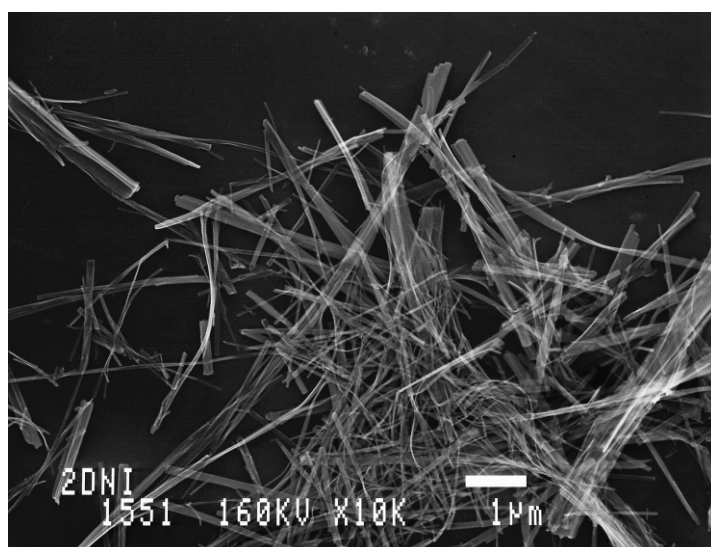
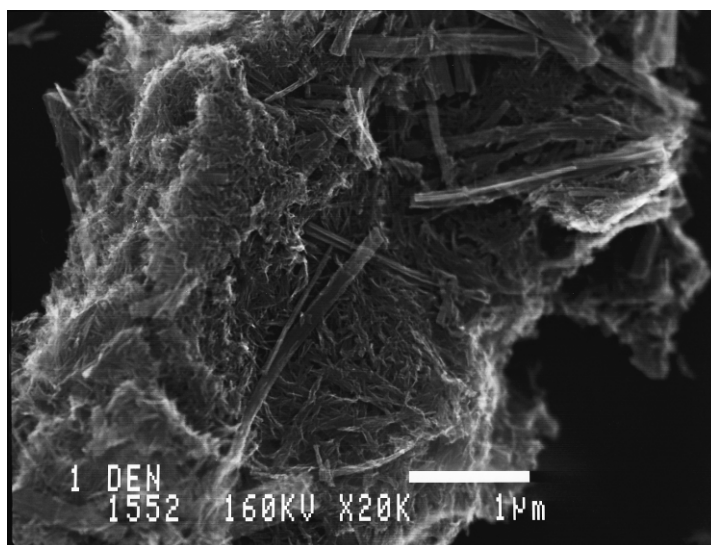
Materiál a metódy

Postup prípravy titanátu sodného vychádzal z čiastočne modifikovaného postupu uvádzaného v práci [2]. Základnou východiskovou látkou pri syntéze bol oxid titaničitý vo forme nanoprášku, vyrábaný firmou Degussa pod označením Aeroxide® TiO₂ P 25. Táto priemyselne vyrábaná látka s veľkým počtom rôznych aplikácií sa používa ako fotokatalytický štandard s vysokou katalytickou účinnosťou pri posudzovaní katalyzátorov na báze oxidu titaničitého. Druhou východiskovou látkou bol hydroxid sodný (p.a., výrobca: Lachema Brno). Postup syntézy bol nasledovný. 1,666 g prášku Aeroxide® TiO₂ P 25 sa suspendovalo v 50 ml vodného roztoku NaOH ($c(\text{NaOH}) = 11,25 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Suspenzia sa miešala 3 hodiny, potom sa preliala do teflónovej nádoby, ktorá sa následne premiestnila do oceľového autoklávu. (Autokláv mal vnútorný priemer 40 mm, hĺbku vnútorného otvoru 100 mm. Využívaný objem autoklávu predstavoval približne 37,5 % z celkového objemu autoklávu. Maximálny tlak v autokláve bol 1,0027 MPa.) Po hermetickom uzavretí autoklávu sa premiestnil do elektrickej sušiarne s nastavenou teplotou 180 °C. V nej sa nechal počas 24 hodín. Produkt sa z autoklávu vybral po ochladení autoklávu vodou. Príprava ďalších vzoriek sa opakovala s tým rozdielom, že čas zotrvania východiskovej zmesi sa postupne predlžoval na 5 dní. V rámci tohto experimentu výsledné doby syntéz predstavovali 1, 2, 3, 4 a 5 dní. Po otvorení autoklávu sa vzorky suspendovali v 250 ml destilovanej vody, následne dekantovali jedným litrom destilovanej vody, filtrovali na Büchnerovom lieviku, premyli 1 litrom dest. vody, vodným roztokom HCl ($w = 5 \text{ hmot. \%}$) ($V = 500 \text{ ml}$) a znova 1 l destilovanej vody. Všetky vzorky sa sušili 20 hodín pri teplote 80 °C a následne boli bez predchádzajúceho drvenia uložené do PE vrecúšok. Získané produkty boli skúmané rastrovacou elektrónovou mikroskopiou a transmisnou elektrónovou mikroskopiou na transmisnom rastrovacom elektrónovom mikroskope (STEM) JEM 2000FX firmy JEOL pri urýchľovacom napätí 160 kV.

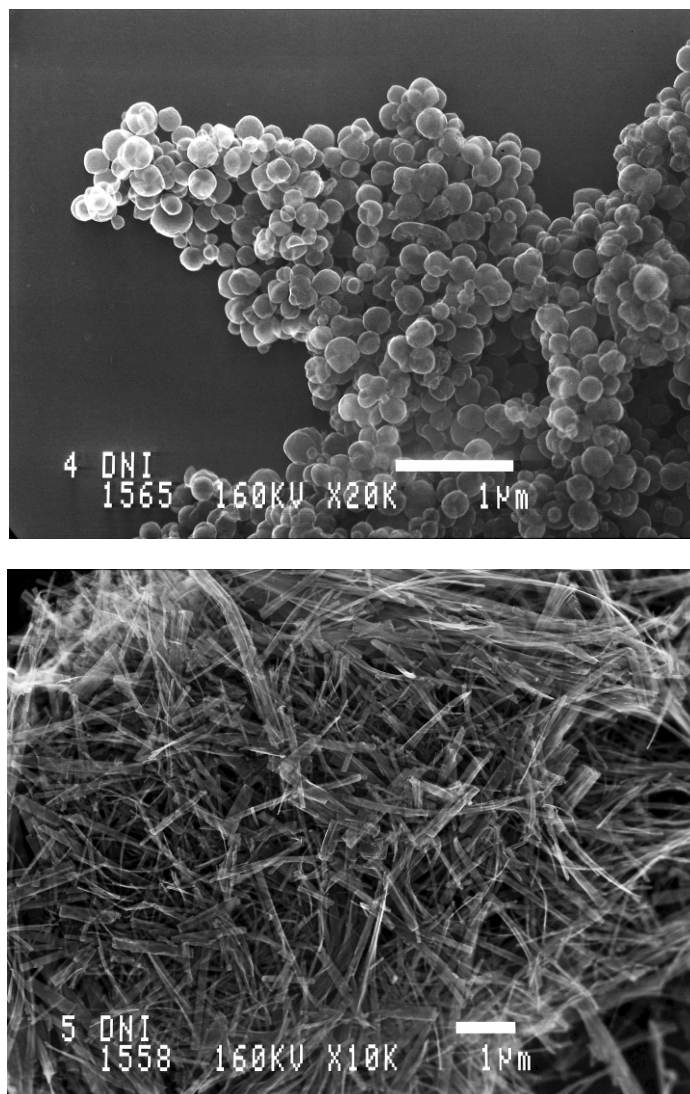
Výsledky a diskusia

Z pripravených látok sa zhotovilo približne štyridsať SEM snímok. Výber z nich je na

obr. 1. Do tohto výberu boli zahrnuté tie snímky, ktoré najlepšie reprezentujú morfológiu častíc získaných hydrotermálnou syntézou.



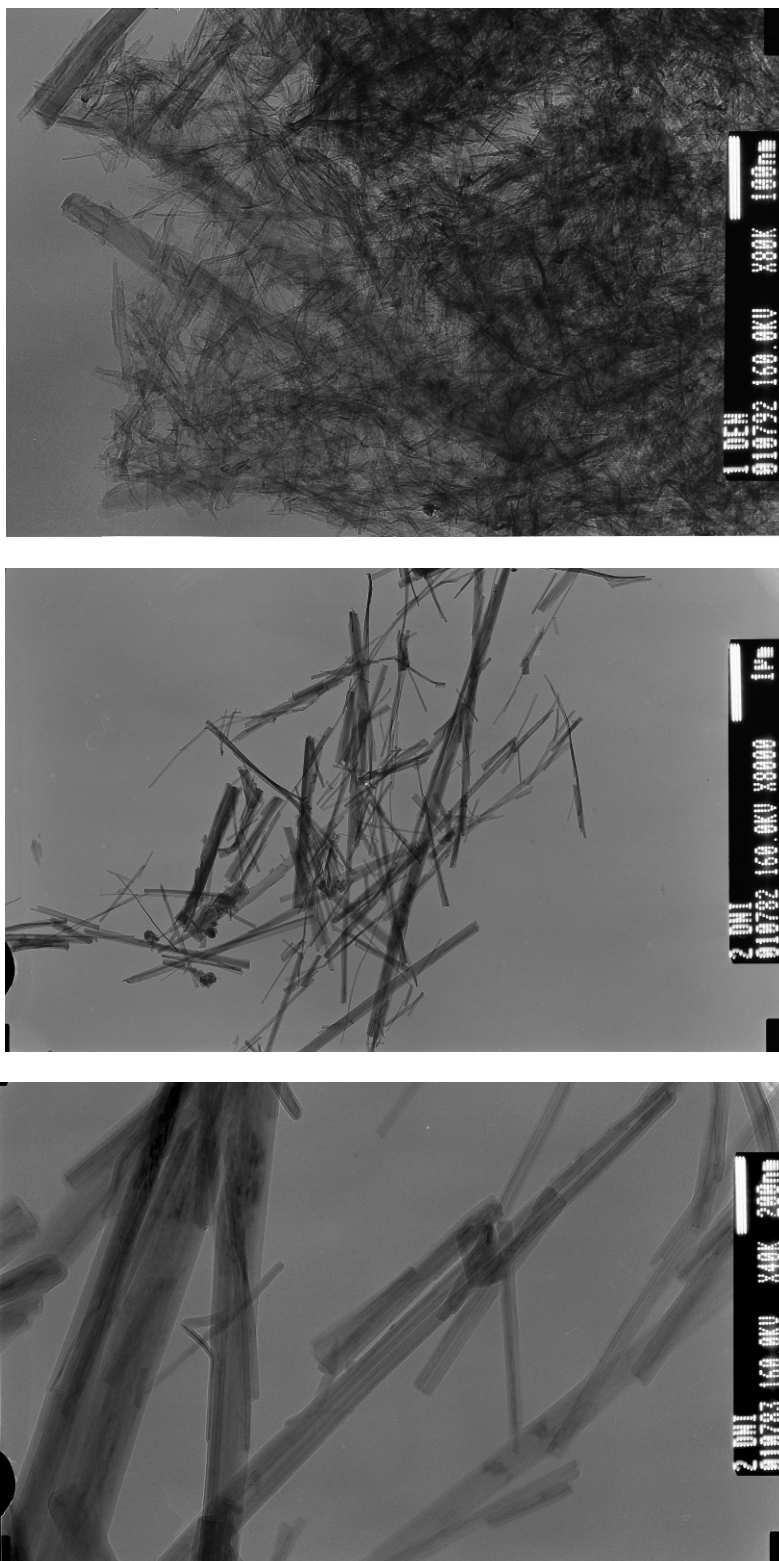
Obr. 1. SEM snímky produktov hydrotermálnej syntézy titanátu sodného usporiadané podľa vzrastajúcej doby syntézy (zhora dole: 1 deň, 2 dni, 3 dni). Prevažnú časť objektov na prvej snímke tvoria nanorúrky usporiadané do jemných nanoštruktúrnych agregátov. Ďalšie snímky jasne ukazujú prítomnosť stužkovitých titanátov.



Obr. 1. (pokračovanie) SEM snímky produktov hydrotermálnej syntézy titanátu sodného usporiadané podľa vzrastajúcej doby syntézy (zhora dole: 4 dni, 5 dni). Postupnosť zmeny tvaru objektov na snímkach z predchádzajúcej strany narúša snímka produktov pripravených štvordňovou syntézou.

Skupina jednotlivých obrázkov je tu zoradená podľa zvyšujúcej sa doby hydrotermálnej syntézy. Z obrázkov vyplýva, že hlavný trend pri predlžujúcej sa dobe syntézy je zvyšovanie obsahu stužkovitých titanátov. Kým prvá vzorka pripravená jednodňovou syntézou obsahuje nanorúrky titanátu sodného ako hlavnú zložku, vo vzorkách pripravených pri dlhších dobách syntézy je ich zastúpenie mizivé, alebo sa vo vzorkách už vôbec nevyskytujú. Detailný pohľad na oba typy útvarov ukazujú TEM snímky, ktoré boli zhotovené u vzoriek pripravených jednodňovou a dvojdňovou syntézou (obr. 2.). Približná dĺžka nanorúrok sa pohybuje okolo hodnoty 100 nm, ich vonkajší priemer je približne 5 nm.

Priemerná dĺžka stužkovitých titanátov sa pohybuje od 1 μm do 15 μm . Pričom predĺžovanie doby syntézy v rámci sledovaného intervalu spôsobujú výrazné zväčšenie ich šírky.



Obr. 2. TEM snímky vzoriek z jednodňovej a dvojdňovej hydrotermálnej syntézy. (Horný obrázok: jednodňová syntéza, stredný a spodný obrázok: dvojdňová syntéza. Na strednom obrázku sú stužkovité častice pri 8 000 násobnom zväčšení, na spodnom obrázku sú tie isté častice pri 40 000 násobnom zväčšení.)

Z postupnosti zmien na obr. 1 sa vyčleňuje vzorka pripravená štvordňovou hydrotermálnou syntézou. Najpravdepodobnejšie vysvetlenie narušenia uvedeného trendu je porušenie tesnenia počas ohrevu. Toto tesnenie by bolo možné spozorovať za predpokladu, že by sa autokláv otváral pri teplotách, výrazne prekračujúcich laboratórnu teplotu, avšak tento postup sa v našom prípade nevyužíval. Hlavný dôvod bol ten, že vzhľadom na čo najdôslednejšie dodržiavanie syntéznej doby, sa autokláv hneď po vytiahnutí z ohrievacieho telesa náhle ochladil tečúcou vodou. Po ochladení však už neexistoval výrazný rozdiel medzi vonkajším tlakom a tlakom v autokláve. Porušenie hermetického uzáveru autoklávu je v tomto prípade spôsobené defektom v teflónovom tesnení. Vo všeobecnosti sa so sporadickým výskytom tohto javu musí počítať. Napriek tejto syntéze, ktorú možno z pohľadu vytýčeného cieľa považovať za neúspešnú, je získanie tejto vzorky užitočné, pretože môže slúžiť ako porovnávací štandard pre syntézu realizovanú pri nízkom tlaku. SEM snímka na obr. 1 ukazuje, že reakčným produktom sú v tomto prípade sférické častice s veľkosťou približne dvakrát prevyšujúcou častice pôvodného východiskového nanoprášku.

Záver

Výsledky vyššie popísaného experimentu ukazujú, že pri príprave nanorúrok oxidu titaničitého a pravdepodobne aj nanorúrok oxidu titaničitého dopovaného fotokatalyticky aktívnymi aditívami, môžu byť použité iba tie produkty syntéz, u ktorých doba vysokotlakovej fázy syntézy neprekročí dobu 24 hodín. Presnejšie určenie tejto doby by bolo možné získať analogickým experimentom s kratšími dobami syntézy. Tento experiment bude realizovaný v ďalšom kroku.

PodĎakovanie:

Ďakujeme grantovej agentúre VEGA za finančnú podporu projektov č. 2/0099/10 a č. 1/1106/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Abida B., Chirchi L., Baranton S., et al. (2011) Appl. Catal. B, 106 (3-4), p. 609
- [2] Bavykin D. V, Parmon V. N., Lapkin A. A., et al. (2004) J. Mater. Chem., 14, 3370

Organokatalytické 1,3-dipolárne cykloadície nitrónov

Melinda Mojzesová, Ambróz Almássy, Mária Mečiarová, Radovan Šebesta

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie,
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, mojzesova@fns.uniba.sk*

Abstrakt

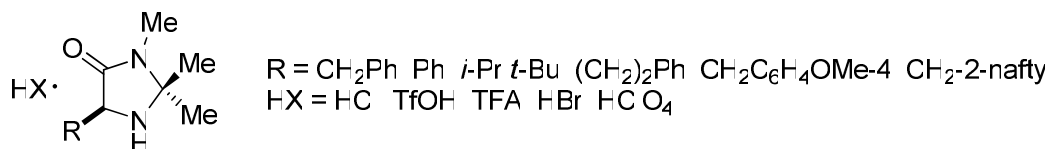
The 1,3-dipolar cycloaddition of nitrones and α,β -unsaturated aldehydes is one of the most versatile reactions in organic synthesis. It offers the possibility of generating isoxazolidines with up to three new contiguous stereocenters, which are precursors of broadly useful compounds such as 1,3-aminoalcohols, amino acids, azasugars, and alkaloids. The use of organocatalysts which have several important advantages, since they are usually robust, inexpensive, readily available and non-toxic, lead to preparation of isoxazolidines in good yields with high diastereo and enantioselectivities. Application of non-classical reaction conditions such as mechanic activation in ball mill, microwave irradiation, ultrasonic irradiation in organocatalytic 1,3-dipolar cycloadditions enabled us to shorten the reaction time from days to hours with comparable yields and better selectivities.

Kľúčové slová: organokatalýza; nitróny; dipolárna cykloadícia.

Úvod a formulácia cieľa

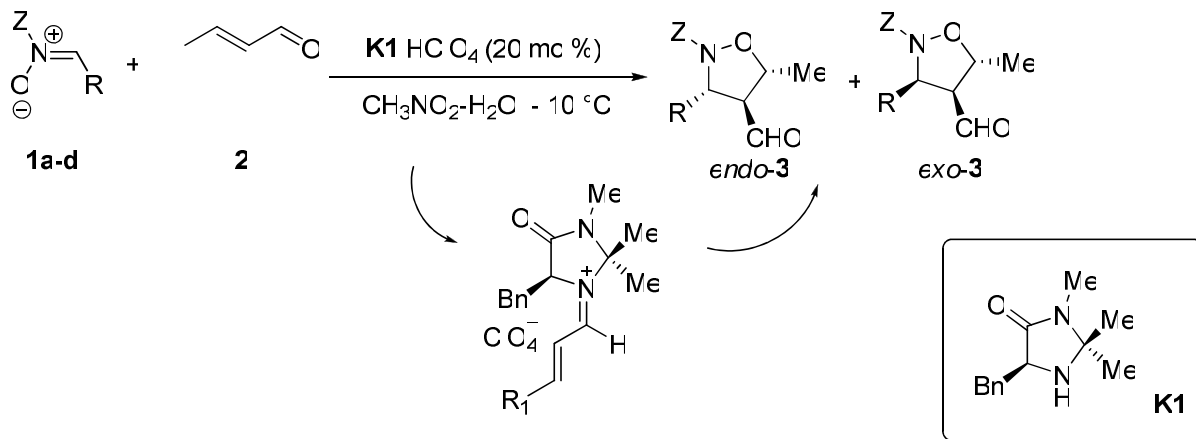
V posledných 20 rokoch sa venuje čoraz väčšia pozornosť asymetrickým [3+2] cykloadiciám nitrónov s rôznymi dipolarofilmi [1]. Jedným z dôvodov syntetického využitia nitrónov je ich vyššia stabilita v porovnaní s väčšinou 1,3-dipólov, ktoré vznikajú *in situ* v reakčnej zmesi. Ďalším dôvodom, prečo študovať 1,3-dipolárne cykloadície nitrónov je, že sa takto dajú pripraviť izoxazolidíny, ktoré majú v molekule tri stereogénne centrá a používajú sa ako stavebné jednotky pri budovaní štruktúry biologicky aktívnych látok ako napr. aminokyselín, alkaloidov, farmaceutík (HIV inhibítory, HSV inhibítory a HCV inhibítory) [2].

MacMillan a kol. [3] ako prví použili pri asymetrických 1,3-dipolárnych cykloadiciách malé chirálne organické molekuly – organokatalyzátory (obr. 1), ktoré imíniovou aktiváciou α,β -nenасыteného aldehydu katalyzujú vznik produktu [3+2] cykloadície (tab. 1). Reakcie prebiehali s veľmi dobrou diastereoselektivitou (*endo:exo* = 80:20 až 99:1) aj enantioselektivitou (86–99 % ee (*endo*)) s nitrónmi rôznej štruktúry, ale vhodným dipolarofilom bol len akroleín a krotónaldehyd.



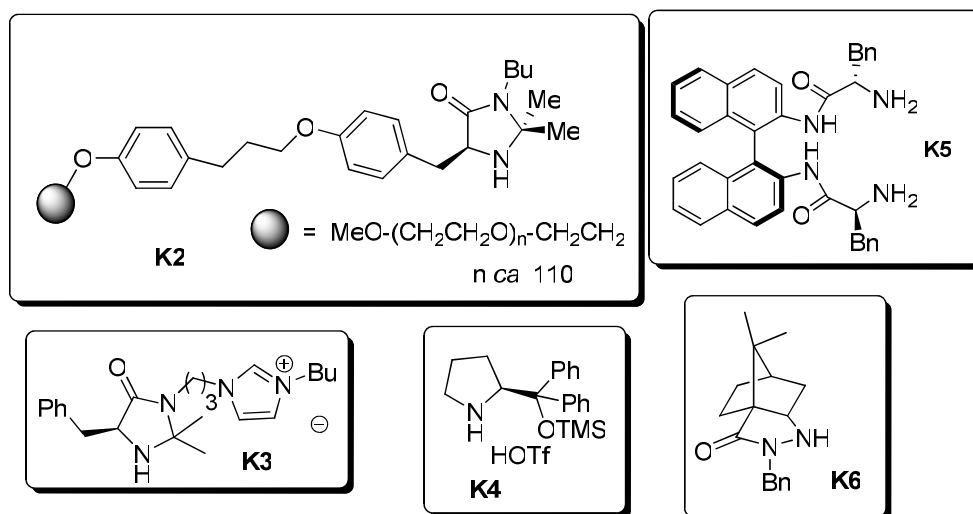
Obr. 1 MacMillanove organokatalyzátory 1. generácie

Tab. 1 Prvé organokatalytické 1,3-dipolárne cykloadície nitrónov



3	Z	R	Výťažok (%)	endo/exo	ee (endo) (%)
3a	Bn	Ph	98	94 : 6	94
3b	Me	Ph	66	95 : 5	99
3c	Bn	4-MeO-C ₆ H ₄	93	98 : 2	91
3d	Bn	cyklohexyl	70	99 : 1	99

Asymetrické 1,3-dipolárne cykloadície nitrónov na α,β -nenasýtené aldehydy boli v poslednom desaťročí opísané s použitím okrem spomínaných MacMillanových organokatalyzátorov (obr. 1) aj s organokatalyzátormi **K2** – **K6** (obr. 2) [4,5,6,7,8].



Obr. 2 Organokatalyzátory 1,3-dipolárnych cykloadícií nitrónov s aldehydmi

Naším cieľom bolo preskúmať 1,3-dipolárne cykloadície nitrónov na α,β -nenасыtené aldehydy s rôznymi organokatalyzátormi v iónových kvapalinách, za netradičných reakčných podmienok ako mikrovlnné žiarenie, ultrazvukové vlnenie, resp. bez rozpúšťadla s využitím mechanickej aktivácie v guľovom mlyne.

Materiál a metódy

Priebeh reakcií bol sledovaný TLC (Silufol, vizualizácia manganistanovým prípadne anizolovým vyfarbovacím roztokom). Na stĺpcovú chromatografiu sa používal silikagél 65/40 (Merck). Komplikované reakčné zmesi boli čistené pomocou zariadenia na flash chromatografiu Biotage Isolera 1. ^1H a ^{13}C NMR spektrá vzoriek boli namerané na prístroji Varian Gemini 2000 s pracovnou frekvenciou 300 MHz (^1H) a 75 MHz (^{13}C). Ako vnútorný štandard bol použitý tetrametylsilán (TMS) a rozpúšťadlo CDCl_3 . Enantioména čistota bola stanovovaná metódou HPLC s kolónou Daicel Chiralpac AD-H a OD-H s UV detektorom (213 resp. 217 nm). Cykloadičné reakcie bez rozpúšťadla boli uskutočnené v oscilačnom mlyne MM400 (firma Retsch) s pracovnou frekvenciou 20 Hz. Reakcie v podmienkach ultrazvukového vlnenia boli uskutočnené v ultrazvukovej vani ULTRASONIC COMPACT CLEANER (200 W, 20 kHz).

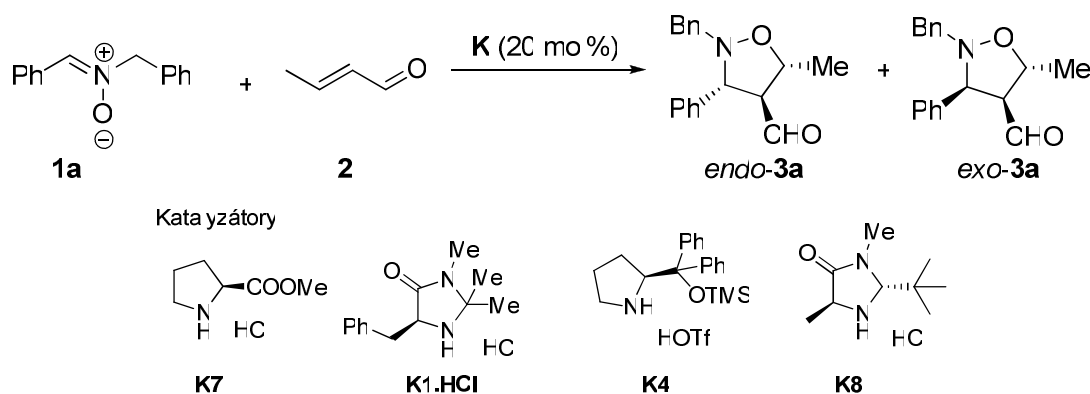
Výsledky a diskusia

Štúdium 1,3-dipolárnych cykloadícií sme začali reakciou nitrónu **1a** s krotónaldehydom **2**, použitím rôznych organokatalyzátorov. Najúčinnnejším sa ukázal byť katalyzátor **K1.HCl**, s ktorým sme uskutočnili cykloadície za rôznych reakčných podmienok (tab. 2). V iónovej kvapaline $[\text{bmim}]\text{BF}_4$ sme s týmto katalyzátorom dostali majoritný enantiomér v 82 % enantiomérom nadbytku. Produkty sme aj napriek dlhšiemu reakčnému času (5 dní) izolovali vo výťažku 21 %. Po zvýšení reakčnej teploty na 40 °C výťažok produktov vzrástol na 48 %, ale zvýšenie reakčnej teploty spôsobilo zníženie selektivity (*endo:exo* = 64:36, e.r.: 69:31) (tab. 2, exp. 2, 3).

Študovaná 1,3-dipolárna cykloadícia úspešne prebehla aj v guľovom mlyne bez rozpúšťadla. S organokatalyzátorom **K1.HCl** sme už po 3 h dosiahli 28 % výťažok produktov, teda podobný ako pri 5 °C v $[\text{bmim}]\text{BF}_4$ až po 5 dňoch. Zlepšila sa aj diastereoselektivita (*endo:exo* = 89:11) a pomer enantiomérov bol podobný (e.r.(*endo*) = 94:6) ako pri 5 °C (tab. 2, exp. 4).

Uskutočnením reakcie za netradičných podmienok, ako je ultrazvukový reaktor (tab. 2, exp. 5), mikrovlnný reaktor (tab. 2, exp. 6) resp. vysokotlakový reaktor (tab. 2, exp. 7) sme síce dosiahli mierne zvýšenie výťažku produktov, ale zhoršila sa diastereoselektivita ($endo:exo \leq 86:14$) aj enantioselektivita ($e.r. \leq 16:84$).

Tab. 2 1,3-dipolárne cykloadície s krotónaldehydrom 2

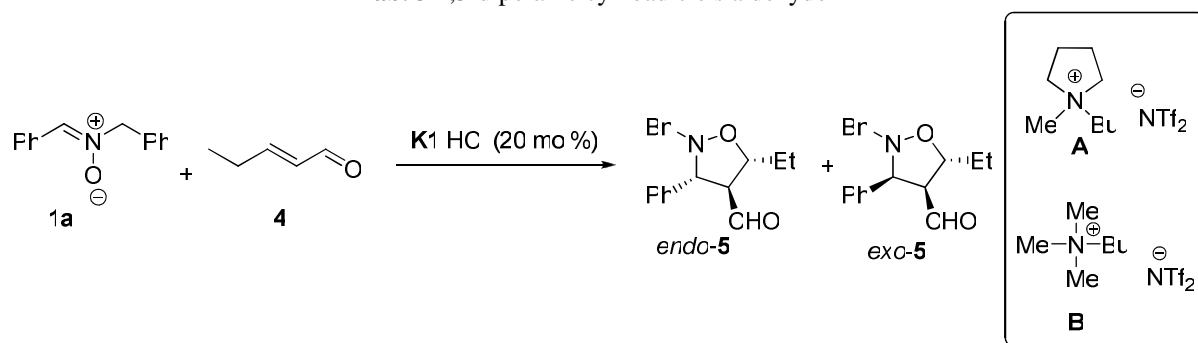


Exp.	Katalyzátor	R. podmienky	Výťažok (%)	<i>endo:exo</i>	<i>e.r. (endo)</i>
1	K7	[bmim]BF ₄ , 5 °C, 4 d	47	80:20	rac.
2	K1.HCl	[bmim]BF ₄ , 5 °C, 5 d	21	79:21	9:91
3	K1.HCl	[bmim]BF ₄ , 40 °C, 3 d	48	64:36	31:69
4	K1.HCl	guľový mlyn, 3 h	28	89:11	6:94
5	K1.HCl	[bmim]BF ₄ ,)))) , 16 h	40	71:29	32:68
6	K1.HCl	DCM, MW, 6 h	46	83:17	21:79
7	K1.HCl	DCM, 130 bar, 24 h	35	86:14	16:84
8	K4	guľový mlyn, 6 h	23	79:21	15:85
9	K8	DCM, 130 bar, 24 h	21	83:17	28:72

Krotónaldehyd 2 patrí do skupiny veľmi toxických látok, preto sme v ďalšej časti ako východiskovú látku pri 1,3-dipolárnych cykloadíciách použili pent-2-enál (4). Na základe predchádzajúcich výsledkov sme túto reakciu uskutočnili v guľovom mlyne, v ktorom sme študovali aj efekt prídavku celitu. V oboch prípadoch sme však dosiahli podobný výťažok produktov (30 a 34 %) s rovnakou diastereo- aj enantioselektivitou (tab. 3, exp. 1, 2).

1,3-dipolárnu cykloadíciu sme študovali aj v rôznych iónových kvapalinách, pričom sme najvyššie výťažky dosiahli pri použití s vodou nemiešateľných IL (tab. 3, exp. 3, 4). Výťažky produktov ako aj diastereoselektivita boli v prípade oboch iónových kvapalín lepšie ako v guľovom mlyne. Enantioselektivita *exo* produktu bola v prípade použitia iónovej kvapaliny **B** pomerne vysoká ($e.r. = 85:15$). V tejto iónovej kvapaline sme uskutočnili cykloadíciu v podmienkach ultrazvukového vlnenia, výťažok (37 %) ako aj selektivita ($endo:exo = 66:34$, $e.r. (endo) = 54:46$) boli však nižšie ako v predchádzajúcich experimentoch (tab. 3, exp. 5).

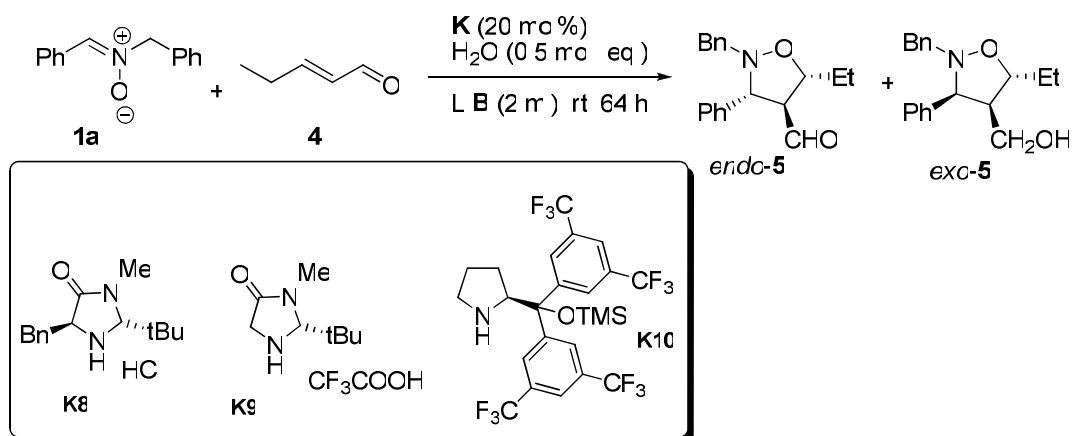
Tab. 3 1,3-dipolárne cykloadície s aldehydom 4



Exp.	R. podmienky	Výt'azok (%)	<i>endo:exo</i>	e.r.	
				<i>endo</i>	<i>exo</i>
1	guľový mlyn, 3 h	30	67:33	27:73	n.d.
2	guľový mlyn, 3 h, + celit	34	67:33	24:76	71:29
3	IL A, r.t., 64 h, 0,5 mol% H ₂ O	47	83 : 17	25:75	23:77
4	IL B, r.t., 64 h, 0,5 mol% H ₂ O	51	76 : 24	34:66	85:15
5	IL B ,))), 20 h	37	66:34	54:46	<i>rac</i>

Reakcia nitronu **1a** a aldehydu **4** bola uskutočnená aj s organokatalyzátormi **K8**, **K9** a **K10** (tab. 4). Najvyššiu enantioselektivitu *endo* produktu sme dosiahli s katalyzátorom **K10** (e.r. = 17:83), ale produkty sme izolovali len v 30 % výťažku, s pomerom diastereoizomérov 1:1.

Tab. 4 Vplyv katalyzátorov na priebeh dipolárnej cykloadície



Exp.	Katalyzátor	Výt'azok (%)	<i>endo:exo</i>	e.r. (<i>endo</i>)
1	K8	40	77:23	23:77
2	K9	34	77:23	52:48
3	K10	30	50:50	17:83

Záver

Počas práce sme študovali 1,3-dipolárne cykloadície a pripravili sme tak chirálne izoxazolidíny vo výťažkoch 21 až 51 %. Produkty sme získavali s pomerom *endo:exo* ≤ 89:11

a pomer enantiomérov dosahoval hodnoty 88 % ee. V rámci štúdia sme optimalizovali reakčné podmienky, toxický východiskový aldehyd sme nahradili aldehydom, u ktorého zatiaľ neboli zistené žiadne toxické vlastnosti.

Selektivitu študovaných 1,3-dipolárnych cykloadícií sme sa snažili zvýšiť výberom vhodného organokatalyzátora a výt'azok aplikáciou rôznych aktivačných techník ako mikrovlnné žiarenie, ultrazvukové vlnenie resp. mechanická aktivácia v guľovom mlyne.

Pod'akovanie

Ďakujem za finančnú podporu Vedeckej grantovej agentúre Ministerstva školstva SR VEGA, číslo projektu 1/0543/11 a APVV-0067-11.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Frederickson M. (1997) *Tetrahedron* 53, p. 403
- [2] Nájera C., Sansano J. M. (2009) *Org. Biomol. Chem.* 7, p. 4567
- [3] Jen W. S., Wiener J. J. M., MacMillan D. W. C. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* 122, p. 9874
- [4] Puglisi A., Benaglia M., Cinquini M., Cozzi F., Celentano G. (2004) *Eur. J. Org. Chem.* 3, p. 567
- [5] Shen Z.-L., Goh K. K. K., Wong C. H. A., Loo W.-Y., Yang Y.-S., Lu J., Loh T.-P. (2012) *Chem. Commun.* 48, p. 5856
- [6] Chow S. S., Nevalainen M., Evans C. A., Johannes Ch. W. (2007) *Tetrahedron Lett.* 48, p. 277
- [7] Weseliński Ł., Słyk E., Jurczak J. (2011) *Tetrahedron Lett.* 52, p. 381
- [8] Lemay M., Trant J., Ogilvie W. W. (2007) *Tetrahedron* 63, p. 11644

Preparation and characterization of vanadium oxide thin films

Olivier Monfort¹, Gustav Plesch¹, Tomáš Roch²

¹*Comenius University of Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Inorganic Chemistry Comenius University, Mlynská Dolina, 842 15 Bratislava, Slovakia, oliv.monf@wanadoo.fr*

²*Comenius University of Bratislava, Faculty of Mathematics Physics and Informatics, Department of Experimental Physics Comenius University, Mlynská Dolina, 842 48 Bratislava, Slovakia*

Abstract

The thermotropic VO₂ films have many applications, since they exhibit semiconductor-conductor switching properties at temperature around 70 °C. Vanadium oxide thin films were prepared via sol-gel method. Spin coater was used to deposit these films on Si/SiO₂ and lime glass substrates. Thin films of V₂O₅ can be reduced to metastable VO₂ thin films at the **temperature** of 450 °C under the pressure of 10⁻² Pa. These films are then converted to thermotropic VO₂ at 700 °C in argon under normal pressure.

Key words: sol gel method; thin films; vanadium oxide; thermotropic; X ray diffraction

Introduction and aim of the work

Thermochromic materials change reversibly their colour at particular temperature. These materials can be liquid crystals, semiconductors or metal compounds [1]. Thermochromic transition metal oxides exhibit an abrupt change in optical, magnetic, and electrical properties at critical temperature (T_c). They are also called thermotropic materials because of the changes in electrical and magnetic properties at the thermochromic switching temperature [2]. They are characterized by metal/insulator or metal/semiconductor transition at this critical temperature. During the transition, lattice distortions within the structure cause change in colour and also a modification of the band gap energy which is responsible for changes of the electrical properties [3].

In V₂O₅, vanadium is at the oxidation state +V. It is the most stable and common compound of vanadium oxide and it shows semiconducting behaviour. To describe its layered structure, zig zag chains of alternative up and down square pyramids sharing two edges are linked by corners as seen in fig. 1 [3].

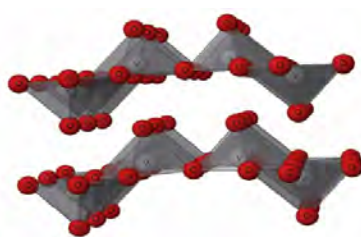


Fig. 1. Layered structure of V₂O₅

In VO₂, vanadium is in the oxidation state +IV. Vanadium dioxide is the most studied thermochromic material because its metal/semiconductor transition shows a low critical temperature (67 °C). In the semiconducting state ($T < T_c$) vanadium dioxide has monoclinic structure and above this temperature, the structure is distorted rutile [4]. VO₂ exhibits hysteresis loops around the transition temperature. Below T_c , VO₂ is transparent in the IR range and IR reflective above it [5]. Deposited as thin films, VO₂ is reddish-brown in the semiconducting state and greenish blue in the metallic state [6]. One of the most significant applications of the vanadium dioxide films is the fabrication of microbolometers for IR detectors and also the fabrication of smart windows [4, 7].

In this article, we focus our attention on the preparation and characterization of films which exhibit switching properties for potential applications in bolometers.

Materials and methods

Vanadium pentoxide powder was synthesized by calcination of ammonium vanadate NH₄VO₃ (LACHEMA Brno) at 500 °C for 2 hours. Aqueous sol gel was prepared by dissolving 1 g of V₂O₅ powder in 20 mL of distilled water and then in 100 mL of H₂O₂ 15 % under magnetic stirring. The reaction with hydrogen peroxide is strongly exothermic and dioxygen is released. After the slow addition of H₂O₂, heating at approximately 70 °C is necessary to convert yellowish-orange sol into dark red gel.

The gels were then deposited onto different substrates, such as lime glass and Si/SiO₂, by spin-coating. According to the viscosity of the gel (i.e. the aging time), different rotation speeds and times are used to spread the gel into a thin layer. Before the deposition of another layer, intermediate annealing has to be performed in oven (Clasic 3013) to form a stable layer. As-deposited 4-layer films were prepared by this mean. Then, final annealing in air under the normal pressure was performed on some films whereas others underwent vacuum annealing in the oven (Zepelin) linked to supramolecular pump (Pfeiffer Vacuum HiCube) to reach the pressure about 10⁻² Pa. Some films that were annealed in vacuum were subsequently annealed under the normal pressure in argon. All the conditions of the preparation of vanadium oxide films and their annealing are summarized in tab. 1.

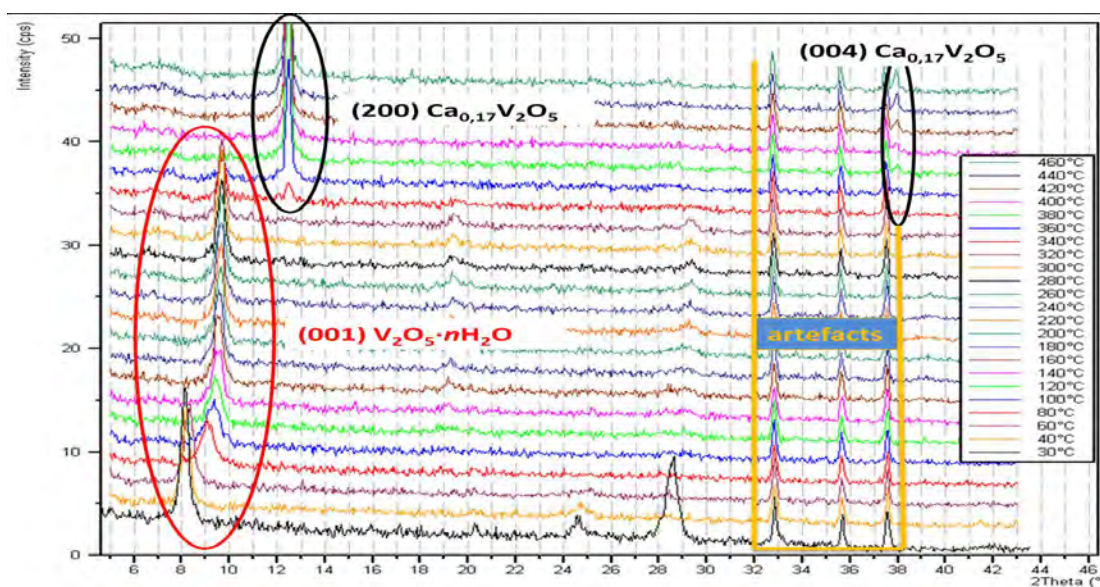
The thin films were analyzed by X-ray diffraction (XPert Pro vs. 2.1E with area detector PIXcel-3D) using either Bragg-Brentano geometry or grazing incidence method. Some films were also analyzed by Scanning Electron Microscopy (Tescan TS5136MM) and Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) on Bruker 129 eV device.

Tab. 1 Conditions for film deposition and annealing parameters

Sample	Substrate	Intermediate Annealing	Final Annealing	Vacuum Annealing	Subsequent Annealing	Colour
F1	Lime glass	325 °C – 10 min	325 °C – 10 min	X	X	Yellow
F2	Lime glass	400 °C – 10 min	400 °C – 3 h	X	X	Yellow
F3	Si/SiO ₂	450 °C – 10 min	400 °C – 3 h	X	X	Yellow
F4	Si/SiO ₂	450 °C – 5 min	X	450 °C – 20 min	700 °C – 1 h	Brown

Results and discussion

In fig. 2, the temperature dependence X-ray diffraction (XRD) of sample F1 is shown. The changes in structure of the film can be followed by XRD measurement and the reactions happening in the multilayer film can be deduced. The artefacts marked in fig. 2 are, in fact, caused by the sample holder which is aluminium nitride (AlN). Peak *001* belonging to the vanadium pentoxide hydrated ($V_2O_5 \cdot nH_2O$) is gradually shifted to higher diffraction angle as the temperature increases. At 325 °C, water still remains between the layers of vanadium pentoxide. Thus, the temperature results in water being slightly removed and in the diminution of the interlayer distance (d_{hkl}) i.e. an increase of diffraction angle. At 340 °C, the peak *001* disappears and peaks belonging to $Ca_{0,17}V_2O_5$ start to appear. This phenomenon is due to the reaction of the film with the lime glass substrate which contains high amount of calcium (CaO). It explains why crystallization of pure V_2O_5 doesn't occur.

**Fig. 2** Bragg-Brentano temperature dependence XRD of sample F1

The SEM measurements performed on sample F1 shows the atomic percentage of elements present in the film (Tab. 2). It is clear that the film has reacted with the glass substrate because of its high percentage in calcium. The EDX results of the sample F2

deposited on glass substrate and annealed at higher temperature (shown in fig. 3) show also high percentage of calcium in the film and proved the contamination by the lime glass.

Tab. 2 SEM results of sample F1

	O	Na	Mg	Al	Si	K	Ca	V
at%	40,84	6,97	2,13	0,47	22,43	0,31	2,11	9,37

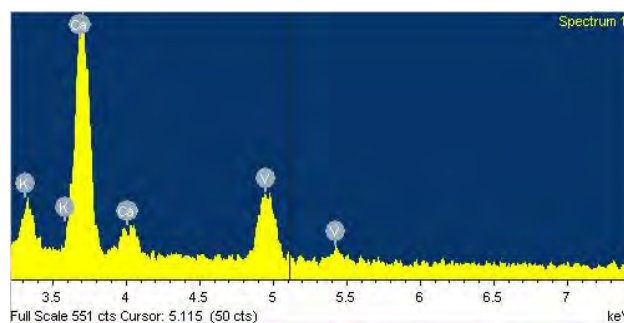


Fig. 3 EDX of sample F2

To avoid this contamination, Si/SiO₂ substrates were used and the sample F3 was annealed under the same conditions as the sample F2. The XRD of both films are shown in fig. 4. The diffractogram of sample F2 indicates that the film contains Ca_{0,17}V₂O₅ and moreover it is somehow amorphous because of broad diffuse background. The film F3 is crystalline and contains V₂O₅. It proves that the previous contamination was caused by the glass substrate. The artefacts in signal of sample F3 are provided by the Si/SiO₂ substrate.

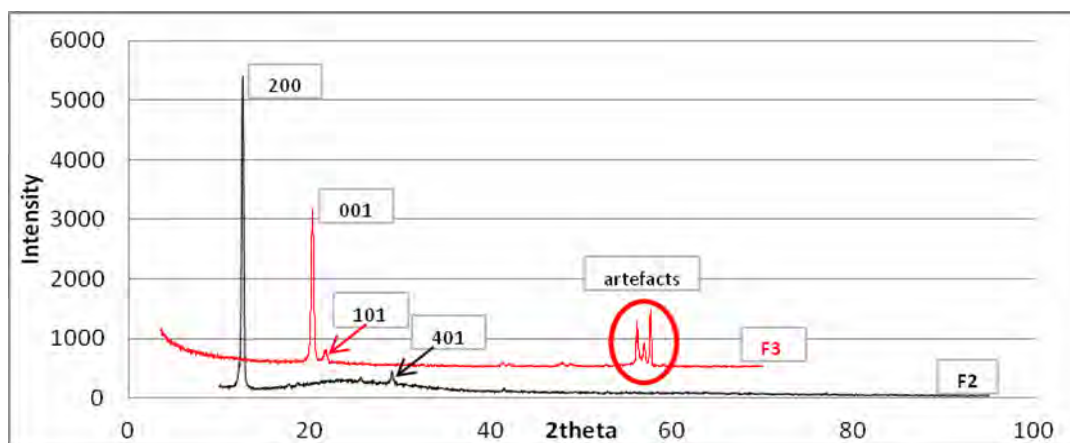


Fig. 4. Grazing incidence XRD of sample F2 and F3

Film F4 deposited on Si/SiO₂ substrate was prepared by vacuum annealing at 450 °C for 20 minutes. If glass substrate were used, the contamination would lead to undesirable product. The XRD of sample F4, right after vacuum annealing, is shown in fig. 5. Such

annealing causes the reduction of V_2O_5 and peaks belonging to non-thermochromic metastable vanadium dioxide $VO_2(B)$ appear clearly. In Bragg-Brentano geometry, the $(00l)$ peaks are the most intense and they reflect the orientation of the film towards the c -direction of the unit cell. Therefore, in the film F4, the metastable phase $VO_2(B)$ has an oriented structure.

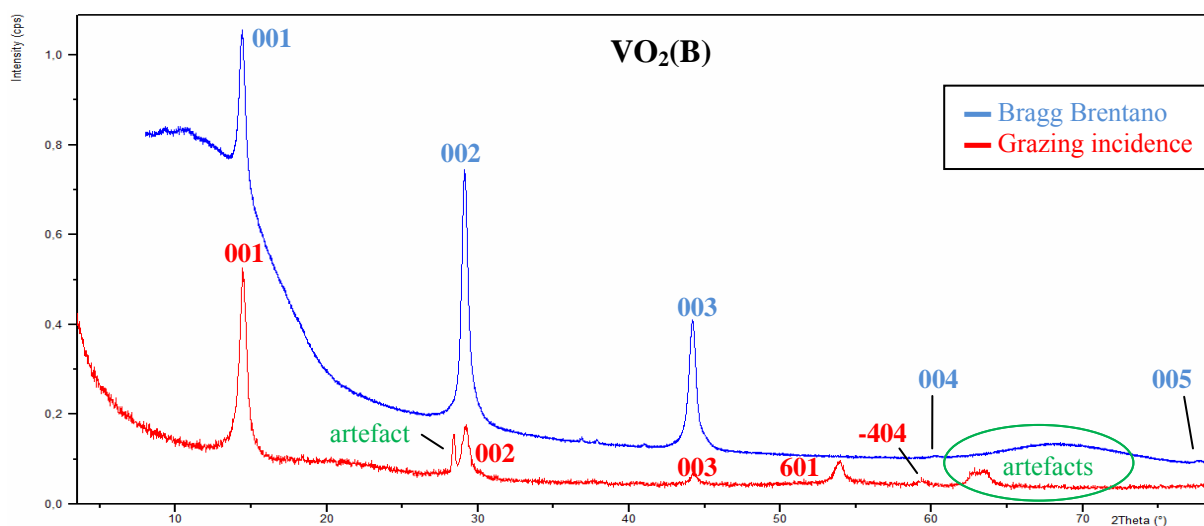


Fig. 5 Bragg-Brentano and grazing incidence XRD of sample F4 after vacuum annealing in air at 450 °C

It is then necessary to convert $VO_2(B)$ phase to thermotropic $VO_2(M)$ phase by subsequent annealing in argon atmosphere at 700 °C for 1 hour. The XRD of the sample F4 after this annealing is shown in fig. 6. Peaks of thermotropic phase of vanadium dioxide are present.

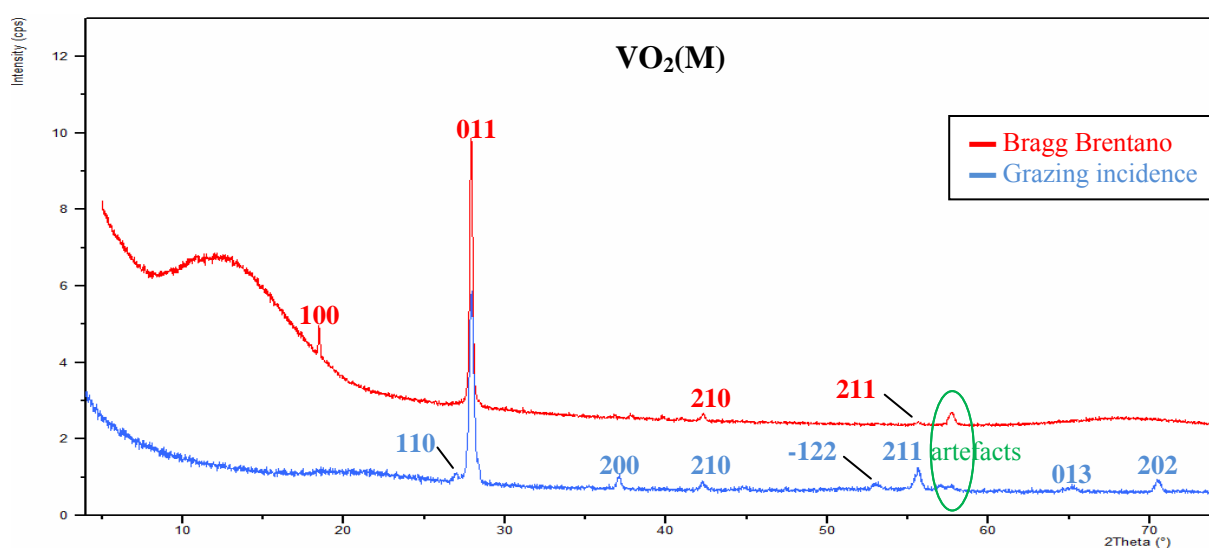


Fig. 6 Bragg-Brentano and grazing incidence XRD of sample F4 after subsequent annealing in argon at 700 °C

To check whether the thermotropic phase was successfully obtained, a test was

performed by heating the film from room temperature to 100 °C. This resulted in the change of colour from reddish brown i.e. semiconducting VO₂(M) to greenish blue i.e. metallic VO₂(R) at approximately 70 °C. This change of colour can be reversed during the cooling.

Conclusion

Thermotropic vanadium dioxide thin films were synthesized by vacuum annealing in air followed by subsequent annealing in argon under the normal pressure. The XRD method provided precious information about the different steps of the reaction such as reduction of vanadium pentoxide to metastable vanadium dioxide and its conversion to thermotropic phase. Thin films were deposited on Si/SiO₂ substrates to avoid contamination which occurred while using lime glass substrate.

Acknowledgment

The authors appreciate the support granted by the Scientific Grant Agency of the Slovak Republic (Project VEGA 1/0605/12) and Science and Technology Assistance Agency Slovakia (APVV) – project APVV-0199-10. This work was performed in cooperation with Ing. Maroš Gregor, PhD (annealing of films in vacuum) and Ing. Leonid Satrapinskyy, PhD (SEM and EDX measurements). The spin coating deposition was performed with help of Milan Kubinec and Doc. Ing. Karol Jesenák, PhD.

References

- [1] J. H. Day (1977) Encyclopedia of chemical technology, J. Wiley, New York, p. 232
- [2] H. N. Cui, V. Teixeira, L. J. Meng, et. al (2008) Thin Solid Films 516, p. 1484
- [3] P. Kiri, G. Hyett, R Binions (2010) Adv. Mater. Lett. 1, p. 86
- [4] R. B. Darling, S. Iwanaga (2009) Sadhana 34, p. 531
- [5] J. Livage (1999) Coord. Chem. Rev. 190, p. 391
- [6] G. Xu, P. Jin, M. Tazawa, K. Yoshimura (2005) Appl. Surf. Sci. 244, p. 449
- [7] Carl. M. Lampert (2004), Mater. Today 7, p. 28

Enantioméerna separácia s využitím nového typu chirálneho selektora

Marianna Moskaľová, Taťána Gondová

Univerzita P. J. Šafárika, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Moyzesova 11, 040 01 Košice, Slovenská republika; marianna.moskalova@gmail.com

Abstrakt

A new chiral stationary phase, RN CF6, was used for direct LC enantioseparation of new analogs of spiroindoline phytoalexins. The separations were performed under normal phase conditions. The effects of polar modifier, the mobile phase composition, and structures of the analytes on the separation were investigated.

KLúčové slová: *chirálna separácia; HPLC; cyklofruktán; fytoalexíny*

Úvod a formulácia cieľa

Chirálna separácia sú v centre pozornosti už niekoľko desaťročí najmä v oblasti analýzy liečiv a iných chirálnych biologicky aktívnych analytov. Najpoužívanejšou analytickou technikou na separáciu opticky aktívnych látok je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC). Táto metóda má širokú variabilitu v použití stacionárnych a mobilných fáz v porovnaní s inými separačnými technikami.

Cyklofruktány sú najnovším typom chirálnych selektorov, ktoré boli zavedené v roku 2009. Sú to cyklické oligosacharidy zložené z D-fruktofuranózových jednotiek spojených glykozidickou väzbou. Každá jednotka cyklofruktánu obsahuje jednu primárnu a dve sekundárne hydroxylové skupiny, ktoré zodpovedajú za hydrofilný charakter molekuly. Podľa toho, či sa v makrocyclickej kruhu nachádza 6, 7 alebo 8 fruktofuranózových jednotiek sa tieto zlúčeniny označujú ako CF6, CF7 a CF8.

Zistilo sa, že derivatizácia cyklofruktánu vedie k štruktúram, ktoré v závislosti od typu funkčných skupín môžu byť enantioselektívne pre rôzne typy opticky aktívnych zlúčenín. Najlepšie výsledky boli dosiahnuté derivatizáciou CF6. Chirálna stacionárna fáza na báze cyklofruktánu vykazuje vysokú stabilitu pre väčšinu organických rozpúšťadiel a môžu byť použité ako účinné selektory vo viacerých separačných technikách, napr. GC, HPLC, CE, SFC [1, 2].

Fytoalexíny sú prírodné nízkomolekulové sekundárne metabolity, ktoré sú produkované rastlinami, ak sú vystavené rôznym formám stresu, alebo mikroorganizmom. Tieto látky sú v centre záujmu najmä pre ich antibakteriálne, antitumorové a chemopreventívne účinky. Zistilo sa o i., že napr. zvýšená konzumácia zeleniny obsahujúca

tieto typy zlúčenín vďaka svojim antiproliferatívnym účinkom znižuje výskyt rôznych druhov nádorových ochorení u ľudí [3, 4].

Cieľom práce bolo štúdium separácie biologicky aktívnych analógov spiroindolínových fytoalexínov metódou HPLC s využitím nového typu chirálnej stacionárnej fázy, R-naftyletyl derivatizovaného cyklofruktánu 6 (RN CF6).

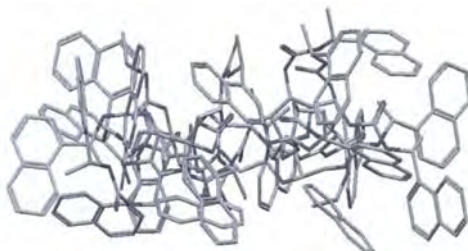
Materiál a metódy

Chromatografická analýza sa uskutočnila na kvapalinovom chromatografe zloženom z HPLC pumpy (model 802C, Gilson, Francúzsko), dávkovacieho ventilu (7725i, Rheodyne, USA), dávkovacej slučky s objemom 20 μ l, UV/VIS detektora s voliteľnou vlnovou dĺžkou (LC 75, Perkin-Elmer, USA), vyhodnocovacieho HPLC zariadenia Data Master (model 621, Gilson, Francúzsko) a integrátora Epson (model FX-500, Seiko, Japonsko). Na separáciu bola použitá chromatografická kolóna s chirálnou stacionárnou fázou na báze cyklofruktánu RN CF6 (250 x 4,6 mm i.d., 5 μ m, University of Texas, Arlington, USA). Prietok mobilnej fázy bol 0,8 ml/min. Detekcia sa uskutočnila pri vlnovej dĺžke 250 nm.

Racemické zmesi fytoalexínov boli syntetizované tímom prof. P. Kutschyho na Katedre organickej chémie PF UPJŠ v Košiciach. V práci boli použité organické rozpúšťadlá a chemikálie s čistotou HPLC a p.a.

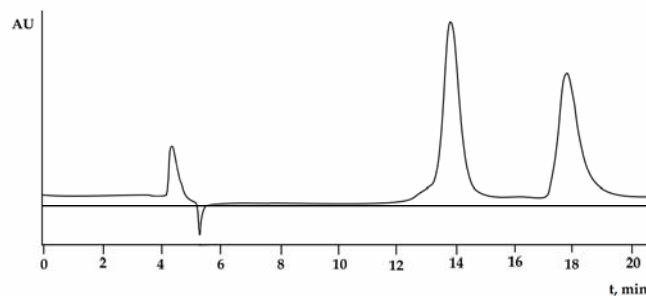
Výsledky a diskusia

Na HPLC separáciu racemátov biologicky účinných analytov bol použitý nový typ chirálnej stacionárnej fázy na báze cyklofruktánu 6, RN CF6 (Obr. 1).



Obr. 1 Štruktúra derivatizovaného cyklofruktánu 6 [1]

Štúdium chirálnej separácie sa uskutočnilo v mode normálnych fáz. Pri výbere optimálnych podmienok bol sledovaný vplyv typu polárneho modifikátora a zloženie mobilnej fázy na retenciu, enantioselektivitu a rozlíšenie. Pre väčšinu študovaných analytov boli dosiahnuté lepšie výsledky s použitím 2-propanolu ako modifikátora v mobilnej fáze s hexánom (Obr. 2).



Obr. 2 HPLC separácia racemickej zmesi analytu na kolóne s RN CF6

Vyhodnotené boli chromatografické parametre, retenčný faktor, enantioselektivita a rozlíšenie, pri optimálnych podmienkach separácie. Získané výsledky potvrdili, že enantioseparácia na RN CF6 je výrazne ovplyvnená štruktúrou analyzovaných enantiomérov.

Záver

Nový typ chirálneho selektora na báze cyklofruktánu 6, RN CF6, bol úspešne použitý na priamu separáciu racemátov novosyntetizovaných biologicky aktívnych analógov spiroindolínových fytoalexínov metódou HPLC. Najlepšie výsledky chirálnej separácie boli dosiahnuté v elučnom mode normálnych fáz s 2-propanolom ako polárnym modifikátorom. Nájdené boli optimálne podmienky separácie. Súčasne bol potvrdený vplyv štruktúry analytov na enantioseparáciu.

Pod'akovanie

Práca bola finančne podporená projektom VEGA 1/1096/12. Autori ďakujú prof. D. W. Armstrongovi za chromatografickú kolónu.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Sun P., Wang Ch., Breitbach S. Z., Zhang Y., Armstrong D. W. (2009) *Anal. Chem.* 81(24), p. 10215
- [2] Berthod A. (2010) *Chiral Recognition in Separation Methods: Mechanisms and Applications*. Springer – Verlag, Berlin, Germany, p. 77
- [3] Pilátová M., Šarišský M., Kutschy P., Miroššay A., Mezencev R., Čurilová Z., Suchý M., Monde K., Mirossay L., Mojžiš J. (2005) *Leuk. Res.* 29(4), p. 415
- [4] Mezencev R., Mojžiš J., Pilátová M., Kutschy P. (2003) *Neoplasma* 50(4), p. 239

Príprava nanotrúbiek TiO₂, štúdium ich morfológie a fotokatalytických vlastností

Martin Motola¹, Gustav Plesch¹, Leonid Satrapinsky²

¹ *Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra anorganickej chémie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika; martinmotola@gmail.com*

² *Univerzita Komenského, Fakulta matematiky, fyziky a informatiky, Katedra experimentálnej fyziky, 842 48 Bratislava, Slovenská republika*

Abstrakt

The present paper deals with the synthesis and characterization of titanium dioxide nanotubes (TNTs) for photocatalytic applications. Nanotubes were prepared by electrochemical anodic oxidation. The samples were heat treated by annealing to become photocatalytically active. Using scanning electron microscopy morphology of the nanotubes was studied. Phase composition of samples was measured by X-ray diffraction (XRD). The photocatalytic activity of nanotubes leads to decrease of the concentration of Rhodamine B during irradiation with UVA light. The photocatalytic activity of nanotubes was compared with the photocatalytic activity of Aeroxide P25 nanocrystalline titania powder. The best photocatalytic active show the samples annealed at 400 ° C.

Kľúčové slová : *Nanotrúbky TiO₂ (TNTs); Fotokatalýza; Elektrochemická anodická oxidácia*

Úvod a formulácia cieľa

TiO₂ sa v prírode vyskytuje vo forme minerálov s rôznou štruktúrou. Prakticky najvýznamnejšie modifikácie TiO₂ sú anatas a rutil. V štruktúre je každý kation Ti⁴⁺ obklopený šiestimi aniónmi O²⁻. Tieto dve kryštalové štruktúry ale nie sú úplne rovnaké. V štruktúre rutilu je každá oktaédrická bunka v kontakte s desiatimi susediacimi oktaédrickými bunkami, zatiaľ čo v anatase je oktaédrická bunka v kontakte s ôsmymi susediacimi oktaédrami. Tieto rozdiely v mriežkovej štruktúre majú za následok rôzne vlastnosti týchto dvoch foriem TiO₂, medzi ktoré patria aj ich fotokatalytické vlastnosti [1].

V súčasnosti poznáme viaceré techniky, pomocou ktorých vieme pripraviť nanomateriály na báze TiO₂. Veľmi efektívne metódy založené na chemických princípoch sú sól-gélová metóda, hydrotermálna syntéza a elektrochemická anodická oxidácia [2].

Materiál a metódy

V experimentoch sa používali vzorky titánu naprášaného metódou magnetronovej depozície na substrát SiPt (vrstva naprášovaného titánu 1 μm) o rozmeroch 15x10 mm s hrúbkou 0,2 mm. Po naprášení boli vzorky čistené ultrazvukom postupne v acetóne, izopropylalkohole a destilovanej vode po dobu 2 minút.

Elektrochemická anodická oxidácia bola realizovaná pri napätiach 10 – 70 V (zdroj

napätia - Manson SDP2405) s použitím titánového pliešku ako anódy a platinového drôtu ako katódy. Vzďialenosť medzi elektródami bola 3 centimetre a čas syntézy 30 minút. Elektrolyt obsahoval etylénglykol a 0,5 hm% NH₄F [4,5]. Po skončení syntézy sa vzorka TNTs premyla acetónom, izopropanolom a destilovanou vodou, aby sa odstránil zvyškový elektrolyt z povrchu vzorky.

Premyté a vysušené vzorky sa žihali v laboratórnej peci (Classic 3013 L) pri teplotách 400 a 500 °C počas 2 hodín (nárast teploty 10 °C/min) aby sa dosiahli fotokatalyticky aktívne vzorky (s fázovým zložením anatas). Morfologické vlastnosti (dĺžku, vnútorný a vonkajší priemer TNTs) sa sledovali REM (Lyra 3 Tescan). Fotokatalytické vlastnosti jednotlivých vzoriek sa sledovali Uv/Vis spektroskopiou (prístroj Jasco V-530) – zmenou absorbancie v maxime píku a tým znižovanie koncentrácie roztoku farbiva Rhodamine B [6]. Vzorky TNTs, na ktorých bola skúmaná fotokatalytická aktivita, boli pripravené pri napätí 40 V. Z nameraných údajov sa zostrojila závislosť úbytku koncentrácie farbiva Rhodamine B za čas ožarovania :

$$\ln \frac{c}{c_0} = f(t) \quad [\text{I.}]$$

Z nameraných hodnôt absorbancií, resp. úbytku koncentrácií sa vypočítali rýchlostné konštanty k zodpovedajúce reakcii prvého poriadku pre jednotlivé vzorky podľa vzťahu,

$$\ln \frac{c}{c_0} = k \times t \quad [\text{II.}]$$

Fotokatalytické vlastnosti vzoriek sa porovnávali so štandardom Aeroxid P25.

Výsledky a diskusia

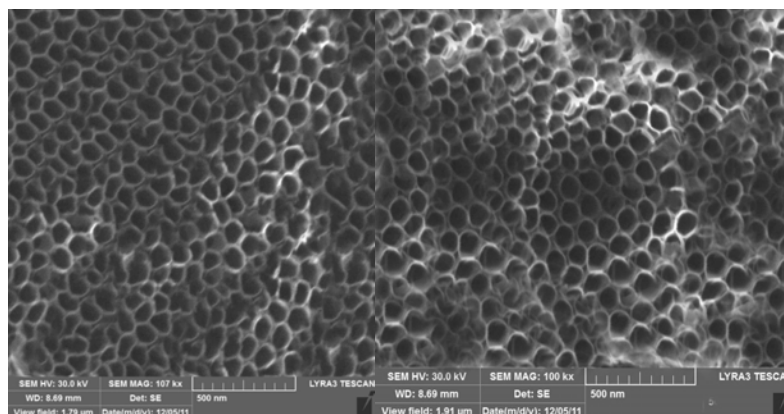
V nižšie uvedenej tabuľke (Tab. 1) sú uvedené niektoré morfologické vlastnosti pripravovaných TNTs :

Tab. 1 Vnútorný, vonkajší priemer a dĺžka TNTs (priemerné hodnoty) v závislosti od veľkosti napätia pri čase $t = 30$ min v elektrolyte (etylénglykol + 0,5 wt% NH₄F)

Napätie (V)	Vnútorný priemer (nm)	Vonkajší priemer (nm)	Dĺžka (nm)
10	.	.	.
40	44,48	72,72	185,6
60	53,17	80,57	185,9
70	92,47	140,35	186

Vonkajšie, vnútorné priemery a dĺžka TNTs závisí od veľkosti napätia a času, počas ktorého sú vzorky pripravované [7]. Pri napätí 10 V nebolo možné pozorovať morfológiu

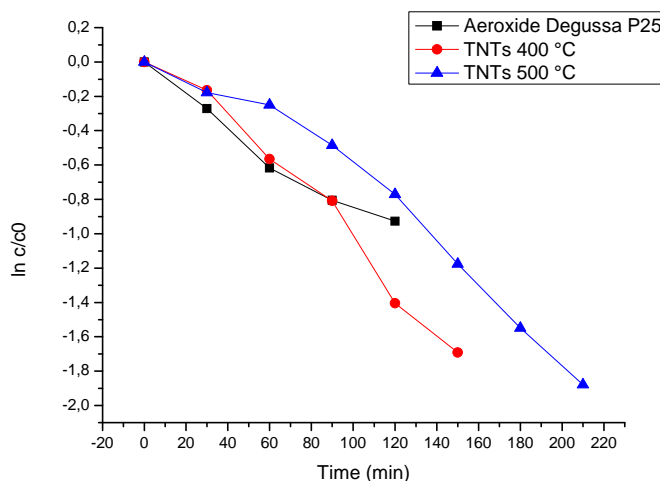
TNTs – napätie, pri súčasnom čase bolo príliš nízke, aby došlo k ich rastu. Dĺžky TNTs sa líšia so vzrastajúcim napätím o par desiatin nanometra, čo je v rozpore s literatúrou. Táto odlišnosť je pravdepodobne spôsobená rozdielnymi časmi, použitými pri syntéze. V spomínanej literatúre sa zisťovala dĺžka TNTs počas 24 – 96 hodín, na rozdiel od našich 30 minút. Vnútorne a vonkajšie priemery rastú so zvyšujúcim sa napätím.



Obr. 1 REM snímky TNTs pripravených elektrochemickou anodickou oxidáciou pri napätí 40 V a čase 30 min

Z difrakčných záznamov nebolo jednoznačné fázové zloženie našich vzoriek – dôvodom je, že steny TNTs sú relatívne tenké a slabo difraktujú. Difrakcie predstavujúce anatas nie sú na zázname zachytené, čo je spôsobené pravdepodobne zvolenou teplotou žihania. Pri 450 °C sa začína tvoriť kryštalická fáza rutilu a jej rast je omnoho intenzívnejší ako rast fázy anatasu.

Pre fotokatalytické odbúravanie farbiva Rhodamine B, ktorého časový priebeh je zobrazený na Obr.2, boli pre jednotlivé vzorky vypočítané rýchlostné konštanty podľa vzťahu [II] a sú uvedené v Tab. 2.



Obr. 2 Priebeh fotokatalytickej degradácie farbiva Rhodamine B, pri použití rôznych fotokatalyzátorov : – Aeroxid Degussa P25 ; -- TNTs žíhané pri 400 °C ; – TNTs žíhané pri 500 °C

Tab. 2 Rýchlostné konštanty pre jednotlivé vzorky

Vzorka	Teplota žíhania (°C)	k (s ⁻¹)	R ²
Aeroxid P25	·	0,02387823	0,9688
TNTs	400	0,01183417	0,9662
TNTs	500	0,00872485	0,9598

Samotné rýchlostné konštanty fotokatalytickej degradácie možno porovnávať pre vzorky s rovnakým obsahom katalyzátora. Je zrejme že vzorka TNTs žíhaná pri 400 °C má vyššiu fotokatalytickú aktivitu. Na orientačné porovnanie aktivity prášku a TNTs sa vyrátali špecifické aktivity jednotlivých vzoriek. Špecifická aktivita sa určila ako schopnosť fotokatalyzátora (1 miligram v prípade Aeroxide P25 a plochy nanotrubiek 1 cm² v prípade vzoriek TNT), rozložiť farbivo Rhodamine B za čas 60 minút. Výsledky sú v uvedené Tab. 3, kde špecifická aktivita predstavuje množstvo rozloženého farbiva Rhodamine B uvedenú v móloch.

Tab. 3 Špecifické aktivity pre jednotlivé vzorky

Vzorka	m (mg)	S (cm ²)	t (min)	Špecifická aktivita (mol)
Aeroxide P25	1	·	60	5.10 ⁻⁷
TNTs – 400 °C	·	1	60	4,32.10 ⁻⁸
TNTs – 500 °C	·	1	60	2,21.10 ⁻⁸

Z vypočítaných hodnôt špecifických aktivít (Tab. 3) sa dajú porovnať vzorky TNTs žíhaných pri rôznych teplotách, s rôznymi plochami. Vzorka TNTs žíhaná pri teplote 400 °C vykazuje lepšiu špecifickú fotokatalytickú aktivitu ako vzorka TNTs žíhaná pri teplote 500

°C. Vzorka TNT o ploche $1,5 \text{ cm}^2$ žíhaná pri teplote $400 \text{ }^\circ\text{C}$, resp. $500 \text{ }^\circ\text{C}$ má rovnakú špecifickú aktivitu ako $0,13 \text{ mg}$, resp. $0,066 \text{ mg}$ nanokryštalickej vzorky Aeroxide P25.

Záver

Z experimentálnych výsledkov môžno povedať, že dĺžka TNT nezávisí vo veľkej miere od napätia použitého počas syntézy, ale vo vyššej miere od času. Dĺžky TNT pripravených elektrochemickou anodickou oxidáciou sa pohybovali v rozmedzí $185,6 - 186$ nanometrov. Vonkajšie ($72,72\text{nm}$; $80,57\text{nm}$; $140,35\text{nm}$) a vnútorné ($44,48\text{nm}$; $53,17\text{nm}$; $92,47\text{nm}$) priemery TNTs sa zväčšovali so zvyšujúcim sa napätím (40V ; 60V ; 70V). Fotokatalytická aktivita vzoriek žíhaných pri rôznych teplotách sa sledovala ako úbytok koncentrácie farbiva Rhodamine B v závislosti od času počas ožarovania ortuťovou UV výbojkou s intenzitou svetla $6,56 \text{ mW/cm}^2$ a následne porovnali so štandardom Aeroxide P25. Fotokatalyticky aktívnejšou vzorkou TNTs je vzorka TNTs žíhaná pri teplote $400 \text{ }^\circ\text{C}$ ($k=0,0118 \text{ s}^{-1}$), ktorá fotokatalyticky degradovala farbivo Rhodamine B v porovnaní so vzorkou žíhanou pri $500 \text{ }^\circ\text{C}$ ($k=0,009 \text{ s}^{-1}$) pri rovnakých podmienkach o 60 minút skôr.

Pod'akovanie

Autori práce ďakujú za podporu udelenou vedeckou grantovou agentúrou (VEGA) Slovenskej republiky (projekt VEGA 1/0605/12) a agentúrou pre vedu a výskum (APVV) – projekt APVV-0199-10.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Yoon-chae N., Indhumati P., Schmuki P. (2010) Chem. Phys. Chem., p. 2698
- [2] Hsin-hung O., Shang-lien L. (2007) Sep. Purif. Technol. 58, p.179
- [3] Thostenson E.T., Zhifeng R., Tsu-Wei Ch. (2001) Compos. Sci. Technol. 61, p. 1899
- [4] Fabregat-santiago F., Barea E.M., Bisquert J., et al. (2008) J. Am. Chem. Soc., p.15
- [5] Bisquert J., Fabregat-santiago F., Mora-sero I., et al. (2007) Inorganica Chim. Acta., p.684
- [6] Umar I.G., Abdul H.A. (2008) J. Photoch. Photobio. C 208(9), p.1
- [7] Grimes C.A., Mor G.K. (2009) TiO₂ Nanotube Arrays - Synthesis, Properties, and Applications. Springer, USA, p.379

Určovanie hyperpolarizovateľnosti molekúl metódou hyper-Rayleighovho rozptylu

Eva Noskovičová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyzikálnej a teoretickej chémie, Mlynská dolina, 84215 Bratislava, Slovensko, noskoviov.nereyn.eval@gmail.com

Abstract

In this work, the second harmonic frequency was generated by the laser radiation. The 800 nm output wavelength of a Ti:Sapphire laser system was used as the pump source. The second-order nonlinear optical response is detected at 400 nm. We have observed changes in the intensity of the second harmonic depending upon the concentration of the sample and the change in input intensity. The samples were dilute solutions (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 mmol.dm⁻³) crystal violet.

KLúčové slová: generácia druhej harmonickej frekvencie; metóda hyper-Rayleighovho rozptylu

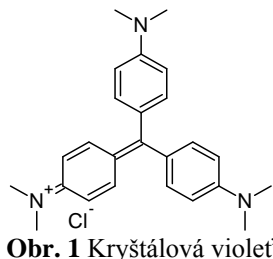
Úvod a formulácia cieľa

Elektromagnetické žiarenie, ktorého elektrická intenzita je porovnateľná s intenzitou vlastného poľa atómu a teda má hodnotu $10^9 - 10^{11}$ m/V môže vyvolať nelineárnu odozvu prostredia. Takáto odozva sa potom prejaví generáciou vyšších harmonických frekvencií (druhého rádu, tretieho rádu...). [1] Prostredia, ktoré prejavujú intenzívnu generáciu vyšších harmonických sú potenciálne využiteľné v oblasti komunikačných technológií a preto je záujem študovať danú problematiku.

Generáciu druhej harmonickej frekvencie je možné charakterizovať viacerými metódami. Jednou z nich je metóda hyper-Rayleighovho rozptylu (Hyper-Rayleigh Scattering, HRS) [2, 3], čo je vlastne metóda na určenie hyperpolarizovateľnosti. Hyperpolarizovateľnosť je vlastne nelineárna polarizovateľnosť prvého rádu. Prechodom laserového lúča cez kvapalnú vzorku sa pri tejto metóde generuje žiarenie s frekvenciou dvojnásobnou, oproti vstupnému žiareniu. Touto metódou sa potom dá určiť hyperpolarizovateľnosť dvoma spôsobmi. Prvým zo závislosti intenzity druhej harmonickej frekvencie od koncentrácie vzorky v roztoku, ktorá by mala byť lineárna. A druhým z kvadratickej závislosti intenzity druhej harmonickej od intenzity vstupnej frekvencie. Táto metóda však nie je fundamentálnou a na výpočet hyperpolarizovateľnosti je potrebná jej známa hodnota z iných metód. Použiť sa môže známa hodnota hyperpolarizovateľnosti danej meranej látky alebo rozpúšťadla. Táto metóda má však niektoré významné výhody. Merané látky nemusia mať permanentný dipólový moment,

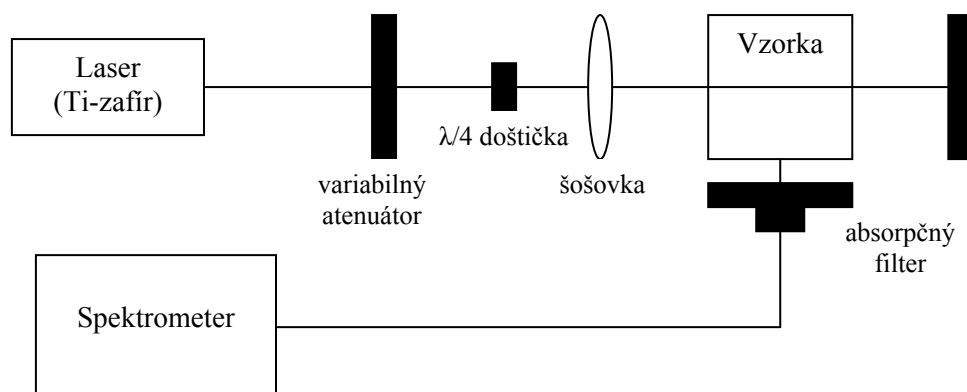
nevyžaduje sa prítomnosť statického elektrického poľa (EFISH) a metóda je experimentálne jednoduchá.

Materiál a metódy



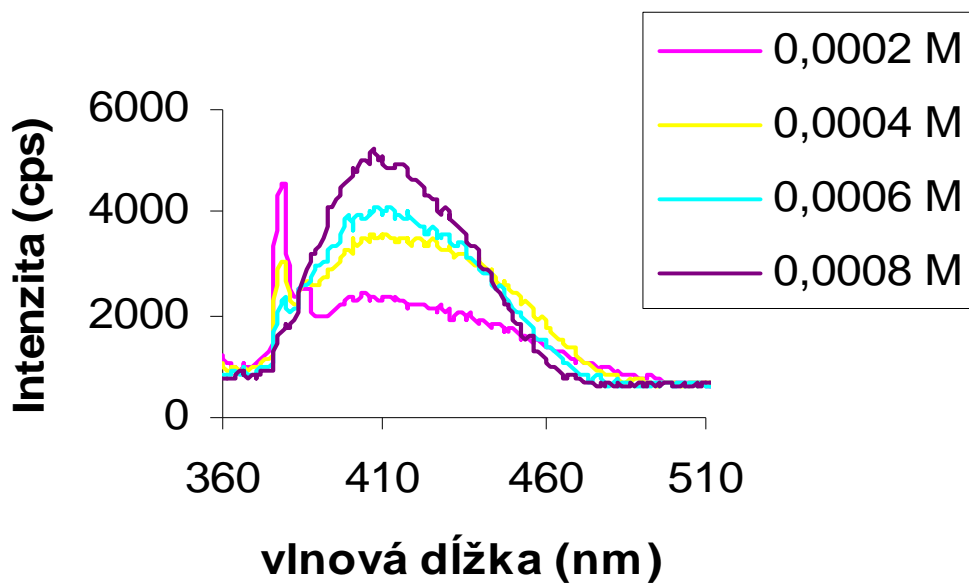
Na experiment boli použité nasledovné koncentrácie roztokov kryštálovej violete v metanole: 0,2; 0,4; 0,6 a 0,8 mmol.dm⁻³.

V tomto prípade bolo meranie uskutočnené podľa schémy zobrazenej na obrázku obr. 2. Ako budiaci zdroj sa použil titán-zafírový laserový systém Coherent Legend Duo USX/USP s výstupnou vlnovou dĺžkou 800 nm. Laser generuje impulzy s dĺžkou 100 fs s energiou v pulze 4 mJ a s opakovacou frekvenciou 3 kHz. Keďže na experiment bol potrebný menší výkon systému, tak sa deličom laserového zväzku z neho izolovalo a použilo len 10%. Takéto žiarenie dopadá na variabilný atenuátor, ktorým sa jemne doladí potrebná intenzita. Lúč definovanej intenzity potom dopadá na štvrtvlnovú doštičku, ktorá potlačuje konkurenčnú dvojfotónovú fluorescenciu. Ďalej je šošovkou s ohniskovou vzdialenosťou 300 mm fokusovaný na vzorku roztoku kryštálovej violete, ktorá je umiestnená v kremennej kyvete. Vystupujúci hyper-Rayleighov signál, ktorý dopadá na absorpčný filter je potom extrahovaný kolmo na smer vstupujúceho žiarenia a cez vlákno prechádza do spektrometra OceanOptics HR4000.

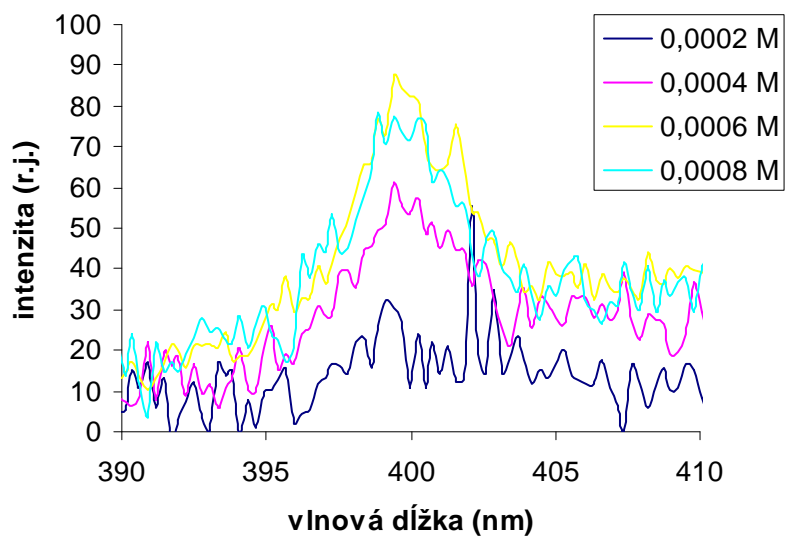


Obr. 2 Schéma merania

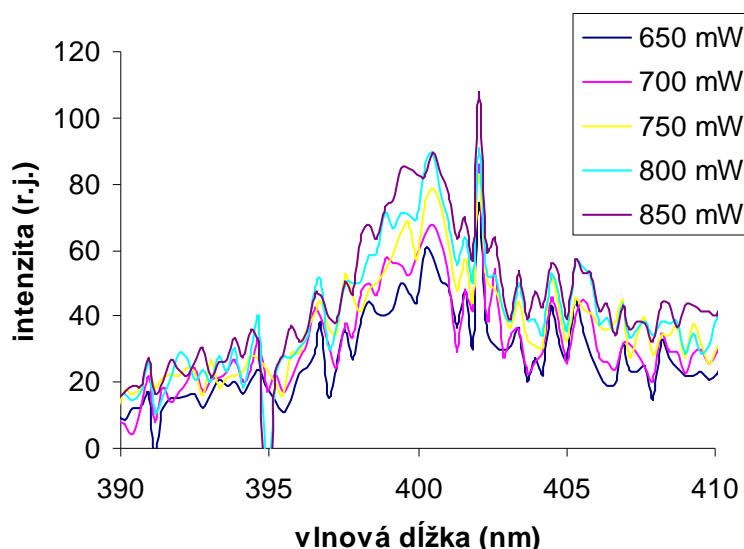
Výsledky a diskusia



Obr. 3 Emisné spektrum kryštálovej violete v metanole



Obr. 4 Signál druhej harmonickej frekvencie pre rôzne koncentrácie kryštálovej violete



Obr. 5 Signál druhej harmonickej frekvencie kryštálovej violete pri rôznych vstupných intenzitách

Na obrázku obr. 3 sú zobrazené emisné spektrá kryštálovej violete pri rôznych koncentráciách, keď bola látka excitovaná vlnovou dĺžkou 340 nm. Tým sa zistila vlnová dĺžka emisného maxima, ktoré vyšlo okolo 410 nm a zároveň sa potvrdila relatívne nízka vlastná absorpcia vzorky na vlnovej dĺžke 400 nm. Na obrázku obr. 4 a 5 je zobrazený emisný pík druhej harmonickej s vlnovou dĺžkou 400 nm, ktorý bol vygenerovaný vlnovou dĺžkou 800 nm pri vysokých vstupných intenzitách 10^{14} W/cm². To znamená, že roztok kryštálovej violete v metanole môže byť za vhodných podmienok (udané intenzity a koncentrácie, viď obr. 4, 5) nelineárnym prostredím použiteľným pre generáciu druhej harmonickej na vlnovej dĺžke 800 nm.

Na obrázku obr. 4 je signál druhej harmonickej získaný v závislosti od rôznych koncentrácií. Intenzita tohto signálu, pri koncentráciách od 0,2 – 0,6 mM, stúpa v závislosti od zvyšujúcej sa koncentrácie látky v roztoku. To znamená, že s rastúcou koncentráciou molekúl narastala intenzita druhej harmonickej približne lineárne. Pri koncentrácii 0,8 mM, to však už podľa tohto merania neplatí a dochádza k saturácii. Pri tejto koncentrácii je preto potrebné zahrnúť korekciu o Lambert-Beerov absorpčný člen $10^{-\epsilon lc}$. [3] Na obr. 5 je signál druhej harmonickej frekvencie zobrazený v závislosti od meniacej sa vstupnej intenzity. S narastaním vstupnej intenzity narastá aj intenzita druhej harmonickej frekvencie.

Záver

Roztok kryštálovej violete v metanole môže byť za podmienok pri ktorých sa uskutočnilo meranie (intenzity na úrovni 10^{14} W/cm² a koncentrácie 0,2-0,8 mmol.dm⁻³) vhodným nelineárnym prostredím. Z uvedených meraní je potom možné vypočítať hyperpolarizovateľnosť.

Pod'akovanie

Moje pod'akovanie patrí Doc. Ing. D. Veličovi, PhD., RNDr. D. Lorencovi, PhD. a Mgr. E. Jánému.

Použitá literatúra

- [1] Štrba A., Mesároš V., Senderáková D. (2012) Nelineárna optika. In: Štrba A., Mesároš V., Senderáková D. Optika. Enigma publishing, Nitra, SR, p. 371
- [2] Sutherland D.R. (2003) Hyper-Rayleigh Scattering. In: Sutherland D.R. Handbook of Nonlinear Optics, Second Ed. Marcel Dekker, New York, p.286
- [3] Franz E., Harper C. E., Coe J. B., Zahradník P., Clays K., Asselberghs I. (2008) Proc. of SPIE 6999, p.1

Štúdium procesu gelácie izopropoxidu titaničitého metódou pozitronovej anihilačnej spektroskopie

Daniela Nýblová¹, Ondrej Šauša², Karol Jesenák¹

¹ *Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra anorganickej chémie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
daniela.nyblova@gmail.com*

² *Slovenská akadémia vied, Fyzikálny ústav, Dúbravská cesta 9, 845 11 Bratislava, Slovenská republika*

Abstrakt

Thank to its harmlessness titanium dioxide is widely utilized material. One of the new areas to use titanium dioxide is photocatalysis, which could be the way to e.g. remove organic pollutants from water or air. Titanium dioxide based gels are perspective form of TiO₂ for photocatalysis because of their high porosity thus high surface area. Positron annihilation spectroscopy is a physical method to study microporous structure and electron energy distribution in materials. We studied gelation process of titanium isopropoxide in ethanol with various amount of water catalyzed by hydrochloric acid by positron annihilation lifetime spectroscopy and doppler broadening of annihilation line in this work. Positronium is weakly formed in TiO₂ in general wherefore it cannot be monitored by positron annihilation spectroscopy very well. Gelation process can be monitored through pick-off annihilation of ortho-positronium.

Kľúčové slová. *titanium isopropoxide; gelation process; positron annihilation spectroscopy*

Úvod a formulácia cieľa

Oxid titaničitý je látka, ktorá sa využíva v širokom spektre odvetví, napríklad v elektrotechnike, chemickom, farmaceutickom a kozmetickom priemysle. Jej rozsiahle využitie súvisí s tým, že stupeň zdravotných rizík pri jeho používaní je veľmi nízky.

Perspektívnou oblasťou pre jej využitie je fotokatalýza, ktorá je momentálne predmetom rozsiahleho celosvetového výskumu [1]. Fotokatalytické vlastnosti oxidu titaničitého môžu mať významné environmentálne uplatnenie, napríklad pri čistení vôd a vzduchu od organických polutantov alebo pri výrobe povrchov s antibakteriálnymi a samočistiacimi vlastnosťami. Oxid titaničitý sa priemyselne vyrába v rôznych formách, medzi ktoré patria aj gély na báze oxidu titaničitého pripravené sôl-gélovými metódami. Tieto gély môžu byť východiskovými látkami pre výrobu mnohých typov katalyzátorov na báze oxidu titaničitého. Sôl-gélovými metódami sa gély na báze oxidu titaničitého pripravujú polymerizačnými reakciami - hydrolýzou a kondenzáciou z roztokov solí titánu (najmä z alkoxidov) v roztokoch alkoholov za prítomnosti katalyzátorov.

Cieľom tejto práce je charakterizovanie zmien počas gelačnej reakcie izopropoxidu titaničitého (TTIP) katalyzovaného kyselinou chlorovodíkovou metódou pozitronovej

anihilačnej spektroskopie (PAS) s cieľom zistenia, či rast polymérnej siete TiO_2 vo výraznom nadbytku organického rozpúšťadla možno identifikovať metódou PAS.

Pozitrónová anihilačná spektroskopia je metóda, ktorou možno skúmať mikroštruktúru látok z hľadiska voľného objemu nachádzajúceho sa v látke a z hľadiska energetického stavu elektrónov v nej obsiahnutých. Táto metóda je použiteľná pre stanovenie veľkostí pórov s rozmermi od 0,2 do 50 nm. Jej veľkou výhodou je, že samotné meranie nevyvoláva v meranej vzorke žiadne identifikovateľné zmeny. V tejto práci sme skúmali geláciu TTIP dvomi metódami využívajúcimi anihiláciu pozitronov: časovú pozitronovú anihilačnú spektroskopiu (PALS), pri ktorej sa na zistenie veľkosti defektov využívajú doby života pozitronov (τ) a meranie dopplerovského rozšírenia anihilačnej čiary (DBAL), pri ktorom sa energetické rozdelenie anihilujúcich elektrónov látky charakterizuje S a W parametrami. S parameter vyjadruje príspevok anihilačných udalostí s elektrónmi nízkych energií, W parameter príspevok anihilačných udalostí s elektrónmi s vysokými energiami.

Materiál a metódy

Príprava TiO_2 gélov

TiO_2 gély boli pripravené modifikáciou postupu uvedeného v práci [2]. Do kadičky bolo napipetovaných 2,5 ml izopropoxidu titaničitého (97 %, Sigma-Aldrich Co. LLC; USA), ku ktorému bolo pridaných 10 ml bezvodého etanolu (99,8 %, CentralChem, s. r. o.; Slovenská republika) a 0,1 ml HCl (36 %, CentralChem, s. r. o.; Slovenská republika). Roztok bol miešaný magnetickým miešadlom 2 minúty (250 ot./min), potom bola pridaná destilovaná voda s objemom 0,2 - 0,4 ml (tab. 1), následne bol roztok miešaný ďalšie 2 minúty.

Pozitrónová anihilačná spektroskopia

PALS merania boli merané na aparátúre pozostávajúcej zo scintilačných detektorov, diskriminátorov konštantnej frakcie (ORTEC; USA) a časovo-amplitúdového konvertora (ORTEC; USA). Časové rozlíšenie aparátúry bolo 320 ps (FWHM). Scintilačné detektory pozostávali z plastických scintilátorov PILOT (Picron; USA) a fotonásobičov XP2020UR (Picron; USA).

Aparatúra na meranie DBAL pozostáva z HPGe polovodičového detektora PGT s energetickým rozlíšením cca 1,9 keV / 1274,5 keV a spektroskopického zosilňovača.

Na vyhodnotenie časových spektier sme použili štandardný súbor programov POSFIT [3].

Výsledky a diskusia

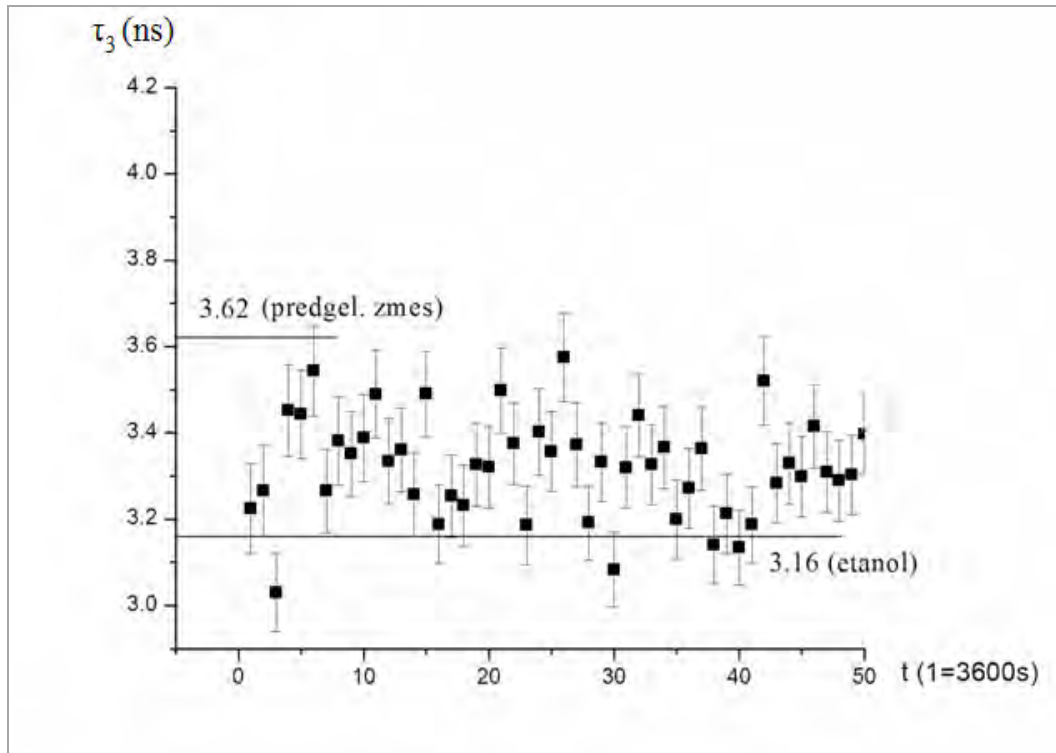
Štyri vzorky TiO₂ gélov pripravené s rôznymi množstvami vody boli merané metódami PALS a DBAL. Ich označenie a približné doby gelácie kontrolnej vzorky určené vizuálne sú uvedené v tab. 1.

Tab. 1 Označenie vzoriek TiO₂ gélov, použité množstvá vody pri ich príprave a doby ich gelácie

označenie vzorky	V (H ₂ O)	doba gelácie
<i>Gél 1*</i>	0,3 ml	> 4 mesiace
<i>Gél 2</i>	0,3 ml	7 - 23 h
<i>Gél 3</i>	0,2 ml	98 - 144 h
<i>Gél 4</i>	0,4 ml	5 h

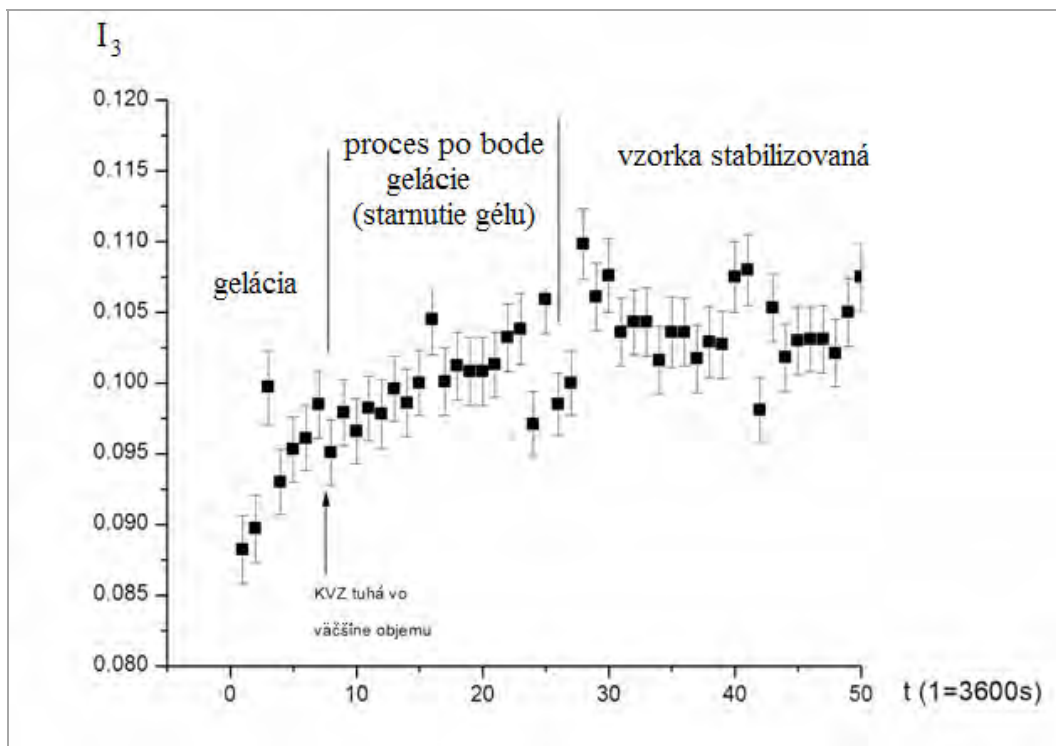
* Vzorka Gél 1 bola pripravená iným spôsobom, ako ostatné vzorky. Predgelačná zmes bola vopred ochladená. Do takejto predgelačnej zmesi bola pridaná destilovaná voda, čo malo za následok výrazné predĺženie doby gelácie vzorky Gél 1.

Intenzity dôb života merané u vzoriek TiO₂ gélov boli všeobecne nízke. Doby života τ_3 a intenzity I_3 pre vzorku *Gél 4* merané PALS metódou sú zobrazené na obr. 1 resp. 2. Jednotlivé časové spektrá sa zapisovali po každej hodine a celé meranie trvalo 50 h.



Obr. 1 Doby života τ_3 v čase u vzorky Gél 4

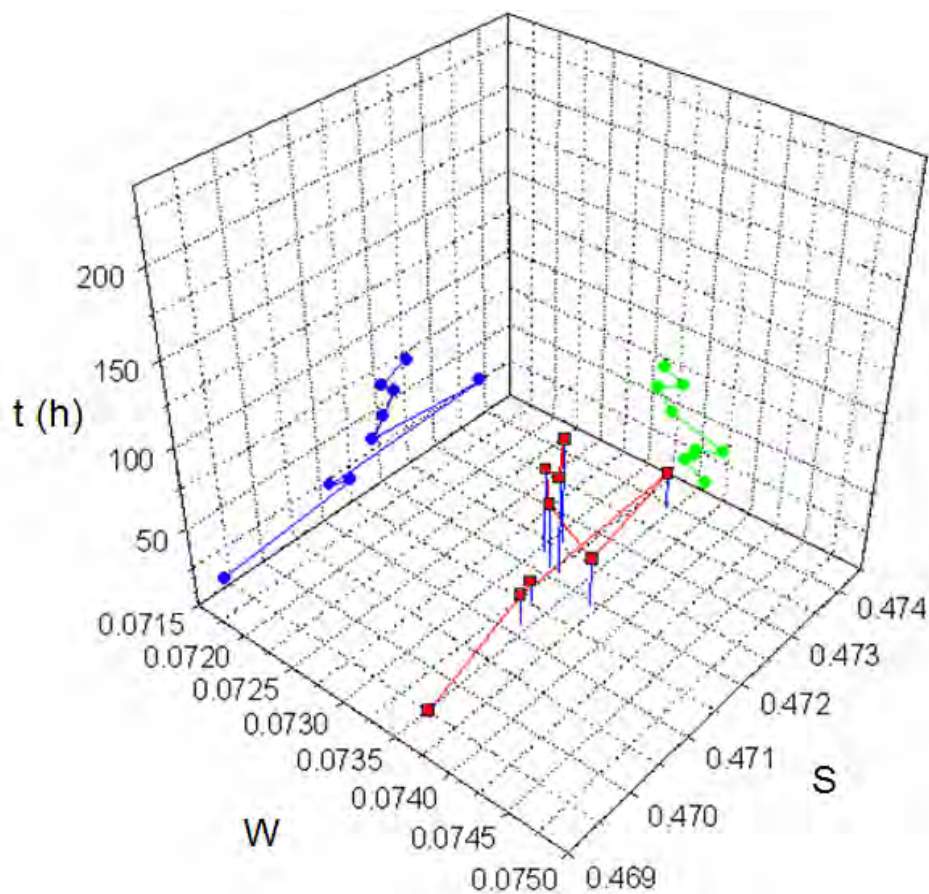
Hodnota strednej doby života orto-pozitrónia τ_3 (obr. 1) ostáva v rámci chýb merania konštantná, pričom je vyššia ako v čistom etanole a nižšia ako v predgelačnej zmesi, čo je zmes izopropoxidu titaničitého, etanolu a HCl bez pridanej vody, a v ktorej gelačná reakcia neprebíha. Približný priemer pórov zistený z τ_3 komponenty podľa [4] je 0,8 nm.



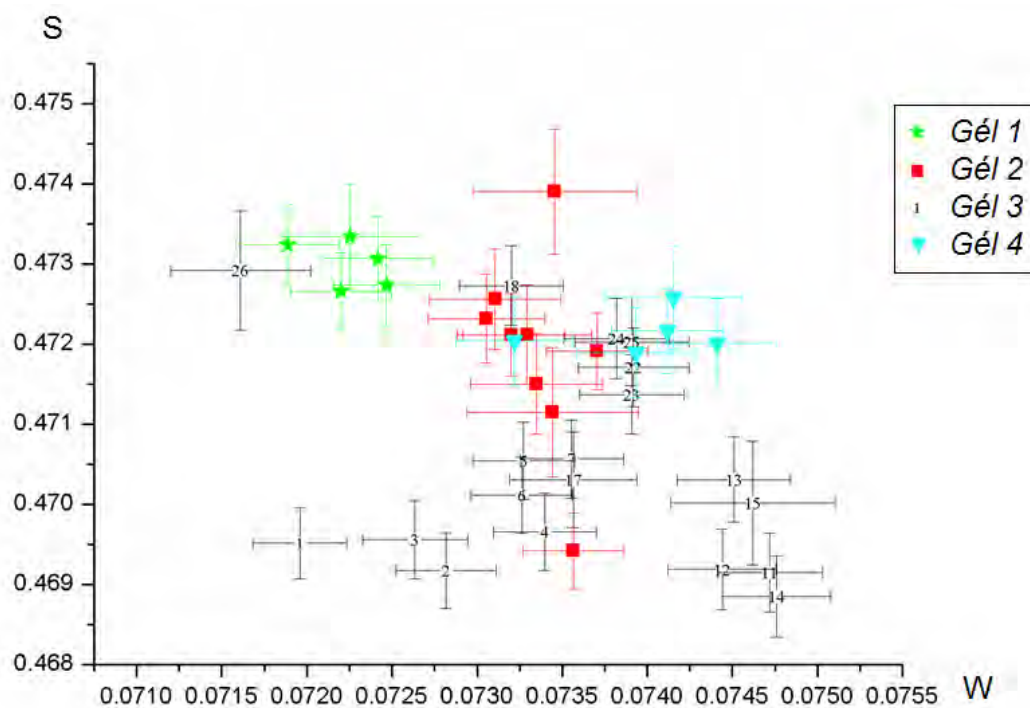
Obr. 2 Významné zmeny I_3 v čase u vzorky Gél 4. Trojkomponentný fit, POSFIT, krátke komponenty zaфикované.

Na procesy gelácie prebiehajúce vo vzorke *Gél 4* je citlivá hlavne intenzita I_3 (obr. 2), ktorá zodpovedá tzv. pick-off anihilácii orto-pozitrónia. Doba gelácie kontrolnej vzorky pozorovaná vizuálne bola približne 5 h. Z grafu na obr. 2 vidieť, že hodnota I_3 rastie s časom až do doby po vizuálne určenej dobe gelácie. Tieto procesy môžeme pripísať samotnej gelácii a následnému tzv. starnutiu gélu, ktoré býva spravidla dlhším procesom ako proces gelácie. Namerané spektrá vykazujú menšie hodnoty I_3 na konci gelačného procesu, kde sa už I_3 nemení v čase, než u vzorky etanolu ($17,6 \pm 0,1$ %). Na začiatku procesu sú hodnoty I_3 o niečo vyššie než má predgelačná zmes obsahujúca HCl ($6,2 \pm 0,1$ %).

V našich experimentoch meraných DBAL metódou vidieť značné rozdiely v časovom priebehu S a W parametrov. Na obr. 3 je zobrazený časový priebeh S a W parametrov vzorky *Gél 2* s relatívne krátkou dobou gelácie. Zaznamenané hodnoty S a W parametrov pre vzorky *Gél 1* až *Gél 4* s rôznym množstvom vody a tým pádom aj dobou gelácie vidieť na obr. 4.



Obr. 3 SW graf vzorky Gél 2 v čase



Obr. 4 Hodnoty S a W parametrov vzoriek Gél 1 - 4. U najdlhšie prebiehajúcej gelácie (vzorka Gél 3) je časové poradie hodnôt označené číslami.

Možno konštatovať, že žiadne významné zmeny S a W parametrov nevidno u vzorky *Gél 1*, ktorej kontrolná vzorka nezgelovatela v priebehu merania PAS. Všetky vzorky, ktoré sa úplne premenili na gél, mali nízku hodnotu S parametra v primárnom roztoku, pričom v procese gelácie došlo k jeho zvýšeniu a po skončení procesu ostal zvýšený. W parameter narastal v procese gelácie (s výnimkou *Gél 2*) a v procese po bode gelácie klesal.

Záver

Merania pozitronovej anihilačnej spektroskopie ukázali všeobecne nízku tvorbu pozitronia v oxide titaničitom. Taktiež chlór obsiahnutý v zmesiach potláča tvorbu pozitronia.

Priebeh gelácie izopropoxidu titaničitého je možné sledovať časovou pozitronovou anihilačnou spektroskopiou prostredníctvom intenzity pick-off anihilácie orto-pozitronia (I_3), ktorá sa počas gelácie a v procese starnutia gélu zvyšuje, v stabilizovanej vzorke ostáva konštantná.

Merania dopplerovského rozšírenia anihilačnej čiary ukázali, že v predgelačných zmesiach mal S parameter nízku hodnotu, v procese gelácie sa jeho hodnota zvýšila a po stuhnutí vzorky sa nezmenila, ostala zvýšená. V našich meraniach W parameter vo väčšine vzoriek gélov v procese gelácie narastá, v procese po bode gelácie klesá. Procesy gelácie izopropoxidu titaničitého teda možno sledovať aj prostredníctvom metódy dopplerovského rozšírenia anihilačnej čiary, avšak interpretácia týchto spektier nie je jednoznačná.

Pod'akovanie

Ďakujeme grantovej agentúre VEGA za finančnú podporu projektu č. 1/0605/12 a projektu č. 2/0099/10.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Vargová M. (2011) Fotokatalyticky aktívne hrubé vrstvy oxidu titaničitého na makropórovitých keramických penách. (Dizertačná práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava
- [2] Yoldas B. E. (1986) Journal of Material Science 21, p. 1087
- [3] Kirhegaard P., Pedersen N. J, Eldrup M. (1989) PATFIT-88 Package, Riso-M-2740
- [4] Zaleski R. (2002) Positronium Lifetime vs. Temperature and Free Volume Size Tables. Pick-off Model Calculations, Institute of Physics, Maria Curie-Sklodowska University, Lublin, Poľsko

Kvantovochemické výpočty glykoláto-peroxidokomplexu vanádu(V) s hexaakvazinočnatým katiónom

Gabriela Orešková

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra anorganickej chémie,
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika,
oreskova@fns.uniba.sk*

Abstrakt

Geometries and spectral properties of anion $[\text{V}_2\text{O}_2(\text{O}_2)_2(\text{glyc})_2]^{2-}$ and cation $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ were theoretically studied by quantum-chemical calculations in the gas phase.. Geometry optimization was performed using DFT with various functionals (BP86, B3LYP and CAM-B3LYP). The best agreement with the experimental data has been obtained using BP86 with Wachters+f basis set for vanadium atom and 6-31G* for zinc atom. Subsequent vibrational analysis provided a fair agreement with experimental IR and Raman spectra.

Kľúčové slová: DFT výpočty; geometria molekúl; IČ; glykoláto-peroxidokomplexy vanádu

Úvod a formulácia cieľa

Štúdium peroxidokomplexov vanádu predstavuje v koordinačnej chémii širokú a stále aktuálnu oblasť výskumu. Komplexy vanádu(V) majú značný význam v oblasti katalýzy, fungujú ako efektívne prenášače kyslíka pri oxidácii organických zlúčenín pomocou peroxidu vodíka. V posledných rokoch boli dosiahnuté tiež zaujímavé výsledky v bioanorganickej chémii vanádu: ukázalo sa, že peroxidokomplexy vanádu zosilňujú účinok inzulínu (majú tzv. inzulín-mimetickú schopnosť) a testované boli aj ich protinádorové účinky. Potvrdilo sa, že účinnosť peroxidovanadičnanov možno výrazne ovplyvňovať substitúciou vhodného organického ligandu.

Anióny α -hydroxykarboxylových kyselín sa zapájajú do procesov prebiehajúcich v živých organizmoch (syntéza chlorofylu, Krebsov cyklus, Coriho cyklus a fotorespirácia). Syntéza a charakterizácia peroxidovanadičnanov s týmito biogénnymi ligandami je preto zaujímavá najmä z hľadiska ich potenciálneho využitia v bioanorganickej chémii.

V súčasnosti kvantovochemické výpočty dokážu s veľmi dobrou presnosťou interpretovať parametre experimentálne zistených štruktúr a v niektorých prípadoch dokonca predpovedať vlastnosti, ktoré nie sú známe z experimentu.

Pri výpočtoch glykoláto-peroxidokomplexu vanádu(V) s hexaakvazinočnatým katiónom sme vychádzali z experimentálnych prác na našej katedre, ktoré sa zaoberali peroxidokomplexami vanádu(V) s rôznymi organickými ligandami ako aj s rôznymi

komplexnými kationmi, ich štruktúrou a spektrálnymi vlastnosťami. Na základe uvedených prác môžeme porovnávať vypočítané výsledky s experimentálne zistenými a taktiež vypočítať vlastnosti, ktoré nie sú známe z experimentu.

Výpočtom napr. hexaakvanikelnatým komplexom sa zaoberal Bustamante et al. [1] a Varadwaj et al. [2], ktorí optimalizovali geometrie pomocou rôznych DFT funkcionálov (B3LYP, BPW91) v báze 6-311+G(d,p) pre všetky atómy a počítali aj IČ spektrum týchto komplexov rovnakými funkcionálmi a bázami. V práci od autorov Gilson et al. [3] sú počítané geometrie komplexov s hexaakvakobaltnatým kationom a takisto aj IČ a Ramanove spektrá, charakterizáciu podobných komplexov spravili aj Faherty et al [4].

Naším cieľom je pomocou kvantovochemických výpočtov v plynnej fáze popísať geometrie, IČ a Ramanove spektrá týchto komplexov, porovnať ich s experimentálne zistenými a vyskúšať vplyv izotopovej výmeny na tieto vlastnosti.

Materiál a metódy

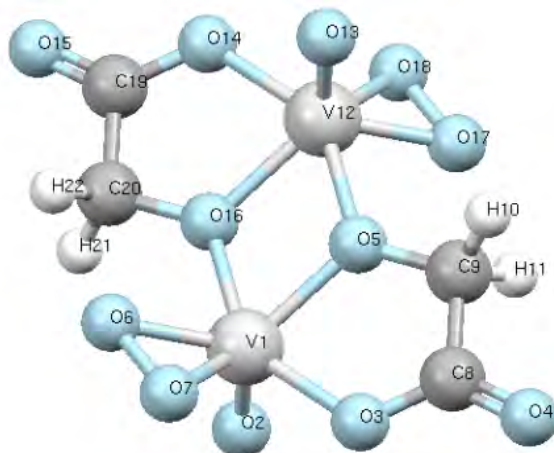
Všetky výpočty sú realizované v programe Gaussian 09. Na modelovanie geometrie a vizualizáciu jednotlivých molekúl používame program Molden. Pre daný komplexný anión a kation chceme v prvom kroku nájsť optimálnu geometriu (minimum na hyperploche potenciálnej energie). Geometrie sú optimalizované DFT funkcionálmi B3LYP, BP86 a CAM-B3LYP. Pre atóm vanádu je použitá báza Wachters+f a 6-31G* pre ľahké atómy a pre komplexný kation je použitá malá báza 6-31G* a takisto aj väčšie bázy LANL2DZ a aug-cc-pVTZ-pp.

V druhom kroku priradíme v optimálnej geometrii jednotlivým väzbám typ vibrácií aktívnych v infračervených a Ramanových spektrách. V ďalšom kroku postupne nahradíme v komplexnom katione atómy vodíka za atómy deutéria a priradíme opäť jednotlivým väzbám typ vibrácií v IČ a Ramanovom spektre a porovnáme vplyv izotopovej výmeny na posun vibrácií v týchto spektrách.

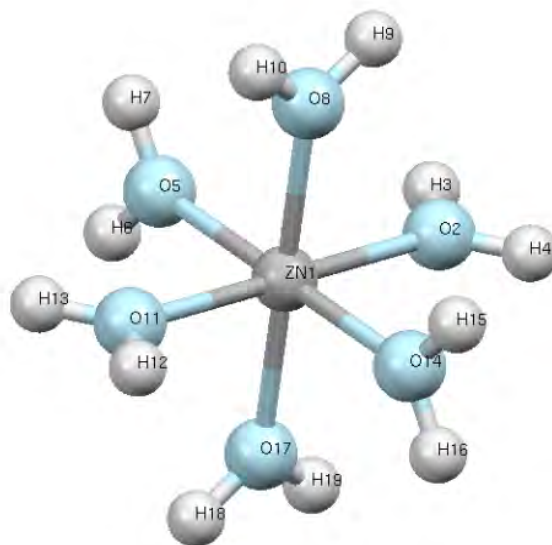
Výsledky a diskusia

Optimalizáciou experimentálnej geometrie komplexného aniónu $[V_2O_2(O_2)_2(glyc)_2]^{2-}$ (Gly-anión) a komplexného kationu $[Zn(H_2O)_6]^{2+}$ (Zn-akva) sme získali štruktúry, ktoré majú všetky vibračné frekvencie kladné a teda zodpovedajú minimu potenciálnej energie v základnom stave. Na obr. 1 vidíme zoptimalizovanú štruktúru komplexného aniónu funkcionálom BP86 a na obr. 2 zoptimalizovanú štruktúru komplexného kationu taktiež

funkcionálom BP86.



Obr. 1 Zoptimalizovaná geometria Gly-aniónu metódou BP86



Obr. 2 Zoptimalizovaná geometria Zn-katiónu metódou BP86

Tento funkcionál sa ukázal byť najlepší z vyskúšaných funkcionálov a veľkosť bázy nemala výrazný vplyv na dosiahnuté výsledky, a teda všetky ostatné výpočty sme potom robili týmto funkcionálom a bázou Wachters+f pre atóm vanádu a 6-31G* pre atóm zinku. Vypočítané väzbové dĺžky niektorých atómov a porovnané s experimentom môžeme vidieť v Tab. 1 pre anión a v Tab. 2 pre kation.

Tab. 1 Vybrané medziatómové vzdialenosti v štruktúre aniónu

	Experiment	BP86
V-O2	1,609	1,611
V-O3	2,042	2,044
V-O5	1,995	1,974
V-O6	1,923	1,856
V-O7	1,916	1,852
V-O16	2,009	2,097

Tab. 2 Vybrané medziatómové vzdialenosti v štruktúre katiónu

	Experiment	BP86
Zn-O2	2,138	2,092
Zn-O8	2,092	2,092
Zn-O5	2,075	2,092

Pre takto zoptimalizované geometrie sme vypočítali vibračné frekvencie a určili, ktoré vibrácie sú aktívne v IČ ,a ktoré v Ramanovom spektre. Keďže tieto štruktúry sú v C_i symetrii, daná vibrácia nemôže byť súčasne aktívna v oboch spektrách. V prípade katiónu sme ešte sledovali posun vibrácii pri nahradení atómov vodíka za atómy deutéria. Tab. 3 nám ukazuje vypočítané vlnočty a priradenie charakteristických pásov v IČ spektre pre anión a Tab. 4 pre katión.

Tab. 3 Priradenie vypočítaných charakteristických pásov v IČ spektre Gly-aniónu

	Experiment	BP86
$\nu(\text{C}=\text{O})$	1649	1695
$\delta(\text{CH}_2)$	1432	1453
$\nu(\text{V}=\text{O})$	994	1001
$\nu(\text{O}-\text{O})$	919	951

Tab. 4 Priradenie vypočítaných charakteristických pásov v IČ spektre Zn-katiónu

	Experiment	BP86	H → D (BP86)
$\nu(\text{O}-\text{H})$	3565 m 3488 s	3696, 3599	2789, 2678
$\delta(\text{OH}_2)$	1612	1650	1248
$\nu(\text{Zn}-\text{O})$	316 m	342	330

Záver

Pri výpočte geometrie glykolátokomplexu (Gly-anión) a hexaakvazinočnatého katiónu (Zn-akva) sa najviac osvedčil funkcionál BP86 s bázou Wachters+f pre atóm vanádu a 6-31G* pre atóm zinku. Týmto funkcionálom sme získali najlepšie geometrie vzhľadom na experiment. Následne vypočítané vibračné vlnočty potvrdili geometrie v minime a jednotlivým vlnočtom boli priradené vibrácie aktívne buď v IR alebo Ramanovom spektre a porovnané s charakteristickými pásmi z experimentu. Výpočtom sa potvrdilo priradenie jednotlivých vibrácií v experimente, doplnilo a vylepšilo charakterizáciu IČ spektra daného komplexného aniónu a katiónu.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Bustamante M., et al. (2011) J. Phys. Chem. A 115, p. 4115
- [2] Varadwaj P. R., et al. (2008) J. Phys. Chem. A 112, p.10657
- [3] Gilson H. S. R., et al. (1998) J. Phys. Chem. A 102, p. 6525
- [4] Faherty K. P., et al. (2001) J. Phys. Chem. A 105, p. 10054

Príprava a charakterizácia organoíllov obsahujúcich L-cysteín

Lukáš Petra^{1,2}, Ľuboš Jankovič², Peter Komadel²

¹Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra anorganickej chémie, Mlynská dolina 842 15, Bratislava 4, Slovenská republika; petra.lukas@gmail.com

²Slovenská akadémia vied, Ústav anorganickej chémie, Oddelenie hydrosilikátov, Dúbravská cesta 9, 845 36 Bratislava, Slovenská republika

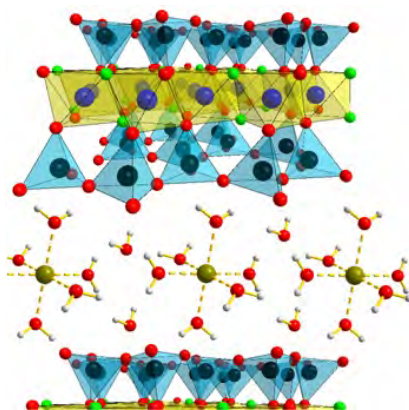
Abstract

Amino acids and polypeptides have an important role in the biochemical processes and transformations of organic compounds in the soil. There are significant interactions between these compounds and clay minerals. Desorption of amino acids caused by the washing of samples occurs during preparation of organoclays containing amino acids. This fact is rarely mentioned in published works. The process of adsorption and desorption of L-cysteine to sodium form of montmorillonite and organically modified montmorillonite was observed. Maximum adsorption of L-cysteine occurred when using organically modified montmorillonite as adsorbent and when cupric cations were present in the process of adsorption experiment and the amount of desorbed cysteine was minimal.

KLúčové slová: montmorillonit, adsorpcia, desorpcia, L-cysteín, IR spektrá

Úvod a formulácia cieľa

Ílové minerály patria do skupiny vrstevnatých aluminosilikátov. Ich základnou stavebnou jednotkou je vrstva (obr. 1). Jednotlivé vrstvy vytvárajú navzájom pospájané siete, ktoré sa líšia koordináciou aniónov (O^{2-} , OH^- a F^-) k centrálnym atómom (Si^{IV} , Al^{III} , Fe^{III} a Mg^{II}), a to siete oktaédrov a siete tetraédrov. Jednotlivé vrstvy sú od seba oddelené medzivrstvovým priestorom [1].



Obr. 1 Štruktúra montmorillonitu pozostávajúca z vrstiev tetraedrických a oktaedrických sietí.

Najznámejší ílový minerál, montmorillonit, patrí do skupiny dioctaedrických smektitov. Vrstva montmorillonitu pozostáva zo siete oktaédrov, ktorá spája dve siete tetraédrov (obr. 1). V štruktúrach vrstiev dochádza k izomorfným substitúciám, kde je kov s vyššou valenciou nahradený kovom s nižšou valenciou. Napr. v tetraédroch je Si^{IV} čiastočne nahradený Al^{III} a v oktaédroch je Al^{III} čiastočne nahradený Mg^{II} a vzniká záporný náboj

vrstiev. Tento náboj je kompenzovaný vymeniteľnými kationmi (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), ktoré sa nachádzajú v medzivrstvovom priestore a na povrchu častíc [2].

Ak sú vymeniteľné anorganické katióny nahradené organickými kationmi, vzniknuté materiály sa nazývajú organoíly. Podľa druhu vzájomnej interakcie organických látok a ílových minerálov je možné charakterizovať tri typy reakcií: reakcia iónovej výmeny, adsorpcia polárnych molekúl a chemisorpcia. Pri reakciách s iónovou výmenou sú anorganické katióny vymenené za organické. Detailne sa sledovali interakcie amóniových kationov (primárnych, sekundárnych, terciárnych a kvartérnych), prípadne molekúl, ktoré obsahujú amóniovú skupinu, napr. aminokyseliny [3].

Aminokyseliny a polypeptidy majú veľmi dôležitú úlohu v biochemických procesoch a transformáciách organických látok v pôdach, preto sa venuje veľká pozornosť štúdiu interakciám týchto zlúčenín s ílovými minerálmi [4]. Organoíly obsahujúce aminokyseliny sa používajú ako katalyzátory alebo adsorbenty ťažkých kovov nachádzajúcich sa v životnom prostredí [5].

Adsorpcia aminokyselín na ílové minerály závisí na pH prostredia. Najúčinnějšía je v kyslom prostredí ($\text{pH} > \text{pI}$), v ktorom je aminokyselina prítomná vo forme kationu. Pri zvyšovaní pH prostredia (napr. pri premývaní destilovanou vodou) dochádza k výraznej desorpcii aminokyselín. Množstvo desorbovanej aminokyseliny závisí od dĺžky jej alkylového reťazca, prípadne hydrofobicity. Desorbované množstvo aminokyseliny sa zvyšuje s klesajúcou hodnotou jej molovej hmotnosti [6]. Tieto negatívne faktory (desorpcia, limitovaná adsorpcia) sa v publikovaných prácach často vynechávajú.

Ciele práce boli:

- sledovanie priebehu adsorpcie L-cysteínu na montmorillonit
- štúdium desorpcie L-cysteínu pri premývaní vzorky po adsorpcii

Materiál a metódy

Materiály: 1. Sodná forma montmorillonitu (Kop_Na)

Sedimentačnou metódou sa pripravila jemná frakcia sodnej formy montmorillonitu (menšia ako 2 μm), bentonit ložisko Kopernica, Slovensko (Kop_Na). Vzorky boli vysušené 24 h pri teplote 60 °C, pomleté a preosiate cez sito s veľkosťou otvorov 250 μm .

Chemické zloženie: $w(\text{SiO}_2) = 61,2 \%$, $w(\text{Al}_2\text{O}_3) = 23,8 \%$, $w(\text{MgO}) = 3,18 \%$, $w(\text{Na}_2\text{O}) = 3,00 \%$, $w(\text{Fe}_2\text{O}_3) = 2,27 \%$, $w(\text{CaO}) = 0,23 \%$, $w(\text{K}_2\text{O}) = 0,16 \%$. KVK = 104 mmol/100 g

2. Príprava organicky modifikovaného montmorillonitu (Kop_TMODA; TMODA =

trimetyloktadecylamóniový kation)

K 200 ml destilovanej vody sa pridalo 2,00 g sodnej formy montmorillonitu (Kop_Na). Vzniknutá suspenzia sa zahriala na 75 °C. K 50 ml izo-propanolu sa pridalo 0,785 g trimetyloktadecylamónium bromidu (2,00 mmol) a vzniknutý roztok sa zahrial na 75 °C. Takto pripravený horúci roztok sa po malých častiach a za stáleho miešania a ohrevu pridával k suspenzii montmorillonitu. Pripravená suspenzia sa miešala 2 h pri 75 °C. Po ochladení suspenzie na laboratórnu teplotu sa vzorka odcentrifugovala. Po skončení procesu sa supernatant oddelil, zmerala sa jeho vodivosť a následne sa k tuhému podielu pridalo 200 ml destilovanej vody a systém sa intenzívne miešal 1 h. Takto pripravená suspenzia sa opäť centrifugovala. Po každej centrifugácii sa merala vodivosť supernatantu. Premývanie vzorky sa ukončilo, keď hodnota vodivosti klesla pod 50 μ S.

- $w(C) = 20,5 \%$

3. Príprava organoílov obsahujúcich L-cysteín

Tab. 1. Zoznam použitých látok v adsorpčných experimentoch.

Pripravená vzorka	Kop_cys ⁺	Kop_TMODA_cys ⁺	Kop_Cu_cys ⁺	Kop_TMODA_Cu_cys ⁺
Vzorka adsorbentu	Kop_Na	Kop_TMODA	Kop_Na	Kop_TMODA
m(adsorbent) [g]	2,00	2,00	2,00	2,00
V(suspenzia) [ml]	200	200	200	200
<i>Interkalačný roztok</i>				
V_R [ml]	20	20	30	30
m(cys); n(cys)	0,363 g; 3,00 mmol	0,363 g; 3,00 mmol	0,485 g; 4,00 mmol	0,485 g; 4,00 mmol
m_{35%}(HCl); n_{35%}(HCl)	0,312 g 3,00 mmol	0,312 g 3,00 mmol	0,417 g 4,00 mmol	0,417 g 4,00 mmol
m(CuCl₂·2H₂O); n(CuCl₂·2H₂O)	/	/	0,342 g 2,00 mmol	0,342 g 2,00 mmol

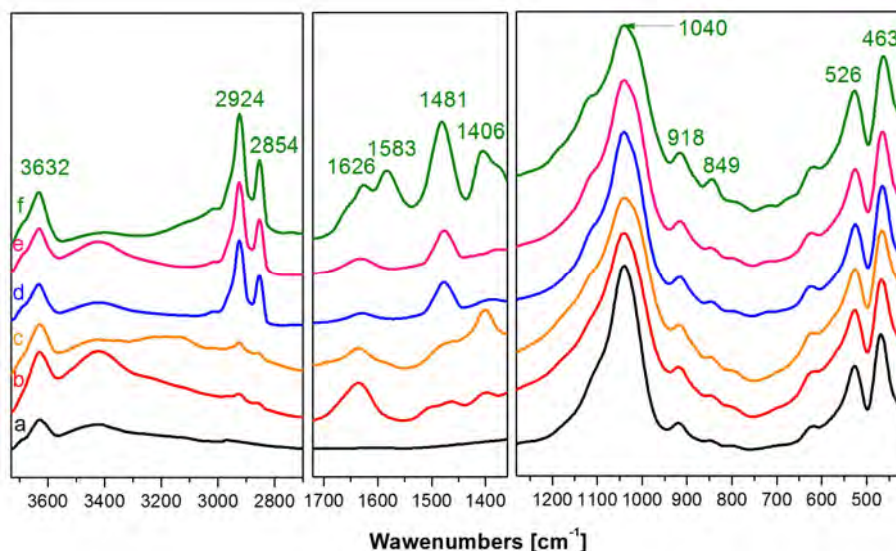
K pripravenej suspenzii ílového minerálu (tab. 1) sa po malých častiach a za stáleho miešania pridával pripravený interkalačný roztok (tab. 1) a vzniknutá suspenzia sa miešala 24 h pri laboratórnej teplote. Po ukončení adsorpčného experimentu sa suspenzie odcentrifugovali. Po skončení procesu sa supernatant oddelil, zmerala sa jeho vodivosť a následne sa k tuhému podielu pridalo 200 ml destilovanej vody a systém sa intenzívne miešal 1 h. Takto pripravená suspenzia sa opäť centrifugovala. Po každej centrifugácii sa merala vodivosť supernatantu. Premývanie vzorky sa ukončilo, keď hodnota vodivosti klesla pod 50 μ S.

Metódy: Infračervené spektrá vzoriek sa merali na prístroji Nicolet 6700 FTIR v strednej oblasti (MIR; $\tilde{\nu} = 4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$) použitím KBr tabliet (1 mg vzorky + 200 mg KBr). RTG difrakčné záznamy sa merali na prístroji PANalytical EMPYREAN. Analyzovali

sa orientované preparáty pripravené na podložnom sklíčku v rozsahu 2θ od $2,5^\circ$ do 15° s krokom $0,02^\circ$. Obsah uhlíka a síry vo vzorkách sa stanovil na prístroji HORIBA EMIA-320 V2 AC.

Výsledky a diskusia:

V infračervených spektrách všetkých vzoriek (obr. 2) sú prítomné absorpčné pásy, ktoré sú typické pre ílové minerály a ich organické deriváty. Nachádzame pásy pri 3632 cm^{-1} (valenčná vibrácia oktaedricky koordinovaných OH skupín v štruktúre vrstiev), pri 1040 cm^{-1} (valenčná vibrácia SiO skupiny), pri 918 cm^{-1} (deformačná vibrácia AlAlOH), pri 849 cm^{-1} (deformačná vibrácia AlMgOH), pri 526 cm^{-1} (deformačná vibrácia SiOAl) a pri 463 cm^{-1} (SiOSi) [7].

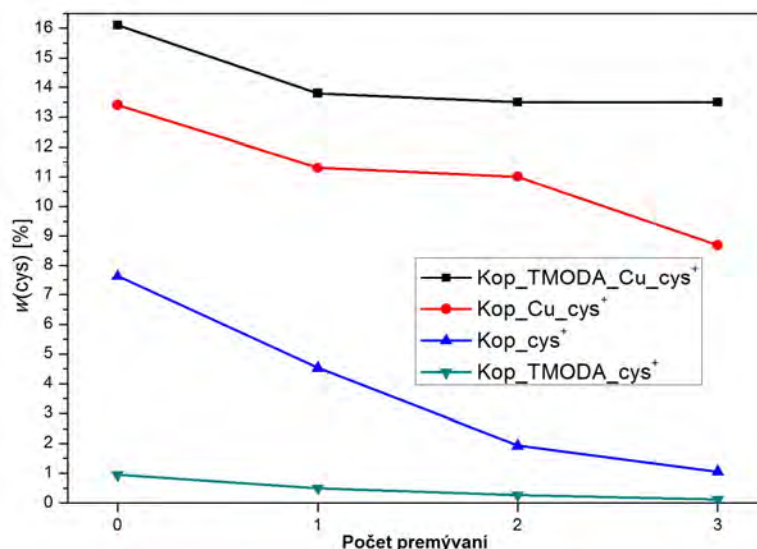


Obr. 2. Infračervené spektrá vzoriek v strednej oblasti: **a** – **Kop_Na**; **b** – **Kop_cys⁺**; **c** – **Kop_Cu_cys⁺**; **d** – **Kop_TMODA**; **e** – **Kop_TMODA_cys⁺**; **f** – **Kop_TMODA_Cu_cys⁺**.

Absorpčné pásy, ktoré zodpovedajú asymetrickej valenčnej vibrácii CH_2 skupiny (2924 cm^{-1}) a symetrickej valenčnej vibrácii CH_2 skupiny (2854 cm^{-1}) vidno v infračervených spektrách všetkých vzoriek okrem sodnej formy montmorillonitu (**Kop_Na**). V týchto vzorkách sú prítomné aj absorpčné pásy pri 1626 cm^{-1} (deformačná vibrácia NH_3^+), pri 1583 cm^{-1} (valenčná asymetrická vibrácia COO^-), pri 1481 cm^{-1} (deformačná vibrácia CH_2 skupiny) a pri 1406 cm^{-1} (valenčná symetrická vibrácia COO^-) [7].

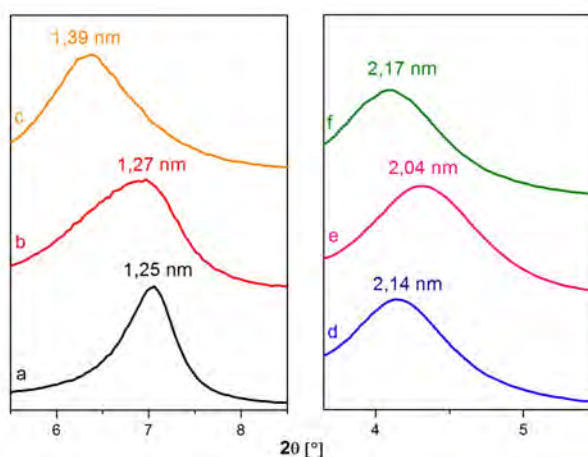
Obsah cysteínu vo vzorkách sa vypočítal zo stanovenia obsahu uhlíka a síry vo vzorkách. Na obr. 3 je možné sledovať adsorpciu L-cysteínu na sodnú formu montmorillonitu (**Kop_Na**) a na organicky modifikovaný montmorillonit (**Kop_TMODA**). Najväčšie množstvo cysteínu sa adsorbuje pri použití Cu^{2+} na organicky modifikovaný montmorillonit (**Kop_TMODA**). Menej sa adsorbuje L-cysteín pri použití Cu^{2+} na sodnú formu

montmorillonitu (Kop_Na) a L-cysteín na sodnú formu montmorillonitu (Kop_Na). Najmenej sa adsorboval L-cysteín na organicky modifikovaný montmorillonit (Kop_TMODA), kedy malý kation aminokyseliny nie je schopný vytesniť veľký amóniový kation.



Obr. 3. Desorpcia L-cysteínu spôsobená premývaním vzoriek.

Priebehy desorpčných kriviek (obr. 3) sa výrazne líšia v závislosti od použitia Cu^{2+} v priebehu adsorpčného experimentu. V prípade, že sa meďnatý kation nepoužil, množstvo L-cysteínu vo vzorke počas premývania niekoľkonásobne pokleslo. Ak sa meďnatý kation použil počas adsorpcie, k výraznej desorpcii nedochádza. Po adsorpcii dochádza k vytvoreniu komplexného kationu z L-cysteínu a Cu^{2+} v medzivrstvovom priestore.



Obr. 4. Difrakčné záznamy pripravených vzoriek: **a** – Kop_Na; **b** – Kop_cys⁺; **c** – Kop_Cu_cys⁺; **d** – Kop_TMODA; **e** – Kop_TMODA_cys⁺; **f** – Kop_TMODA_Cu_cys⁺.

Z difrakčných záznamov sa použitím Braggovej rovnice vypočítali medzivrstviné vzdialenosti d_{001} . Zmena tejto hodnoty priamo súvisí so zmenou hrúbky medzivrstevného priestoru. V prípade, že dochádza k interkalácii väčšieho kationu, ako je v medzivrstevnom priestore prítomný (v našom prípade sodný kation), dochádza k zvýšeniu hodnoty d_{001}

(obr. 4). V difrakčných záznamoch pozorujeme posuny difrakčných maxím v smere vyšších hodnôt d_{001} , čo poukazuje na prítomnosť adsorbovaného L-cysteínu v medzivrstvovom priestore.

Záver

Množstvo adsorbovaného a desorbovaného (spôsobené premývaním vzoriek destilovanou vodou) L-cysteínu závisí od typu použitého adsorbentu (sodná forma montmorillonitu alebo organicky modifikovaný montmorillonit) a od prítomnosti meďnatých katiónov v priebehu adsorpčného experimentu. V prípade adsorpcie L-cysteínu v prítomnosti meďnatých katiónov na organicky modifikovaný montmorillonit je jeho adsorpcia maximálna a desorbované množstvo spôsobené premývaním destilovanou vodou je minimálne. Tejto skutočnosti zodpovedajú výsledky všetkých analýz: stanovenie uhlíka a síry, RTG difrakčnej analýzy a Infračervená spektroskopia.

PodĎakovanie

Ďakujeme Mgr. Anne Brtáňovej za meranie RTG difrakčných záznamov a pomoc pri ich vyhodnotení. Ďalej ďakujeme Mgr. Valérii Bizovskej a Mgr. Ľudmile Sekerákovej za meranie a pomoc pri vyhodnotení infračervených spektier. Na záver ďakujeme celému kolektívu Oddelenia hydrosilikátov z Ústavu anorganickej chémie SAV za všestrannú pomoc a podporu. Za finančnú podporu ďakujeme projektu APVV-0362-10.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Čičel B., Novák I., Horváth I. (1981) Mineralógia a kryštalochémia ílov. Veda, Bratislava, p. 18
- [2] Madejová J., Pálková H., Komadel P. (2006) Vib. Spectrosc. 40, p. 80
- [3] Čičel B., Novák I., Horváth I. (1981) Mineralógia a kryštalochémia ílov. Veda, Bratislava, p. 165
- [4] Siffert B., Naidja A. (1992) Clay Miner. 27, p. 109
- [5] Brigatti M. F., Lugli C., Montorsi S., Poppi L. (1999) Clays Clay Miner. 47, p. 664
- [6] Theng B. K. G. (1974) The Chemistry of Clay–Organic Reactions. John Wiley & Sons, New York, p. 161
- [7] Komadel P., Madejová J., Bujdák J. (2005) Clays Clay Miner. 53(4), p. 313

GC-MS/MS stanovenie sevofluránu a hexafluórizopropanolu v plazme

Peter Podolec, Alexandra Hengerics Szabó, Juraj Adamuščin, Peter Kotora, Dušana Samková, Róbert Kubinec

Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Chemický Ústav, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská Republika; podolec@fns.uniba.sk

Abstrakt

Developed method for analysis of volatile components in plasma requires no modification of plasma samples and allows direct injection of 150 samples to the GC-MS/MS system without injector cleaning. The method allows simultaneous quantification of non-polar sevoflurane and its polar metabolite hexafluoroisopropanol - HFIP (unconjugated form). It is characterized by high repeatability and sensitivity with the detection limit of 0.009 mgL^{-1} for sevoflurane and 0.018 mgL^{-1} for HFIP. The method was used to determine the concentration of sevoflurane and HFIP in plasma samples of 7 patients undergoing general anesthesia with sevoflurane. The average concentration of sevoflurane and free HFIP was 57.2 mgL^{-1} and 0.39 mgL^{-1} , respectively.

KLúčové slová: plazma; sevoflurán; hexafluórizopropanol; priame dávkovanie; GC-MS/MS

Úvod a formulácia cieľa

Vývoj analytických metód, ktoré umožňujú elimináciu kvapalných rozpúšťadiel v analytických postupoch prípravy vzoriek ako aj skrátenie času prípravy vzorky neustále napreduje [1]. Medzi takéto metódy patrí priame dávkovanie vodných vzoriek (DAI) [2-4]. DAI sa využíva na analýzu prchavých organických látok vo vodách priamym nástrekom vzorky do plynovochromatografického systému bez predchádzajúcej úpravy vzorky. Elimináciou predúpravy a predkoncentrácie vzorky sa znižujú straty prchavých analytov a predchádza sa kontaminácii vzorky. Hlavnou nevýhodou použitia tejto dávkovacej techniky je, že voda nie je kompatibilná s niektorými stacionárnymi fázami v kapilárnych kolónach a s niektorými detektormi používanými v plynovej chromatografii [5-8].

Plazma je matricou, ktorá je svojím charakterom podobná vodným vzorkám. Okrem hlavnej zložky, ktorou je voda (viac než 90 %), obsahuje aj rôzne makromolekuly a soli, čo môže spôsobiť problémy pri GC analýze s priamym dávkovaním. Vplyv zložitého chemického profilu tejto matrice pri priamom dávkovaní plazmy do GC systému bez predchádzajúcej úpravy vzorky rieši len niekoľko málo prác. Problémy môžu nastať najmä pri degradácii vzorky vo vyhrievanom injektore a aj následnej kontaminácii plynovochromatografického systému degradačnými produktmi.

Priame dávkovanie vzoriek plazmy do GC použil Abdel-Rehim a kol. pri stanovení anestetika ropivacaine a jeho metabolitu. Analyzované vzorky plazmy sa upravili ultrafiltráciou, pričom sa získala frakcia s molovou hmotnosťou nižšou ako 20 000 amu. Do

injektora bol inštalovaný liner so sorbentom ATAS „A“ ktorý mal životnosť približne 20 nástrekov vzorky. Limit kvantifikácie bol 301 ng l^{-1} pre ropivacaine a 325 ng l^{-1} pre jeho metabolit [9]. Metóda je vhodná na stanovenie analytov ktoré sú v porovnaní s vodou menej prchavé. Systém, ktorý umožňuje dávkovať veľké objemy vodných vzoriek do GC systému a stanoviť nepolárne prchavé zložky, publikoval Kubinec a kol. [7]. Simultánne stanovenie polárnych a nepolárnych prchavých zložiek vo vode po priamom dávkovaní popísal Aeppli a kol. [8]. Metódu je však možné použiť iba v prípade že vodná matrica obsahuje len stopové množstvo neprchavých zložiek. Podobný problém simultánneho stanovenia nepolárnych a polárnych prchavých zložiek predstavuje stanovenie sevofluránu a jeho metabolitu hexafluórizopropanolu v plazme.

Sevoflurán bol do klinickej praxe zavedený v roku 1990 ako inhalačné anestetikum a dnes patrí medzi svetovo najpoužívanejšie anestetiká. Umožňuje rýchle a bezproblémové uvedenie pacienta do anestézie a zároveň sa ľahko vylučuje z centrálného nervového systému, čo umožňuje rýchle prebúdzanie pacienta z anestézie [10]. Sevoflurán v krvi sa rýchlo metabolizuje na primárne metabolity fluorid a hexafluórizopropanol (HFIP), ktoré sú vylučované močom. Hexafluórizopropanol cirkuluje v krvi predovšetkým vo forme glukuronid konjugátu. Podľa literatúry [11] nekonjugovaný hexafluórizopropanol predstavuje $\leq 15\%$ z celkovej koncentrácie hexafluórizopropanolu. Stanovením sevofluránu a hexafluórizopropanolu v biologických matriciach sa zaoberajú viaceré štúdie, ktoré využívajú techniku headspace (HS) v spojení s GC (HS-GC-FID alebo HS-GC-MS) systémom [11-17].

Na rozdiel od sevofluránu, hexafluórizopropanol je vysoko polárna látka. Má vysoký rozdeľovací koeficient krv-plyn, teda vysokú rozpustnosť v krvi, čo spôsobuje problémy pri jeho stanovení technikou headspace.

Cieľom tejto práce bolo vyvinúť metódu, ktorá umožní priame dávkovanie ľudskej plazmy do GC systému a súčasnú kvantifikáciu nepolárneho sevofluránu ako anestetika a jeho metabolitu, polárneho hexafluórizopropanolu, bez použitia akýchkoľvek predúpravných krokov.

Materiál a metódy

Sevoflurán a hexafluórizopropanol sme kúpili od firmy Sigma-Aldrich (Nemecko) a skladovali pri teplote 4°C .

Štandardné roztoky obsahujúce sevoflurán a hexafluórizopropanol sa pripravili do metanolu v koncentračnom rozsahu 5 - 15 000 mg l^{-1} . Kalibračné roztoky sa pripravili

pridaním 15 μl štandardného roztoku do 1,5 ml čistej plazmy v koncentračnom rozpätí 0,050 – 150 mg l^{-1} analytu. Pri príprave kalibračných roztokov sa minimalizoval objem plynnej fázy nad vzorkami, tak aby nepresiahol 20 % z celkového objemu vialky, čím sa znížil únik sevofluránu do plynnej fázy.

Vzorky plazmy od pacientov bez anestézie sme získali z Detskej fakultnej nemocnice v Bratislave. Vzorky plazmy pacientov po anestézii sme získali od Innsbruck Medical University (Rakúsko). Vzorky sme skladovali pri -20°C do analýzy.

Analýzy sa uskutočnili na plynovom chromatografe Trace GC Ultra vybavenom split-splitless injektorom, autosamplerom TriPlus a hmotnostným spektrometrom TSQ Quantum XLS. Liner injektora sa do jednej tretiny objemu naplnil sklenenou vatou. Dávkovalo sa 0,5 μl vzorky. Ako nosný plyn sa používal He s konštantným prietokom 1,5 ml min^{-1} . Doba splitlessu bola 0,6 min. Teplota injektora bola nastavená na 80°C , a teplota MS transfer-line na 200°C . Na separáciu sme použili kapilárnu kolónu DB-1 s dĺžkou 60 m, vnútorným priemerom 0,32 mm a hrúbkou filmu stacionárnej fázy 5 μm . Teplota kolóny bola na začiatku analýzy 40°C po dobu 8 minút, následne sa zvyšovala s rýchlosťou $30^{\circ}\text{C min}^{-1}$ až po 200°C . MS/MS merania sa uskutočnili v móde SRM (selected reaction monitoring), s prechodmi 181 \rightarrow 51, pre sevoflurán, s kolíznou energiou 20 V, a 149 \rightarrow 101, pre HFIP, s kolíznou energiou 5 V. Teplota iónového zdroja bola nastavená na 200°C .

Výsledky a diskusia

Vypracovaná metóda súčasného stanovenia sevofluránu a jeho metabolitu hexafluórizopropanolu v plazme sa validovala podľa postupu EURACHEM [18,19]. Linearita kalibračnej závislosti sa testovala analýzou vzoriek pri koncentráciách analytov 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 1; 3; 5; 10; 30; 50; 80; 100 a 150 mg l^{-1} .

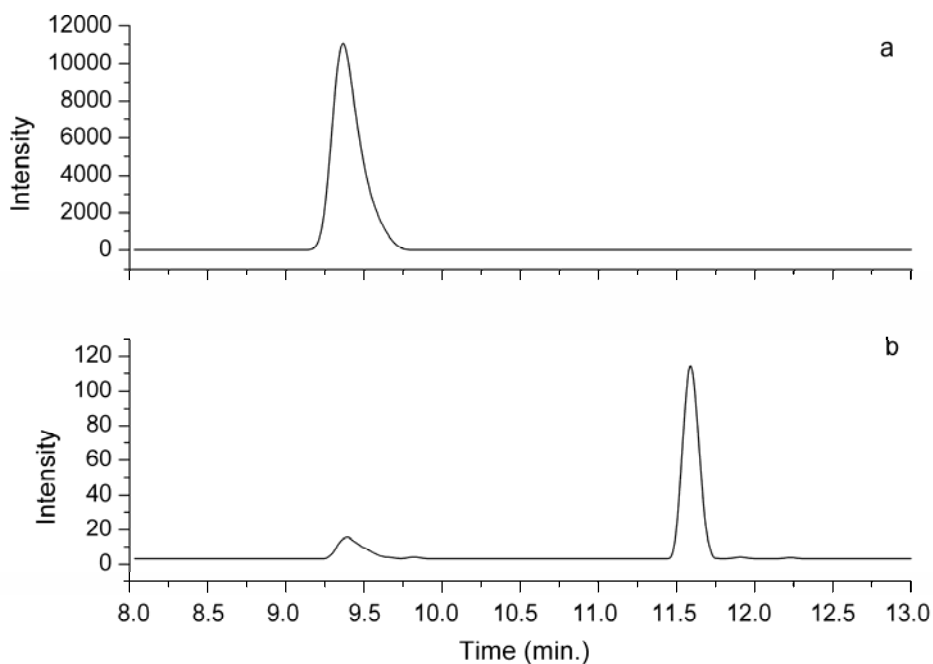
Sledoval sa tiež pamäťový efekt metódy, ktorý sa pozoroval až pri vyšších koncentráciách. Pamäťový efekt predstavuje obsah látky (sevoflurán, resp. hexafluórizopropanol) nameranej pri nástreku blanku po predchádzajúcom nástreku štandardu s koncentráciou 100 mg l^{-1} .

Opakovateľnosť merania plochy chromatografických zón sevofluránu a hexafluórizopropanolu, vyjadrená relatívnou smerodajnou odchýlkou (RSD), sa vypočítala z hodnôt signálov daných analytov v troch individuálne pripravených vzorkách pre štyri rôzne koncentrácie 0,1; 1; 10; 100 mg l^{-1} . V danom koncentračnom rozsahu 0,1 - 100 mg l^{-1} sa hodnoty RSD nachádzajú v rozmedzí 1,0 – 8,5 % pre sevoflurán a 0,9 - 6 % pre hexafluórizopropanol. Vyššie hodnoty RSD pre sevoflurán pri nižších koncentráciách sú

spôsobené vyššou prchavosťou sevofluránu. Hodnoty LOD sú $0,009 \text{ mg l}^{-1}$ pre sevoflurán a $0,018 \text{ mg l}^{-1}$ pre hexafluórizopropanol.

Pamäťový efekt analýzy pre sevoflurán a hexafluórizopropanol rástol s počtom vzoriek dávkaných do systému. Zistilo sa, že po 150 nástrekoch vzorky nepresiahol hodnotu 0,6 resp. 1 % plochy pík analytov z predchádzajúceho nástreku vzorky.

Na obr. 1 je znázornený GC-MS/MS chromatogram separácie vzorky číslo 6.



Obr.1 Chromatogram GC-MS/MS separácie vzorky číslo 6. a – iónový chromatogram pre sevofluránu pri prechode m/z 181→51, b – iónový chromatogram pre HFIP pri prechode m/z 149→51.

V tabuľke 1 sú uvedené stanovené koncentrácie analytov vo vzorkách plazmy vzorkovanej do vialky s EDTA a relatívne smerodajné odchýlky meraní.

Tab. 1: Stanovené koncentrácie sevofluránu a hexafluórizopropanolu v 7 reálnych vzorkách plazmy pacientov po narkóze a relatívne smerodajné odchýlky z 3 meraní.

Vzorka	Sevoflurán		Hexafluórizopropanol	
	c (mg l^{-1})	RSD (%)	c (mg l^{-1})	RSD (%)
1	54,4	9,0	0,53	6,2
2	19,4	6,4	0,35	8,6
3	85,0	15,4	0,46	7,3
4	87,2	6,0	0,52	6,5
5	63,7	3,4	0,32	8,0
6	20,0	7,3	0,21	10,5
7	70,9	1,2	0,35	1,6

Z obrázku 1 je zrejmé, že pri daných experimentálnych podmienkach sa dosiahla spoľahlivá separácia analyzovaných zložiek vzorky. Kvantifikácia analytov v reálnej vzorke nie je ovplyvňovaná koelúciou ďalších prchavých zložiek nachádzajúcich sa vo vzorke, ani koelúciou zložiek ktoré by mohli vzniknúť pri tepelnej degradácii makromolekúl v lineri injektora pri 80 °C.

Záver

Vyvinula sa metóda na simultánne stanovenie nepolárneho sevofluránu a jeho polárneho metabolitu hexafluórizopropanolu v plazme. Metóda je založená na priamom dávkovaní až 150 vzoriek plazmy do GC systému bez nutnosti čistenia lineru injektora. Pri teplote injektora 80°C nedochádza k degradácii makromolekúl, resp. polárnych látok nachádzajúcich sa v plazme, a vzniku látok, ktoré by koeluovali s analytmi. Nepozorovalo sa zníženie účinnosti kolóny, ktoré by mohlo byť spôsobené znečistením začiatku kolóny rozkladnými produktmi. Vypracovaná analytická metóda je veľmi rýchla, pretože nepoužíva žiadnu úpravu vzorky, a výsledok meraní v porovnaní s headspace nie je významne ovplyvnený teplotou vzorky, a pre polárnejší analyt ani objemom vzorky vo vialke. Vyvinutá metóda stanovuje voľný, nekonjugovaný hexafluórizopropanol, čo predstavuje asi 15 % z celkového obsahu hexafluórizopropanolu. Kritickým stupňom stanovenia sevofluránu a hexafluórizopropanolu je odber a spracovanie plazmy kvôli riziku odparenia a straty stanovovaných zlúčenín pri odbere krvi. Problém sa riešil minimalizáciou objemu plynnej fázy nad vzorkou, tak aby nepresiahol 20 % objemu vialky alebo skúmavky.

Pod'akovanie

Prácu podporila Agentúra na podporu výskumu a vývoja pod číslom projektu APVV-0416-10 a Univerzita Komenského v Bratislave (grant UK/483/2012 a UK/428/2012).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Namiesnik J., Wardencki W. (2000) *J. High Resol. Chromatogr.* 23, p. 297
- [2] Gurka D.F., Pyle S.P., Titus R. (1992) *Anal. Chem.* 64, p. 1749
- [3] Zwank L., Schmidt T.C., Haderlein S.B., Berg M. (2002) *Environ. Sci. Technol.* 36, p. 2054
- [4] Golfopoulou S.K., Lekkas T.D., Nikolaou A.D. (2001) *Chemosphere* 45, p. 275
- [5] Straková M., Matisová E. (1997) *Chem. Listy* 91, p. 330
- [6] Kuráň P., Soják L. (1996) *J. Chromatogr. A* 733, p. 119

- [7] Kubinec R., Adamuščin J., Jurdáková H., Foltin M., Ostrovský I., Kraus A., Soják L. (2005) *J. Chromatogr. A* 1084, p. 90
- [8] Aeppli C., Berg M., Hofstetter T.B., Kipfer R., Schwarzenbach R. P. (2008) *J. Chromatogr. A* 1181, p. 116
- [9] Abdel-Rehim M., Svensson K. A., Askemark Y., Pettersson K.-J. (2001) *J. Chromatogr. B* 755, p. 253
- [10] L.A.Bouche M.-P., Van Boxclaer J. F.P., Rolly G., Versichelen L. F.M., Struys M. M.R.F., Mortier E., De Leenheer A. P. (2001) *Clinical Chemistry* 47 (2), p. 281
- [11] Kharasch E. D., Karol M. D., Lanni C., Sawchuk R. (1995) *Anesthesiology* 82, p. 1369
- [12] Morgan S.E., Frink E.J., Gandolfi A.J. (1994) *Anesthesiology* 80, p. 201
- [13] Kharasch E.D., Armstrong A.S., Gunn K., Artru A., Cox K., Karol M.D. (1995) *Anesthesiology* 82, p. 1379
- [14] Yang N.C., Hwang K.L., Shen C.H., Wang H.F., Ho W.M. (2001) *J. Chromatogr. B* 759, p. 307
- [15] Kojima T., Ishii A., Watanabe-Suzuki K., Kurihara R., Seno H., Kumazawa T., Suzuki O., Katsumata Y. (2001) *J. Chromatogr. B* 762, p. 103
- [16] Accorsi A., Morrone B., Benzo M., Gandini C., Raffi G. B., Violante F. S. (2005) *J. Chromatogr. A* 1071, p. 131
- [17] Bourdeaux D., Sautou-Miranda V., Montagner A., Perbet S., Constantin J.M., Bazin J-E., Chopineau J. (2010) *J. Chromatogr. B* 878, p. 45
- [18] EURACHENM guide. [Citované: 1. marca 2013]
~<http://www.eurachem.nl/images/eurachem/Fitnessforpurpose.pdf>~
- [19] Jurdáková H., Kubinec R., Jurčišinová M., Krkošová Ž., Blaško J., Ostrovský I., Soják L., Berezkin V.G. (2008) *J. Chromatogr. A* 1194, p. 161

In silico štúdia potenciálnych inhibítorov Auróry A

Eva Proroková

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyzikálnej a teoretickej chémie, Mlynská dolina CH-1, 84215 Bratislava, Slovenská Republika;
prorokova@fns.uniba.sk*

Abstrakt

Aurora kinases (AK) are essential regulators of mitosis. AK are over-expressed in diverse solid tumors, hence have these enzymes become attractive anti-cancer targets. We focus on Aurora A, which is a member of the kinases family. We chose a series of around two dozens of pyrazol based ligands, experimental values of IC_{50} of which were determined by Coumar and coworkers and put through a computational study. Our approach extends the quantum mechanics-based scoring procedure developed in laboratory of prof. Hobza in IOCT, ASCR. It is based on improved PM6 semi-empirical method which is augmented with empirical corrections for dispersion interaction, hydrogen- and halogen-bonding. Quantification of ligand-protein interaction includes interaction energy calculation, solvation and deformation energy, determination and inclusion of entropy effects. Proper coverage of all these terms makes the scoring function to be an approximation of a thermodynamic value of free bonding energy of the complex. It is thus possible to correlate our score with the experimental IC_{50} values.

Kľúčové slová: *Auróra A; PM6, skórovacia funkcia, QM/MM, väzbová afinita.*

Úvod a formulácia cieľa

Modelovanie liečiv nástrojmi molekulovej a kvantovej mechaniky, sa v posledných rokoch stalo neodmysliteľnou súčasťou syntézy liečiv. Využíva sa hlavne pre potreby rýchleho a efektívneho skríningu. Cieľom našej práce je výskum v oblasti tzv. *in silico* chémie zameraný na vývoj a aplikáciu skórovacej funkcie založenej na semiempirickej kvantovo-chemickej výpočtovej metóde PM6-D3H4X [1] (PM6 rozšírená o empirické korekcie na správny popis disperznej energie, vodíkových väzieb a na výpočet halogénových väzieb). Základný prístup zvolený pri výpočte skóre je založený na báze QM/MM výpočtov (quantum mechanic/molecular mechanic), kde časť makromolekuly, v ktorej dochádza k interakcii s ligandom je počítaná presnejšími (najčastejšie semiempirickými) kvantovo-mechanickými metódami, zvyšok makromolekuly je počítaný časovo menej náročnými a menej presnejšími metódami molekulovej mechaniky. QM oblasť je počítaná metódou PM6-D3H4X.

Autormi skórovacej funkcie sú členovia výskumnej skupiny prof. Pavla Hobzu z ÚOCHB Praha. Skórovacia funkcia bola aplikovaná na sériu 22 komplexov enzým-ligand, ku ktorým boli známe experimentálne dáta IC_{50} dostupné v publikácii M.S. Coumara a kol.[2]. Jedná sa o sériu potenciálnych inhibítorov serín-treonínovej kinázy Auróry A, na báze pyrazolového skeletu, umiestneného v aktívnom mieste enzýmu zabezpečujúcu kompetitívnu

ATP inhibíciu enzýmu. Experimentálna hodnota IC_{50} bola po úprave použitá na koreláciu s dátami získanými zo skórovacej funkcie.

Po úspešnej korelácii experimentálnych a teoreticky získaných dát je našim ďalším cieľom systematické prehľadávanie databáz liečiv, docking a skórovanie týchto liečiv do nami zvoleného cieľového enzýmu Auróra A a získanie účinného inhibítora tohto onkogénu, prípadne návrh originálneho potenciálneho liečiva.

Materiál a metódy

Na výpočty uvedených energií sme použili skórovaciu funkciu založenú na báze semiempirickej metóde PM6-D3H4X. Skóre je vyjadrením voľnej väzbovej energie ΔG_w komplexov ligand-enzým. Je sumou niekoľkých čiastkových členov, ktoré popisujú jednotlivé energetické vstupy tvoriace celkovú energiu výslednej väzbovej afinity. Sú to:

- interakčná energia $\Delta G_{int,w}$
- proteínová a ligandová desolvatačná energia $\Delta\Delta G_{solv}(L)$
- proteínová a ligandová deformačná energia $\Delta G_{conf,w}(L)$, $\Delta G_{conf,w}(P)$
- príspevky väzbovej entropie $T\Delta S_{int}$

Procedúra skóringu je aplikovaná na optimalizované štruktúry komplexov podľa nasledovnej schémy:

$$\Delta G_w = \Delta G_{int,w} + \Delta\Delta G_{solv}(L) + \Delta G_{conf,w}(L) + \Delta G_{conf,w}(P) - T\Delta S_{int} \quad [1.]$$

Kde jednotlivé členy rovnice predstavujú:

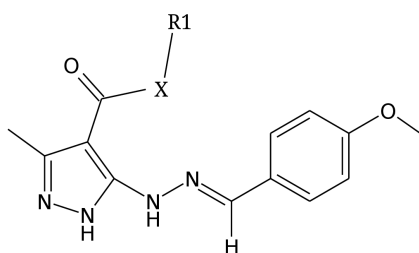
- $\Delta G_{int,w} = \Delta E_{int} + \Delta\Delta G_{int,solv}$ ΔE_{int} je interakčná energia v plynnej fáze počítaná v geometrii optimalizovanej PM6-D3H4X/MM použitím implicitného solventu metódou QM/MM. Term $\Delta\Delta G_{int,solv}$ zodpovedá desolvatačnej interakčnej energii v gemoetrii proteín-ligandového (PL) komplexu. Ako solvatačný model bol použitý implicitný GBM (Generalised Born Model) obsiahnutý vo výpočtovom balíku *AMBER* (Assisted Model Building and Energy Refinement) [3]. Po prebehnutí procedúry bola desolvatačná interakčná energia prepočítaná implicitným solvatačným modelom COSMO (Conductor-like Screening Model), ktorý je

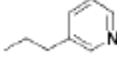
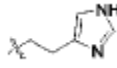
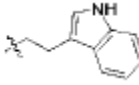
súčasťou balíka *MOPAC2009* [4]. V oboch prípadoch bolo vodné prostredie vyjadrené relatívnou permitivitou $\epsilon = 78,4$.

- $\Delta\Delta G_{solv}(L) = \Delta G_{solvSMD} - \Delta G_{solvGB}$ tento člen predstavuje korekciu na použitý solvatačný model. Výber vhodného solvatačného modelu závisí aj od veľkosti systému PL. Model GBM je vhodný pre veľké systémy a v prípade skóringu je použitý pre celý systém PL komplexu. Zatiaľ čo pre solvataciu samotného ligandu je možné použiť presnejší, ale výpočtovo náročnejší model SMD (kvantovo-mechanický kontinuálny univerzálny model). Preto musel byť zavedený člen $\Delta\Delta G_{solv}(L)$, ktorý reprezentuje rozdiel medzi solvatačnou voľnou energiou počítanou na vyššej úrovni (SMD) a na nižšej úrovni (GBM) teórie.
- $\Delta G_{conf, w}(P) = \Delta E_{def}(P) + \Delta\Delta G_{conf, solv}(P)$ člen $\Delta G_{conf, w}(P)$ rovnice 1.1 reprezentuje deformačnú energiu proteínu. Pozostáva z energie proteínu počítanej v PL geometrii a z energie izolovaného proteínu optimalizovaného vo vodnom prostredí na úrovni QM/MM modelu. MM časť proteínu počítaná molekulovou mechanikou bola optimalizovaná chladením z 300 K na 0 K po 2 ps.
- $\Delta G_{conf, w}(L) = \Delta E_{def}(L) + \Delta\Delta G_{conf, solv}(L) \sim$ tento člen rovnice 1.1 znázorňuje voľnú deformačnú energiu ligandu. $\Delta E_{def}(L)$ predstavuje optimalizovanú energiu ligandu počítanú vo vodnom prostredí simulovaným implicitným modelom SMD. Člen $\Delta\Delta G_{conf, solv}(L)$ predstavuje energiu ligandu počítanú v geometrii PL.
- $T \Delta S_{int}$ posledný člen rovnice 1.1 reprezentuje zmenu entropie prislúchajúcu počtu voľne rotujúcich väzieb ligandu. Tento term je veľmi náročné vyjadriť presne [5,6]. Možná odchýlka 1 kcal/mol na voľne rotujúcu väzbu je porovnateľná s bežnými skórovacími funkciami. [7].

Výsledky a diskusia

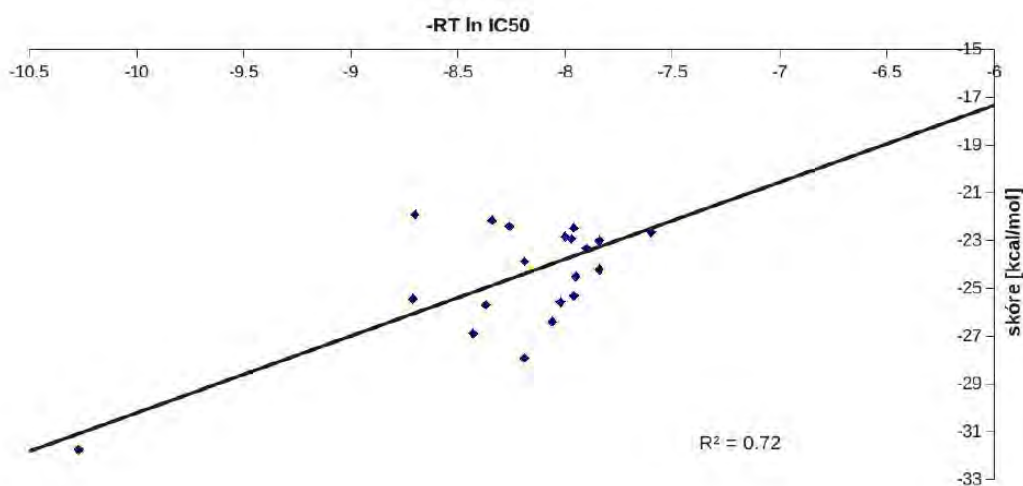
Uvedenou skórovacou funkciou bolo vyhodnotených 22 ligandov s pyrazolovým skeletom.

Obr. 1.1 Skelet ligandov 12b - 12w**Tab. 1.1** Séria vyhodnocovaných ligandov

Ligand	X	R ₁	IC ₅₀ [μM]
12b	-NH-	-CH ₂ Ph	1.580
12c	-NH-	-CH ₂ CH ₂ Ph	1.350
12d	-NH-	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ Ph	1.942
12e	-NH-	-Ph	0.804
12f	-NCH ₃ -	-Ph	>50
12g	-NCH ₃ -	-CH ₂ Ph	>50
12h	-NH-		1.484
12i	-NH-		1.937
12j	-NH-		1.071
12k	-NH-	-CH ₂ (Ph-4-OCH ₃)	1.623
12l	-NH-	-CH ₂ (Ph-3-OCH ₃)	0.838
12m	-NH-	-CH ₂ (Ph-3-NHCOCH ₃)	1.746
12n	-NH-	-CH ₂ CH ₂ (Ph-4-OCH ₃)	1.580
12o	-NH-	-CH ₂ CH ₂ (Ph-3-OCH ₃)	2.895
12p	-NH-	-Ph-4-OCH ₃	0.460
12q	-NH-	-Ph-3-OCH ₃	0.449
12r	-NH-	-Ph-2-OCH ₃	1.087
12s	-NH-	-Ph-3,4-di-OCH ₃	0.960
12t	-NH-	-Ph-4-N(CH ₃) ₂	1.568
12u	-NH-	-Ph-4-F	1.447
12v	-NH-	-Ph-4-NHCOCH ₃	0.719
12w	-NH-	-Ph-3-NHCOCH ₃	0.033

Ligandy poskytujúce viacero orto- a meta- polôh na terminálnom fenylovom kruhu boli študované vo všetkých variantách. Záverečné skóre bolo prepočítané s interakčnými

energiami v solvatačnom modeli COSMO a nahradené interakčnými energiami počítanými modelom GBM, nakoľko sa tento solvatačný model ukázal byť vyhovujúcejší pre výpočet proteín-ligandovej interakcie. Výsledná korelácia experimentu a výsledkov skórovacej funkcie PM6-D3H4X je zobrazená na obr. 1.2, pričom boli uvažované izoméry so zápornejšou hodnotou skóre. Bola vyhodnotená metódou najmenších štvorcov a regresný koeficient bol stanovený na 0.72. Vo výslednej korelácii neboli uvažované ligandy 12f a 12g, nakoľko experimentálne hodnoty IC_{50} boli mimo stanovovanú škálu a teda neboli k dispozícii ich skutočné inhibičné konštanty.



Obr. 1.2 Výsledná korelácia experimentu a skórovacej funkcie na báze PM6-D3H4X

Záver

Testovaných bolo 22 komplexov Auróry A s inhibítormi s rôznou polovičnou hodnotou inhibičnej koncentrácie. V rámci testovaných ligandov bolo 9 počítaných v dvoch izomérnych konformáciách, t.j. celkovo bolo počítaných 31 enzýmových komplexov. Výsledné skóre získané kvantovo-chemickými metódami boli korelované s experimentálnymi hodnotami IC_{50} vyjadrenými pomocou aproximácie, kde IC_{50} boli považované za rýchlostnú konštantu. Vychádzali sme z RTG štruktúry z kryštálu Auróry A získaného z ľudskej bunky. Enzým bol kryštalizovaný s ligandom 12w (tab. 1.1). Do aktívneho miesta boli dosádzané ostatné modelované ligandy (tab. 1.1) na báze pyrazolového skeletu, t.j. zaujímali rovnakú pozíciu v aktívnom mieste enzýmu. Komplexy boli modelované vo vodnom prostredí solventu GBM, bol neskôr nahradený modelom COSMO, ktorý sa ukázal byť presnejší pri počítaní proteín-ligandových komplexov.

Výsledná korelácia skóre a experimentálnych hodnôt voľnej väzbovej energie bola vyhodnotená metódou najmenších štvorcov. Bola dosiahnutá zhoda s experimentom na úrovni $R^2 = 0,72$. Táto korelácia nám umožňuje považovať použitú výpočtovú procedúru ako potenciálnu aj pri vyhodnocovaní ligandov s neznámymi experimentálnymi dátami.

PodĎakovanie

Chcela by som poďakovať za odbornú pomoc svojmu školiteľovi Mgr. Michalovi Pitoňákovi PhD.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Řezáč J., Hobza P. (2012) J. Chem. Theory. Comput. 8, p. 141
- [2] Coumar M.S., Leou J.S., Shukla P. et al. (2009) J. Med. Chem. 52, p. 1050
- [3] Case D. A., Darden T.A., Cheatham T.E., et al. (2010) AMBER 11, University of California, San Francisco.
- [4] Stewart J.P.P. (2007). J. Mol. Model. 13, p. 1173
- [5] Zhou H-X., Gilson M.K. (2009) Chem. Rev. 109, p. 4092
- [6] Diehl C., Engström O., Delaine T.H., Hkansson M., Genheden S., Modig K., Leffler H., Ryde U., Nilsson U.J., Akke M. (2010) J. Am. Chem. Soc. 132, p. 14577
- [7] Ishchenko A.V., Shakhnovich E.I. (2002) J. Med. Chem. 45, p. 2770

Využitie preparatívnej izotachoforézy a extrakcie tuhou fázou pred HPLC-MS analýzou nesteroidných protizápalových liečiv

Monika Radičová, Jozef Marák, Andrea Staňová, Monika Kondeková

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie,
Mlynská Dolina, 84215, Bratislava, Slovenská republika;
radicova@fns.uniba.sk*

Abstrakt

The aim of this work was to compare some analytical parameters of solid phase extraction and preparative isotachopheresis (pITP) as used for pre-treatment of complex biological matrix (human urine) before HPLC-MS analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). pITP of human urine spiked with mixture of NSAIDs (ibuprofen, fenoprofen and flurbiprofen) was performed using discrete spacers (aspartic and glutamic acid). Solid phase extraction of urine spiked with ibuprofen was performed on two types of SPE columns (Phenyl and C18) and trapped substances were eluted with methanol. LC-MS analyses of urine samples were performed by using Shimadzu LCMS-IT-TOFTM equipped with ESI ionisation. The MS experiments automatically acquired data within 50-350 m/z values in both the positive and negative modes. LC experiments were performed on Kinetex XB-C18 column (100 x 2.1 mm; 2.6 µm) as using a gradient elution (water – acetonitrile) with a 0.2 ml/min flow rate.

Kľúčové slová: NSAID; moč; preparatívna ITP; extrakcia tuhou fázou; HPLC-MSⁿ

Úvod a formulácia cieľa

Farmaceuticky aktívne látky sú novo sa objavujúcou skupinou kontaminantov kontinuálne vylučovaných do životného prostredia hlavne ako výsledok výrobného procesu, užívania liečiv, nesprávneho nakladania s nepoužitými alebo expirovanými liečivami a podobne [1,2]. Hlavne polárne farmaceutické zlúčeniny, ako sú napríklad kyslé nesteroidné protizápalové liečivá (NSAID), si v tomto smere zaslúžia špecifickú pozornosť. Vďaka ich fyzikálno-chemickým vlastnostiam (vysoká rozpustnosť vo vode, často slabá degradovateľnosť) sú schopné penetrovať cez všetky prírodné filtračné stupne a následne vstupovať do podzemných aj pitných vôd [1]. V ľudskom tele môžu byť farmaceutiká transformované na jeden alebo viac metabolitov a vylučované ako ich zmes s pôvodnou zlúčeninou. Stupeň metabolizmu závisí na množstve parametrov. Aj pôvodná zlúčenina aj metabolity vstupujú do vodného environmentu väčšinou ihneď po vylúčení z ľudského tela [3].

Doposiaľ boli mnohé analytické metódy na analýzu rezíduí farmaceutických látok založené na GC-MS, ktorá však často vyžaduje derivatizáciu hlavne kyslých zlúčenín. Kvapalinová chromatografia – tandemová MS (LC-MS/MS) je veľmi často zvolená ako prvá analytická technika pri výskume polárnych farmaceutík a ich metabolitov a pre jej citlivosť je

vhodná aj na analýzy environmentálnych vzoriek [1]. Nedávne pokroky v LC-MS umožnili detekciu rezíduí liečiv na (ultra)stopových úrovniach v environmentálnych vzorkách. V porovnaní s GC-MS môže LC-MS stanoviť aj polárne analyty bez potreby ich predchádzajúcej derivatizácie. Táto výhoda LC-MS je veľmi významná vtedy, ak simultánne analyzované zlúčeniny patria do štruktúrne odlišných skupín, ktorých stanovenie pomocou GC-MS by vyžadovalo použitie viac ako jednej derivatizačnej reakcie [3]. Napriek citlivosti používaných analytických MS techník je vzhľadom na aktuálne koncentrácie analytov v reálnych vzorkách potrebná prekoncentrácia takýchto stopových látok pred ich vlastnou analýzou [4]. Úprava vzorky je veľmi dôležitým článkom analytického postupu pri analýze zlúčenín v reálnych vzorkách, pretože je často časovo veľmi náročným krokom, ale aj možným zdrojom nepresností a nesprávnosti celého analytického postupu. Extrakcia tuhou fázou (SPE) patrí medzi najčastejšie používané metódy na úpravu vzoriek. SPE môže výrazne zredukovať čas potrebný na úpravu vzorky, okrem toho nevyžaduje veľký objem vzorky a spotrebúva iba malé množstvá organických rozpúšťadiel [5]. Preparatívna kapilárna izotachoforéza (pITP) je veľmi sľubnou metódou úpravy vzorky, pretože má viacero praktických výhod, ako sú veľký objem dávkovanej vzorky, vysoká separačná kapacita, dobre definovaná koncentrácia rozseparovaných zložiek so samozaostrojúcim efektom zón a iné [6]. Niektoré alternatívy procedúr využívaných v pITP sú zosumarizované v prácach Hirokawa a Kisa [7,8].

Cieľom tejto práce bolo vypracovanie metodologického prístupu pre analýzu a identifikáciu nesteroidných protizápalových liečiv a v komplexnej matrici, ktorú v našom prípade reprezentoval ľudský moč. Z predúpravných techník bola pozornosť venovaná najmä porovnaniu analytických parametrov mikropreparatívnej kapilárnej izotachoforézy (pITP) a extrakcie tuhou fázou (SPE).

Materiál a metódy

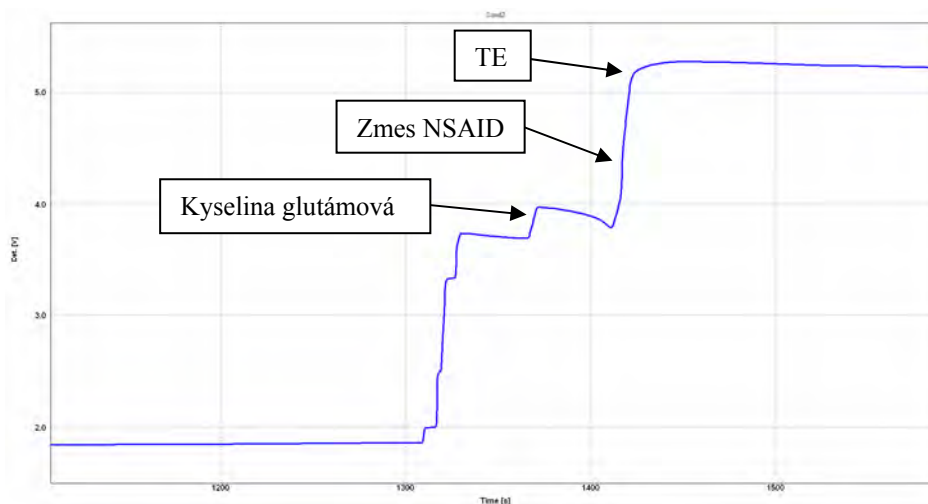
HPLC-MS analýzy boli vykonané použitím LCMS-IT-TOFTM analyzátora (Shimadzu, Kyoto, Japonsko), vybaveného ESI ionizáciou. Chromatografická separácia bola vykonaná na kolóne Kinetex XB-C18 (100 x 2,1 mm, 2,6 μ m) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) s použitím gradientovej elúcie (voda : acetonitril) s prietokovou rýchlosťou 0,2 ml/min. Program gradientu bol nasledovný: 0-1 min. – 10 %ACN, 1-5 min. 10-90%, 5-6 min. – 90% ACN, 6,1-13 min. – 10% ACN. Kolóna bola termostatovaná na 40 °C. MS-MS³ experimenty boli získané automatickým zberom dát v rozsahu hmôt 50-350 m/z v pozitívnom

a v negatívnom móde. Na ovládanie hmotnostného spektrometra, zber a vyhodnocovanie dát sa použil softvér LCMS Solution v.3.51 (Shimadzu). ITP separácia bola vykonaná na modifikovanom izotachoforetickom analyzátoe EA-102 (VILLA LABECO, Spišská Nová Ves, Slovenská republika). Použitý elektrolytový systém sa skladal z vodiaceho elektrolytu (LE), obsahujúceho 10 mM HIS a 10 mM HIS⁺Cl⁻ a zo zakončujúceho elektrolytu (TE), ktorý obsahoval 10 mM HIS a 5 mM MES. Ako najvhodnejšie diskkrétne spacery boli nájdené kyselina asparágová a kyselina glutámová. Extrakcia tuhou fázou bola vykonaná na SPE kolónkach s náplňou Fenyl a C18 (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA) s využitím zariadenia Visiprep DL (Supelco).

Pri príprave roztokov a vzoriek bola použitá voda pre LC-MS a acetonitril pre LC-MS, metanol p. a., histidín, histidín chlorid, MES, kyselina chlorovodíková a síran sodný (Merck, Darmstadt, Nemecko). Štandardy ibuprofenu, fenoprofenu a flurbiprofenu boli získané od firmy Sigma-Aldrich. Vzorky moču boli získané od zdravého dobrovoľníka (na základe jeho prehlásenia) vo veku 26 rokov.

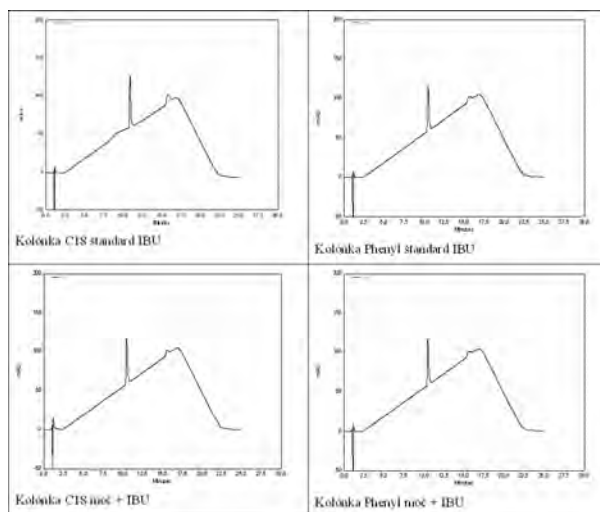
Výsledky a diskusia

Na zistenie potenciálu pITP ako predúpravnej techniky pred HPLC-MS analýzou bolo nutné optimalizovať elektroforetické podmienky a predovšetkým nájsť elektrolytový systém kompatibilný s finálnou MS detekciou. Použitý elektrolytový je uvedený v časti Materiál a metódy. Pri použití pITP sme frakcionovali zmes nesteroidných protizápalových liečiv (NSAID), ibuprofén (IBU), fenoprofén a flurbiprofén, ktoré za týchto separačných podmienok migrovali v pozícii medzi kyselinou glutámovou a TE (Obr.1). Pri frakcionácii bola úspešne využitá skutočnosť, že použité analyty sa za zvolených experimentálnych podmienok počas ITP kroku navzájom neseparujú a migrujú spolu v jednej zóne, resp. v jednej hraničnej vrstve, v dôsledku čoho je možné uskutočniť ich výber v jednej frakcii. Ako komplexná biologická vzorka bol použitý ľudský moč, ku ktorému bola pridaná zmes zvolených NSAID na koncentračnej úrovni 5 ng/ml. Pomocou pITP bol uskutočnený výber frakcií látok migrujúcich medzi kyselinou glutámovou a TE. Následne bolo z frakcií odparené rozpúšťadlo pomocou zariadenia Concentrator plus 5305 (Eppendorf, Hamburg, Nemecko). Takto upravené frakcie boli uchovávané v chladničke a tesne pred ich analýzou technikou HPLC-MS bola urobená rekonštitúcia frakcií zmesou 50 µl CH₃OH + 50 µl H₂O + 10 ul 1% kyseliny mravčej. Na HPLC-MS analýzu bolo injektovaných 5 µl takto upravenej vzorky.

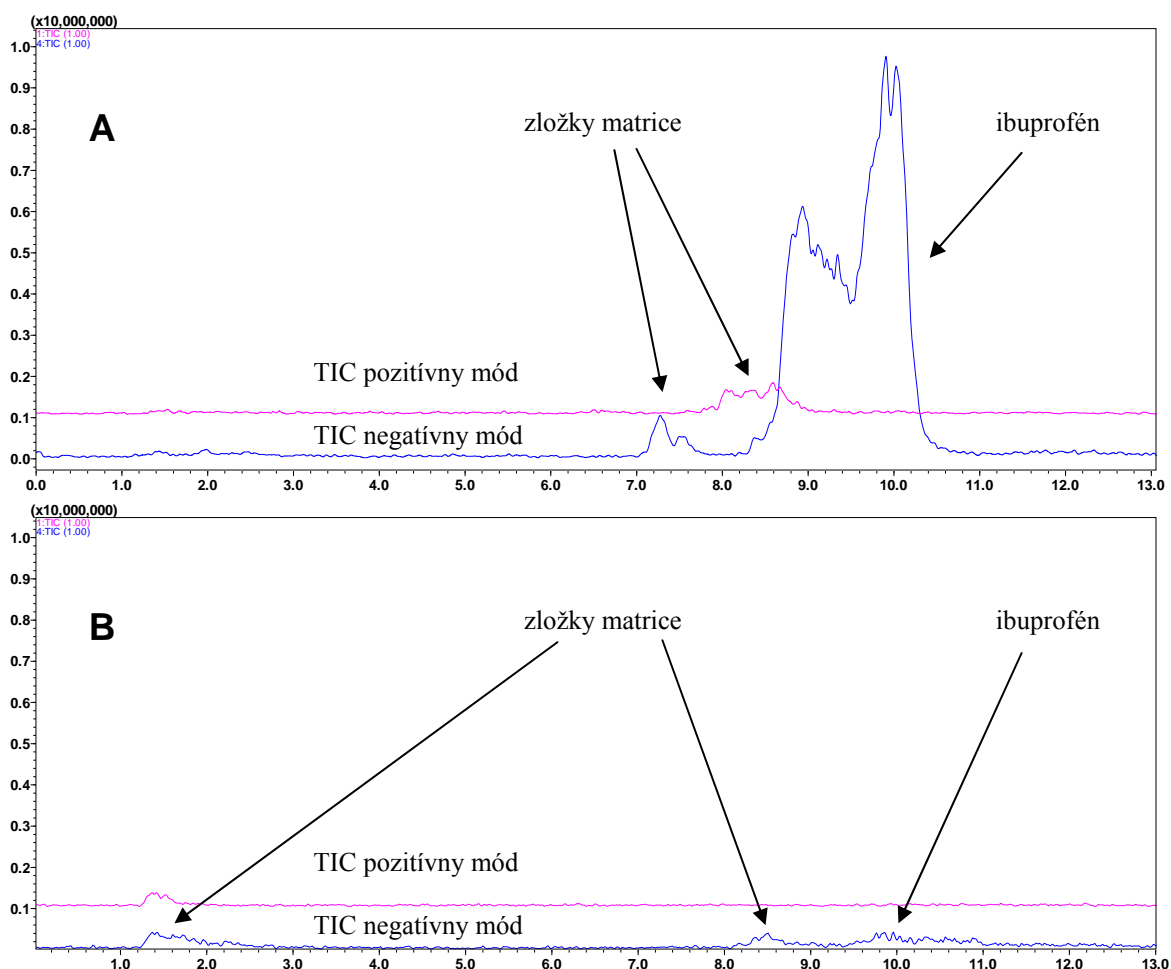


Obr.1: izotachoforeogram získaný počas frakcionácie vzoriek moču s prídavkom spacerov a NSAID.

V ďalšom kroku sme ako predúpravnú techniku vzoriek moču s prídavkom IBU použili SPE. Dôležitou súčasťou práce bola optimalizácia SPE podmienok. Boli testované dva druhy SPE kolóniek s náplňou silikagélu, ktorý bol modifikovaný buď oktadecylovou skupinou (označenie C18) alebo fenylovou skupinou (označenie Phenyl). SPE kolónky boli pred začatím práce kondicionované presatím 1ml metanolu, následne 1 ml vody a nakoniec 1 ml 25 mM roztoku KH_2PO_4 pri prietoku 1 ml/min. Boli pripravené nasledujúce typy vzoriek: štandard IBU rozpustený vo vode s finálnou koncentráciou 40 ng/ml), blank moču (10 krát zriedený), roztok IBU s koncentráciou 40 ng/ml, ktorý bol prítomný buď v 10 krát zriedenom moči alebo v 25krát zriedenom moči. Do každej vzorky boli pridané 2 ml 0,1 M HCl a 2 ml 10^{-2} M Na_2SO_4 a výsledný objem vzorky bol 25 ml. Látky zachytené na SPE kolónkach boli eluované 3 krát 1 mL metanolu, následne boli získané eluáty odparené na zariadení Concentrator plus 5305 (Eppendorf) a pred HPLC-MS analýzou boli rekonštituované 400 μl metanolu a 600 μl vody. Takto získané vzorky boli podrobené HPLC analýze s UV detekciou pri vlnovej dĺžke 230 nm, cieľom ktorej bolo zistiť, ako ovplyvňuje koncentrácia moču sorpciu IBU na SPE kolónku. Výsledky získané počas zakoncentrovania štandardu IBU vo vode a moču (25 krát zriedeného) s prídavkom IBU na rovnakej koncentračnej úrovni, sú ukázané na Obr.2. Ako vyplynulo z analýzy plôch pík IBU, takto spracované vzorky moču neovplyvnili sorpciu IBU na SPE kolónkach a výťažnosti IBU sa pohybovali v rozmedzí 93-98%. Množstvo moču aplikované na SPE kolónky zodpovedalo 1 ml neriedeného moču, pričom na záznamoch nie sú vidieť žiadne interferujúce píky zložiek matrice, čo znamená, že SPE úprava vzoriek moču je veľmi efektívna vzhľadom na odstránenie interferentov.



Obr.2: HPLC-UV záznamy získané počas separácie vzoriek štandardu IBU a vzoriek moču s prídavkom IBU na koncentračnej úrovni 0,04 mg/ml, ktoré boli upravené na SPE kolónkach s náplňou silikagélu modifikovaného oktadecyllovou (C18) a fenylovou (Phenyl) funkčnou skupinou.



Obr.3: TIC záznamy získané počas HPLC-MS analýzy vzorky moču s prídavkom IBU po predchádzajúcej SPE úprave na kolónke C18 (A) a frakcie moču s prídavkom zmesi NSAID na koncentračnej úrovni 5 ng/ml, ktorá bola získaná pITP postupom (B).

Na Obr.3 sú ukázané TIC záznamy získané HPLC-MS analýzou vzoriek moču s prídavkom ibuprofenu na koncentračnej úrovni 0,04 mg/ml po úprave na SPE kolónke s náplňou C18 (Obr.3A) a frakcie získanej pITP úpravou vzorky moču s prídavkom ibuprofenu na koncentračnej úrovni 5 ng/ml (Obr.3B). Na základe porovnania TIC záznamov na Obr.3A a B je možné povedať, že na odstránenie zložiek matrice, a teda aj možných interferentov pri HPL-MS analýze, je oveľa účinnejšia úprava technikou pITP.

Záver

V práci je ukázané, že na úpravu a zjednodušenie komplexných matric pred HPLC-MS analýzou je podstatne výhodnejšia úprava vzoriek technikou preparatívnej izotachoforézy, pri ktorej sa dosiahne niekoľkonásobne vyšší čistiaci efekt v porovnaní s úpravou technikou SPE. Veľkou výhodou SPE je však možnosť dávkovania niekoľkonásobne vyšších objemov vzorky v porovnaní s pITP.

Pod'akovanie

Táto práca vznikla za finančnej podpory Agentúry na podporu výskumu a vývoja (projekt VVCE-0070-07 a projekt APVV-0583-11), grantu VEGA 1/1305/12 a grantu Univerzity Komenského v Bratislave (UK/283/2012).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Petrović M., Hernando M. D., Díaz-Cruz M. S., Barceló D. (2005) *J. Chromatogr. A* 1067, p. 1
- [2] Fent K., Weston A. A., Caminada D. (2006) *Aquat. Toxicol.* 76, p. 122
- [3] Pérez S., Barceló D. (2007) *TrAC* 26, p. 494
- [4] Camel V. (2003) *Spectrochim. Acta B* 58, p. 1177
- [5] He C., Long Y., Pan J. et al. (2007) *J. Biochem. Biophys. Methods* 70, p. 133
- [6] Hutta M., Kaniansky D., Kovalčíková E. et al. (1995) *J. Chromatogr. A* 689, p. 123
- [7] Hirokawa T., Kiso Y. (1994) *J. Chromatogr. A* 658, p. 343
- [8] Ranc V., Staňová A., Marák J. et al. (2011) *J. Chromatogr. A* 1218, p. 205

Použitie preparatívnej izotachofórey ako metódy na frakcionáciu humínových kyselín

Zdenka Radičová, Róbert Bodor, Róbert Góra, Milan Hutta, Marián Masár

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie,
Mlynská Dolina CH-2, 842 15 Bratislava, Slovenská Republika;
radicovaz@fns.uniba.sk*

Abstrakt

This work dealt with a fractionation of humic acids (HAs) by preparative capillary isotachopheresis (CITP) as a sample pretreatment method for HPLC using 10-step gradient of N,N-dimethylformamide (DMF) in buffered aqueous mobile phase. CITP separations with the mixture of three discrete spacers to reach a spatial separation of HAs were performed at pH 10. A micropreparative valve, placed behind the conductivity detector in CITP column, was used for fractionation of HAs according to their effective mobilities into five fractions. Isolated fractions were controlled toward the presence of corresponding DSs zones by analytical CITP with conductivity detection in the same electrolyte system as that used in preparative CITP. Differences found in the chromatographic profiles of CITP fractions of HAs indicate that ionogenic components trapped in the individual fractions have different effective mobilities with different hydrophobicity or/and interaction with DMF.

Kľúčové slová: *preparatívna izotachofórea; HPLC; humínové kyseliny*

Úvod a formulácia cieľa

Humínové látky patria k jedným z najrozšírenejších makromolekúl biologického pôvodu na zemi [1]. Majú zložitú chemickú štruktúru hydrofilného charakteru a napriek tomu, že sú predmetom skúmania už viac ako storočie, informácie o ich charaktere a vlastnostiach nie sú úplné [2]. Hlavnou extrahovateľnou zložkou humínových látok sú humínové kyseliny (HAs), ktoré nie sú rozpustné v kyslých roztokoch, ale sú rozpustné v alkalických [1].

Separáčne metódy hrajú dôležitú úlohu pri analýze HAs. Predovšetkým využitie kombinácie viacerých separačných metód, pracujúcich na rozdielnom separačnom princípe sa ukazuje ako vhodný spôsob analýzy týchto zložitých makromolekúl [3].

V HPLC určuje relatívna interakcia analytu s oboma fázami, stacionárnou aj mobilnou, retenčné charakteristiky analytu. Rôzne analyty rozdielne interagujú s týmito fázami, čo určuje, či budú alebo nebudú separované daným HPLC systémom. Základným kritériom na výber mobilnej fázy je, že analyzované látky v nej musia byť rozpustné. Vo väčšine HPLC separácií sa využíva reverzno-fázový mechanizmus, kde je mobilná fáza polárnejšia ako stacionárna fáza [4]. Mobilná fáza zložená z organických rozpúšťadiel, typická pre separáciu malých molekúl v RP-HPLC, má však pri analýze HAs obmedzené

použitie [5]. Chromatografický systém používajúci ako rozpúšťadlo DMF s využitím skokového gradientu mobilnej fázy s kontrolovaným pH však umožňuje efektívny prenos hmoty a preto má veľmi dobré využitie pre analýzu HAs [3,6].

Kapilárna izotachoforéza (CITP) je jeden zo základných modelov kapilárnych elektromigračných metód. Preparatívna CITP môže byť použiteľná pre mikropreparatívne účely zaradením frakčionálneho kohúta na koniec analytickej kolóny. Táto technika umožňuje priestorové oddelenie mikro-množstiev analytov do jednotlivých frakcií a ich ďalšiu analýzu inou analytickou metódou [7,8].

Cieľom tejto práce bola predbežná štúdia off-line kombinácie preparatívnej CITP a RP-HPLC na získanie podrobnejších informácií o zložení a štruktúre HAs.

Materiál a metódy

Na frakcionáciu humínových kyselín bol použitý elektroforetický analyzátor EA-102 (Villa-Labeco, Spišská Nová Ves, SR), pracujúci v hydrodynamicky uzatvorenom systéme v jednokolónovom usporiadaní s použitím kolóny 1,5 mm x 160 mm. Objem vzorky dávkovanej pomocou dávkovacieho kohúta bol 150 μ l. Jednotlivé frakcie boli izolované pomocou frakčionálneho kohúta s objemom 22 μ l.

Elektroforetický analyzátor EA-101 (Villa-Labeco) pracujúci v hydrodynamicky uzatvorenom systéme bol použitý na CITP analýzu izolovaných frakcií s využitím vodivostného detektora umiestneného na konci analytickej kolóny s rozmermi 0,3 mm x 160 mm (priemer x dĺžka po detektor). Jednotlivé frakcie (5 μ l) boli dávkované pomocou mikrostriekačky (Hamilton, Bonaduz, Švajčiarsko) cez septum.

RP-HPLC analýza CITP frakcií bola uskutočnená na zariadení LaChrom (Merck-Hitachi, Darmstadt, Nemecko) s použitím LiChromCART kolóny 250 mm x 4 mm, naplnenej stacionárnou fázou LiChrospher Wp 300 RP-18, s priemerom častíc 5 μ m spojená s úpravňovou kolónou LiChromCART 4 mm x 4 mm naplnenou LiChrospher WP 300 RP-18 stacionárnou fázou s priemerom častíc 5 μ m. Separačné podmienky pre gradientovú elúciu humínových kyselín boli nasledovné: mobilná fáza A pozostávala z vodného fosfátového tlmivého roztoku (pH = 3,00 50 mM) obsahujúceho 1 % dimetylformamidu (DMF). Mobilná fáza B bol 100 % DMF. Gradientový program bol nastavený nasledovne: od 0,0 do 3,6 min izokraticky 0 % B, od 3,7 min každé 4 min v izokratickom kroku bol navýšený podiel B o 10 %, posledný krok navýšil podiel B o 9 % po 99 % B. Ďalej prebiehala analýza izokraticky po 55,0 min. Od 55,1 min po 60 min bol lineárny pokles z 99 % B do 0 % B a medzi meraniami

prebehlo 10 min premývanie.

Zásobný roztok HAs (Sodná soľ humínovej kyseliny, séria: S42944-268, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko) bol pripravený o koncentrácii 100 mg/l. Zásobný roztok HAs spolu s diskretnými spacermi pozostával z HAs o koncentrácii 100 mg/l a spacerov (kyselina asparágová – ASP, kyselina 2-aminoadipová – AAD, taurín – TAU) o koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ mol/l.

Výsledky a diskusia

CITP separácie prebiehali v anionickom režime s použitím elektrolytového systému uvedeného v Tab. 1.

Tab.1 Použitý elektrolytový systém

Vodiaci elektrolyt (LE)	vodiaci ión	Cl ⁻
	koncentrácia (mmol/L)	10
	protiión	etanolamín
	pH	10
	aditívum	HEC*
	koncentrácia (% w/v)	0,1
Zakončujúci elektrolyt (TE)	zakoňujúci ión	OH ⁻
	koncentrácia (mmol)	
	proti-ión	
	pH	

*HEC - Hydroxyetylcelulóza

Zakončujúci elektrolyt bol pripravený priamo v TE nádobke elektrolýzou deionizovanej vody. Prúd na elektrolýzu bol zvyšovaný skokovo (10, 20, 30, 50, 70, 100, 150, 200 μ A), pričom jednotlivé kroky trvali od 60 s do 200 s.

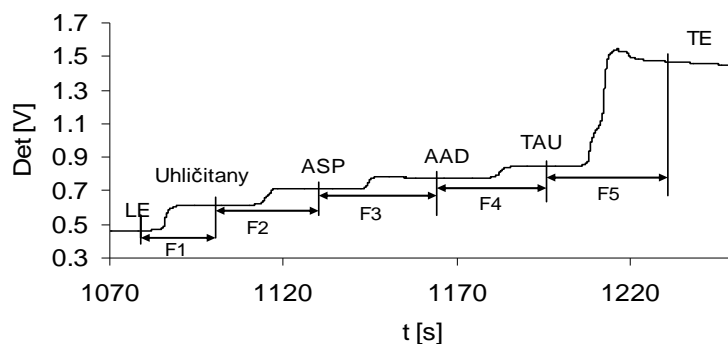
Dôležitým krokom pri frakcionácii HAs pomocou preparatívnej CITP je voľba zmesi vhodných diskretných spacerov. Pri výbere spacerov boli využité výsledky práce Nagyovej a Kanianskeho [9], ktorí použili 20 diskretných spacerov na ITP separáciu humínových kyselín. Pri výberoch jednotlivých frakcií sme sa snažili o výber rozhrania medzi dvoma spacermi alebo medzi vodiacim elektrolytom (LE) a spacerom a zakončujúcim elektrolytom (TE) a spacerom, pretože práve v týchto rozhraniach migrovali zložky humínových kyselín.

Pri výbere piatich frakcií (Obr. 1) boli cieľené frakcie obsahujúce rozhrania: LE/uhličitan, uhličitan/kyselina asparágová (ASP), ASP/kyselina aminoadipová (AAD),

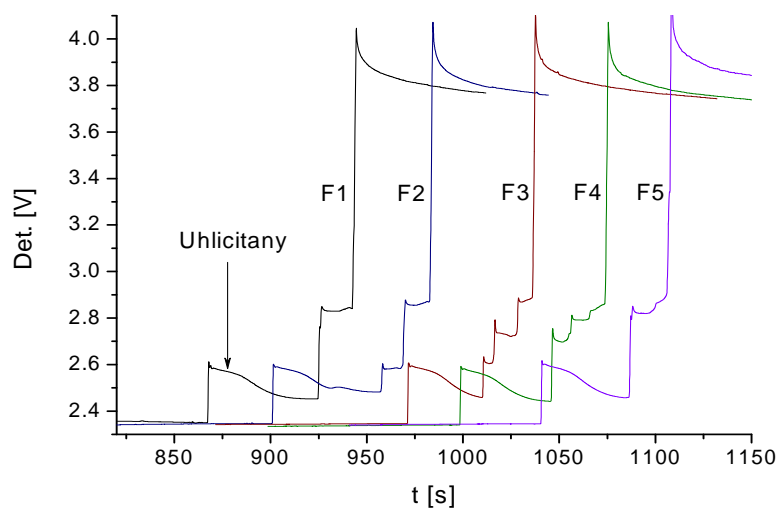
AAD/taurín (TAU), TAU/TE.

Všetky izolované frakcie boli následne kontrolované pomocou CITP s vodivostným detektorom na overenie správnosti výberu frakcie (pre ďalšie analýzy pomocou RP-HPLC) s použitím rovnakých roztokov elektrolytov, ako boli použité pri preparatívnej CITP. Na kontrolu bolo dávkané do kontrolnej ITP 5 μl z danej frakcie cez septum pomocou ihlovej mikrostriekačky s objemom 10 μl .

Výber frakcie bol správny, ak sa v kontrolnom zázname nachádzalo iba ciele rozhranie, čo bolo zrejme z prítomnosti príslušných zón spacerov na izotachforeograme (Obr. 2).



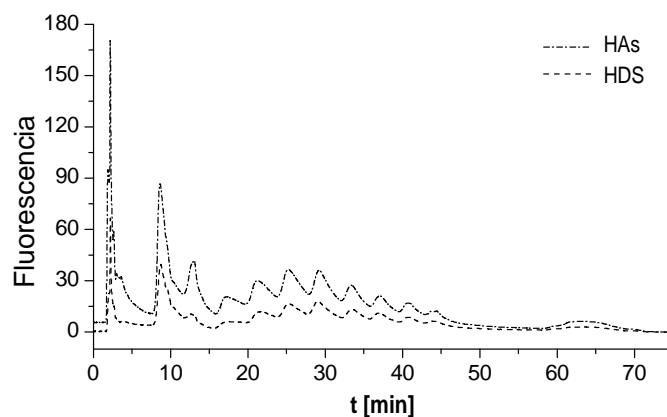
Obr. 1 Izotachforeogram HAS s tromi pridanými spacermi získaný z vodivostného detektora. Šípky ukávajú výber jednotlivých frakcií. Dávkovaná vzorka: 100 mg/l HAS a spacer (ASP,AAD,TAU) o koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ mol/l.



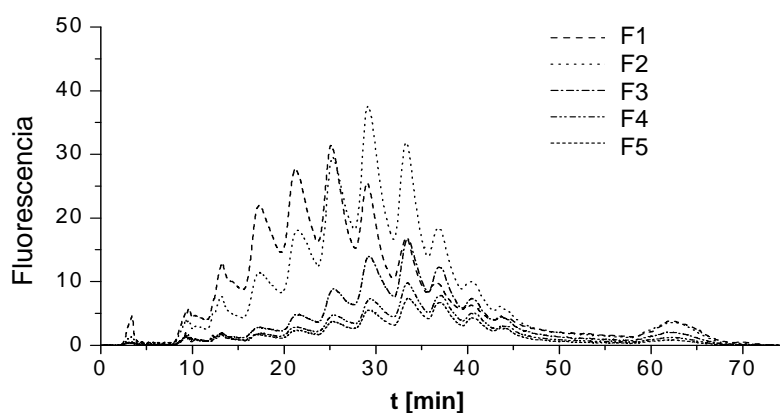
Obr. 2 Izotachforeogram frakcií HAS získaný z vodivostného detektora kontrolnej CITP. Separácie boli uskutočnené v elektrolytovom systéme uvedenom v Tab. 1. Dávkovaný objem frakcie bol 5 μl .

Takto kontrolované frakcie boli ďalej analyzované pomocou RP-HPLC s využitím skokového gradientu mobilnej fázy. Pri analýze ITP frakcií pomocou RP-HPLC (Obr. 4) možno pozorovať, že píky ktoré boli eluované do 15 min. pri separácii celej vzorky humínovej kyseliny (Obr. 3) sú oveľa nižšie alebo úplne neprítomné. Dané zložky HAS

pravdepodobne pri ITP frakcionácii migrovali mimo izolovaných pohyblivostných intervalov. Na chromatogramoch jednotlivých frakcií získaných z preparatívnej CITP (Obr. 4) môžeme vidieť rozdielnú distribúciu hmoty v jednotlivých frakciách a rovnako tak aj posun maxima píkov v závislosti od poradia izolovanej frakcie. Z tohto dôvodu môžeme predpokladať, že jednotlivé frakcie majú rozdielne zloženie látok na základe vlastností kľúčových pre separáciu v danom chromatografickom systéme.



Obr. 3 RP-HPLC profily HAS získané pri použití skokovej gradientovej elúcie z fluorescenčného detektora (ex. 470 nm/em 530 nm). Dávkovaný objem vzoriek bol 100 μ l (HAS – humínová kyselina, HDS – humínová kyselina sa pridanými spacermi).



Obr. 4 RP-HPLC profily CITP frakcií HAS. Chromatogramami boli získané pri použití skokovej gradientovej elúcie z fluorescenčného detektora (ex. 470 nm/em 530 nm). Dávkovaný objem vzoriek bol 50 μ l jednotlivých frakcií.

Záver

Rozdiely medzi chromatografickými záznamami jednotlivých frakcií získaných pomocou preparatívnej CITP naznačujú rozdielny obsah zložiek HAS v jednotlivých frakciách. Z tohto dôvodu preparatívna CITP v kombinácii s RP-HPLC so skokovým gradientom mobilnej fázy môže byť považovaná ako alternatíva na charakterizáciu humínových látok. Overenie tohto prístupu si však ešte bude vyžadovať veľké množstvo analýz rôznych vzoriek HAS.

Pod'akovanie

Táto práca bola finančne podporená grantmi APVV-0583-11 a VEGA 1/1149/12. Táto práca je čiastočne výsledkom projektu VVCE-0070-07 čerpaného v období 2008-2011.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Ghambour, G., Davies, E. A. (EDs.) (2001) Humic Substances: Structures, Models and Functions, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, p. 19
- [2] Skokanová, M., Dercová, K. (2008) Chem. Listy 102, p. 338
- [3] Hutta, M., Góra, R., Halko, R., Chalányová, M. (2011) J. Chromatogr. A 1218, p. 8946
- [4] Ardrey R. E. (2003) Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction. Wiley, New York, USA, p. 7
- [5] Krauss, G. -J., Krauss, G. (1986) Hochleistungs-Flussigchromatographie, Serva Praxishefte, Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, Germany, p. 23
- [6] Hutta, M., Góra, R. (2003) J. Chromatogr. A 1012, p. 67
- [7] Madajová, V., Šimuničová, E., Kaniansky, D., Marák, J., et al. (2005) Electrophoresis 26, p. 2664
- [8] Hutta, M., Kaniansky, D., Kovalčíková, E., Marák, J., et al. (1995) J. Chromatogr. A 689, p. 123
- [9] Nagyová, I., Kaniansky, D. (2001) J. Chromatogr. A 916, p. 191

Syntéza 2-aminooxazol-5-karbonitrilu a jeho využitie pri príprave inhibítora KDR receptoru

Peter Ribar, Andrej Boháč

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; peterribar@gmail.com

Abstrakt

Cancer is currently the second most common disease causing deaths in humans. Angiogenesis - new vessels formation from pre-existing ones - plays an important role in tumor progression. Essential goal within the fight against pathological angiogenesis is the inhibition of VEGFR-2 receptor. Development of small organic drug-like inhibitors represents an efficient way to inhibit angiogenesis. We have accomplished a successful synthesis of a precursor of small molecular weight inhibitors of tumor angiogenesis. Several reaction conditions were tested in order to synthesize required 2-aminooxazol-5-carbonitrile dedicated for development of new in Silico predicted VEGFR-2 based tumor angiogenesis inhibitors.

Kľúčové slová: *angiogenesis, VEGFR-2, small molecular weight organic inhibitors*

Úvod a formulácia cieľa

Angiogenéza je komplexný viacstupňový proces, pri ktorom dochádza k tvorbe nových ciev z už existujúcej cievnej siete [1]. Táto neovaskularizácia zohráva významnú úlohu v mnohých fyziologických procesoch, ako napr. hojenie rán alebo rast sliznice maternice (regulovaná angiogenéza), ako aj pri patologických procesoch, napr. rakovinové ochorenia alebo zápalové ochorenia (patologická angiogenéza) [2]. Za normálnych fyziologických podmienok je proces angiogenézy veľmi dobre regulovaný pomocou pro- a anti-angiogénnych faktorov a je spúšťaný v dospelosti v prípade menštruačného cyklu, tehotenstva a pri hojení rán [3]. Medzi hlavné regulátory angiogenézy patria vaskulárne endoteliálne rastové faktory (VEGF). [1]

Skupina VEGF pozostáva z piatich členov: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D a placentárneho rastového faktoru PlGF. Angiogénny efekt VEGF je prenášaný pomocou troch tyrozínkinázových receptorov: VEGFR1-3 [3].

Všetky proteínové tyrozínkinázové receptory pozostávajú z troch základných častí: a/ extracelulárnej domény, b/ jednoduchej transmembránovej domény a c/ intracelulárnej domény. Extracelulárna doména pozostáva zo siedmich imunoglobulínových (Ig) častí. Intracelulárna doména pozostáva z C- a N- terminálnej časti (C and N-lobes), medzi ktorými

sa nachádza ATP-väzobné miesto (hinge region). ATP väzobné miesto pozostáva z troch regiónov: z adenínovej oblasti, cukornej časti a z oblasti, kde sa viaže fosfátový zvyšok.

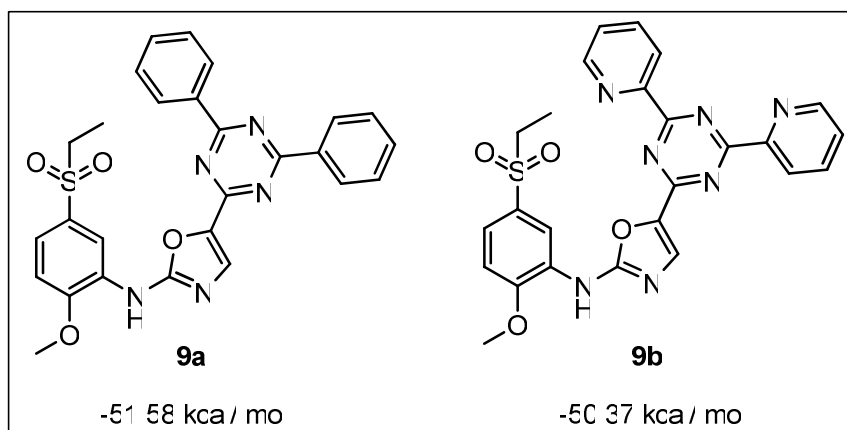
VEGFR signalizačnú dráhu iniciuje naviazanie sa homodimérneho ligandu (napr. VEGF-A) na extracelulárnu časť VEGFR-2 receptora, čo vyvolá homodimerizáciu receptora, autofosforyláciu v jeho intracelulárnej tyrozínkinázovej doméne a bunkovú signalizáciu prostredníctvom VEGFR-2 enzymatickej fosforylácie selektívne rozlíšených intracelulárnych proteínov [4].

Angiogenéza zohráva veľmi významnú úlohu pri raste nádorov a tvorbe metastáz [3]. Aby nádor mohol rásť, potrebuje zásoby kyslíka a živín, ktoré získava prostredníctvom ciev. Nádorová bunka, ktorá sa nachádza blízko cievy, môže byť zásobovaná difúziou. Ak však nie je nádor dostatočne blízko a chce rásť produkuje rastový faktor VEGF-A, ktorý aktivuje endoteliálne bunky k proliferácii, migrácii a tvorbe cievnych štruktúr (diferenciácii) [3, 5].

Začiatkom sedemdesiatych rokov prišiel J. Folkman s myšlienkou, že nádorové ochorenia, je možné liečiť zastavením tumorovej vaskularizácie. V súčasnej dobe existuje veľké množstvo zlúčenín, ktoré vykazujú antiangiogénnu aktivitu [2, 6].

Jednu veľkú skupinu takýchto liečiv predstavujú malé nízkomolekulové inhibítory. Tieto zlúčeniny zväčša fungujú na kompetitívnej báze - naviazaním sa do ATP väzobného miesta tyrozínkinázového receptora. Blokovanie tejto časti receptora zablokuje jeho tyrozínkinázovú aktivitu a to aj napriek existencii väzby rastového faktora VEGF s extracelulárnou časťou VEGFR2 receptora [2].

Hlavným cieľom tejto práce bola syntéza nízkomolekulového prekurzoru 2-aminoxazol-5-karbonitrilu (**8**) (Obr. 2), ktorý bude použitý ako prekurzor na prípravu počítačom predpovedaných inhibítorov tumorovej angiogenézy, napr. **9a** a **9b** (Obr. 1). Ďalším cieľom tejto práce je rozvoj metodík syntézy biologicky významných, no len málo synteticky preskúmaných možností príprav 5-aryloxazolov-2-amínov.



Obr. 1 Počítačovým dokovaním navrhnuté štruktúry inhibítorov VEGFR-2 sprostredkovanej tumorovej neovaskularizácie.

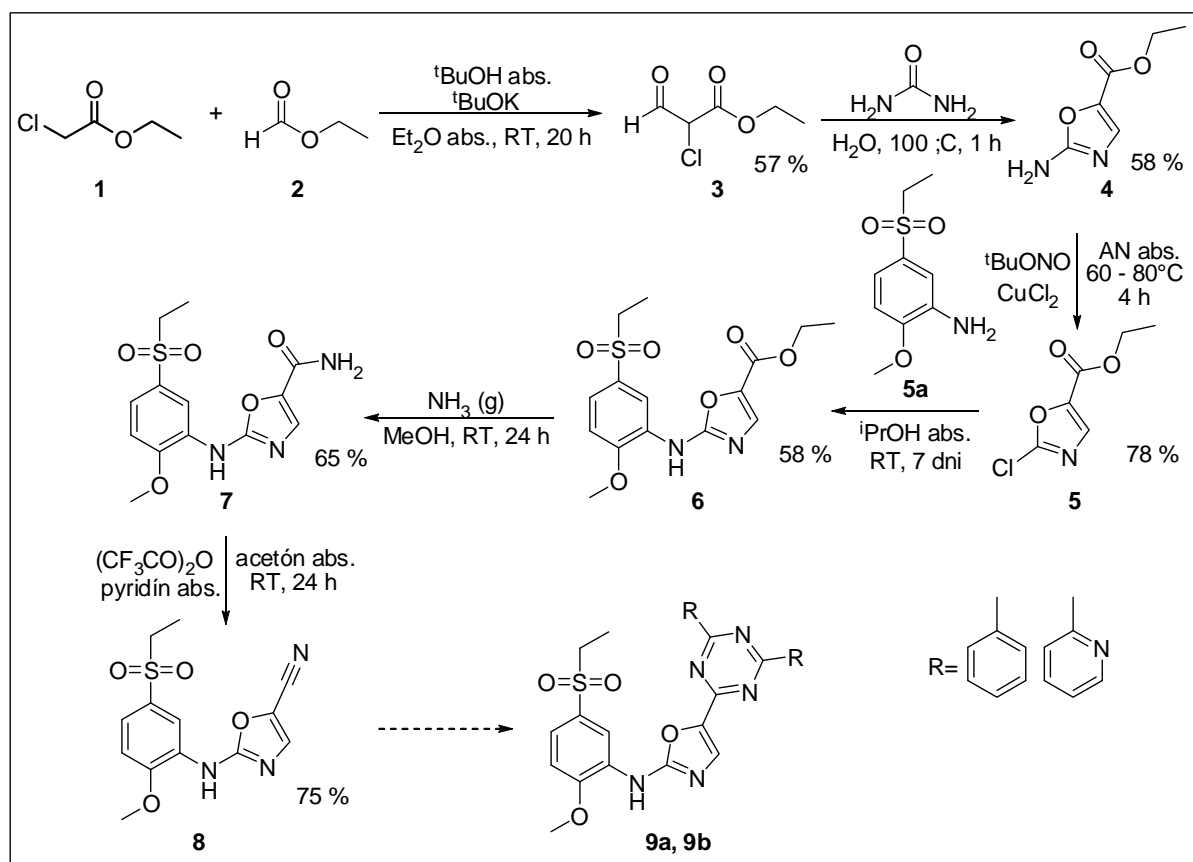
Materiál a metódy

^1H - a ^{13}C -NMR spektrá boli merané v CDCl_3 a DMSO na prístrojoch Varian Gemini (300 a 75 MHz). Chemické posuny sú udávané v jednotkách ppm, ako vnútorný štandard bol použitý tetrametylsilán (TMS). Priebeh reakcií bol sledovaný TLC analýzou (Merck Silica gel 60 F₂₅₄), na detekciu škvŕn sa používala UV lampka 254 nm, ako aj pary jódu. Na FLC chromatografickú separáciu sme používali silikagél Merck 60 (40 – 63 μm). Teploty topenia boli namerané na Koflerovom aparáte a nie sú korigované. Infračervené spektrá boli merané na prístroji FT-IR ThermoNicolet iS10. Všetky použité rozpúšťadlá boli sušené pomocou štandardných postupov uvedených v literatúre. Komerčne dostupné zlúčeniny boli zakúpené od firmy Sigma-Aldrich.

Výsledky a diskusia

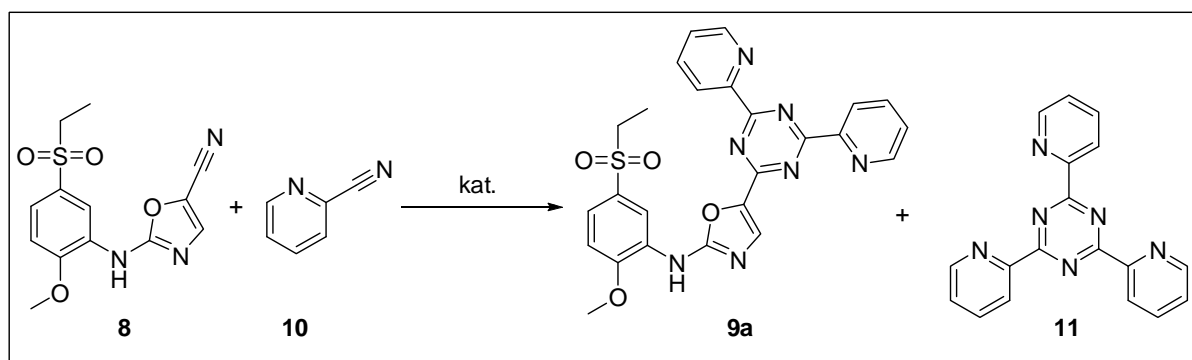
Úspešná syntéza 2-aminoxazol-5-karbonitrilu (**8**) vychádza z komerčne dostupného chlóretylacetátu **1** a etylformiátu **2**, ktoré v podmienkach Claisenovej kondenzácie poskytujú chlóraldehyd **3** v 57 % výťažku. Zistili sme, že v tomto kroku je nutné pridávať oba reaktanty do reakčnej zmesi obsahujúcej bázu spoločne rozpustené v Et_2O . Pokiaľ sa východiskové látky pridávajú postupne, reakcia poskytuje len nízky výťažok a slabú čistotu produktu. Chlóraldehyd **3** v nasledujúcom stupni reaguje s močovinou za vzniku zodpovedajúceho aminooxazolového derivátu **4** v 58 % výťažku. V ďalšom kroku dochádza za podmienok Sandmeyerovej reakcie k transformácii aminoskupiny aminooxazolu **4** na chlór, pričom vzniká 2-chlóroxazol **5** v 78 % výťažku. Zistili sme, že pri spracovaní tejto reakcie je nutné, aby bola reakčná zmes úplne vychladená (RT), v opačnom prípade sa na produkt viaže meď,

ktorá pravdepodobne spôsobuje nižšie výtážky produktu v ďalšej reakcii, kde aminoskupina anilínu **5a** nukleofilne atakuje surový 2-chlóroxazol **5** pričom poskytuje arylaminoxazolester **6** v 58 % výtážku. V našej skupine sme zistili, že táto reakcia musí prebiehať za jemných podmienok (4 dni pri rt, pričom počas reakčnej doby je nutné dodávať ďalšie ekvivalenty chlór oxazolu **5**). Reakciu sme sledovali pomocou TLC (úbytok východiskového anilínu **5a**) a v prípade potreby sme predĺžili reakčný čas, či pridávanie chlór oxazolu **5**. Zistili sme, že arylaminoxazolester **6** poskytuje v amoniakom nasýtenom roztoku suchého metanolu aminooxazolkarboxamid **7** v 65 % výtážku. Ukončenie tejto reakcie je možné vizuálne pozorovať, keďže vzniknutý arylaminoxazolamid **7** vypadáva z roztoku ako biely prášok, čo uľahčuje spracovanie reakcie, ktorú stačí len prefiltrovať. Konečný nízkomolekulový arylaminoxazolnitrilový ligand **8** vzniká pri dehydratačnej reakcii arylaminoxazolamidu **7**, pričom produkt vzniká v 75 % výtážku. Reakciu je nutné uskutočňovať v acetóne, keďže produkt **7**, na rozdiel od východiskovej látky **6** sa výraznejšie rozpúšťa len v zahriatom acetóne.



Obr. 2 Podmienky vyvinutej metodiky na syntézu požadovaného prekursoru N-arylaminooxazolcarbonitrilu **8**.

Z pripraveného arylaminoxazolcarbonitrilu **8** sa pokúšame pripraviť potenciálny inhibítor tumorovej angiogenézy, napr. **9**. Zatiaľ ani jedna z odskúšaných reakčných podmienok opísaných pre cyklotrimerizáciu v literatúre neposkytla požadovaný produkt. Pri katalýze dimetylamidom lítnym sme izolovali východiskové látky. Katalýza anhydridom kyseliny trifluórmetylsulfónovej viedla k rozpadu východiskového ligandu **8**. Pri katalýze pomocou $\text{Yb}(\text{TfO})_3$ sa nám podarilo pripraviť štandard očakávaného vedľajšieho produktu **11** symetrickej homocyklotrimerizácie látky **10**. (Obr. 3) Na hľadani vhodných podmienok zamýšľanej cyklotrimerizačnej reakcie medzi látkami **8** a **10** naďalej pracujeme.



Obr. 3 Uvažovaná syntéza počítačom predpovedaného inhibítora tumorovej angiogenézy **9a** a vedľajšieho produktu **11** vzniknutého homocyklotrimerizáciou východiskového pikolínitrilu **10**.

Záver

Vyvinuli sme metodiku 6 stupňovej syntézy dosiaľ v literatúre neopísaného 2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-karbonitrilu (**8**) (Obr. 2). Táto zlúčenina je pre nás kľúčová a plánujeme ju využiť ako univerzálny farmakofórický fragment na prípravu viacerých počítačom predpovedaných účinných VEGFR2 inhibítorov napr. **9a**, **9b** (ako aj iných zlúčenín, ktorých štruktúry máme výpočtami predpovedané). Vyskúšali sme viacero reakčných podmienok opísaných v literatúre použitých na cyklotrimerizáciu zamýšľanú pre prípravu inhibítorov **9**. Zatiaľ sa nám podarilo [2+2+2] cyklotrimerizáciou pripraviť zlúčeninu **11**, ktorá slúži na overenie podmienok reakcie a tiež potvrdenie reaktivity substrátu **10**, slúži aj ako štandard vedľajšieho produktu, ktorý počas zamýšľaných cyklotrimerizačných reakcií očakávame (Obr. 3). Na metodike vhodných podmienok cyklotrimerizácie pracujeme.

Pod'akovanie

P.R. ďakuje Bc. Jurajovi Dobiášovi a Biomagi s.r.o. za molekulárny docking a štruktúrne predikcie, Mgr. Lucii Lintnerovej za optimalizáciu spôsobu pridávania východiskových látok v prvej reakcii syntézy ligandu **8**. Za finančnú podporu ďakujem Vedeckej grantovej agentúre Ministerstva školstva SR, číslo projektu VEGA 1/0634/13.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Vujasinović T., Buta M., Markicević M., Nikolić - Vukasavlević D. (2006) Arch. Onkol. 14, p. 126
- [2] Tugues S., Koch S., Gualdi L., Li X., Cleasson - Welsh L. (2011) Mol. Aspects Med. 32, p. 88
- [3] Gotnik K. J., Werheul H. M. W. (2010) Angiogenesis 13, p. 1
- [4] Pavlakovic H., Becker J., Albuquerque R., Wilting J., Abati J. (2010) Ann. N. Y. Sci. 1207, p. E7
- [5] Jin Y., Jakobsson L. (2012) Cancers 4, p. 400
- [6] Folkman J. N. (1971) Engl. J. Med. 285, p. 1182

Využitie mikročipovej elektroforézy na stanovenie hlavných zložiek vo farmaceutických preparátoch

Marína Rudašová, Michaela Joanidisová, Róbert Bodor, Marián Masár

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra Analytickej chémie,
Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
rudasova@fns.uniba.sk*

Abstrakt

This work presents use of new analytical methods that provide rapid and accurate determination of active ingredients in various pharmaceutical preparations. The aim of this work was to develop analytical methods realized on a chip for fast and precision determinations of the major component, acetate in antitumor pharmaceutical preparation Buserelin acetate and N-acetylcysteine in various mucolytic pharmaceutical preparations. Isotachophoretic separations were performed on a poly(methylmethacrylate) chip with conductivity detection. External calibration and internal standard methods were used for results evaluation in this respect.

Kľúčové slová: *Izotachoforéza; Buserelin octan; N-acetylcysteín*

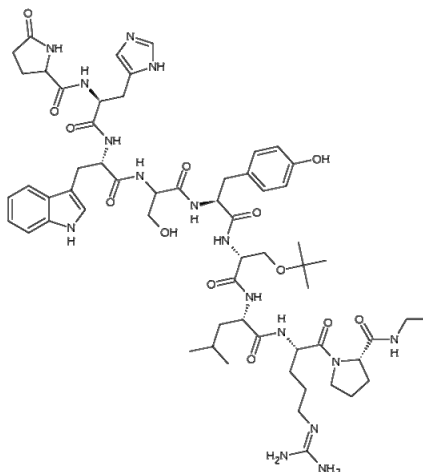
Úvod a formulácia cieľa

Už mnoho rokov je jedným z hlavných cieľov (nielen) analytických chemikov zjednodušenie postupov chemickej analýzy, a to napríklad automatizáciou mnohých krokov. Pri riešení tohto problému zohráva veľkú úlohu „total analysis system“ (TAS) a častejšie v miniaturizovanej forme (μ TAS), ktorá sa rapídne vyvíja od svojho začiatku v roku 1990 [1, 2]. Konceptia μ TAS a tiež „lab on a chip“ sa zameriava na integráciu mikro-analytických systémov, ktorá vykonáva analytické postupy (predúprava vzorky, chemické reakcie, analytické separácie, detekcia, vyhodnotenie výsledkov) na jednom miniaturizovanom zariadení [3, 4]. V porovnaní s chromatografickými metódami sú za týchto podmienok výhodnejšie metódy kapilárnej elektroforézy, ktoré v súčasnosti majú kľúčové postavenie v „lab on a chip“ analytických systémoch. Nakoľko poskytujú ľahšiu automatizáciu analytického postupu, krátky čas analýzy, možnosť analýzy sub-nl objemov vzoriek, zníženie spotreby činidiel a produkcie odpadu a taktiež zníženie finančných nákladov na analýzu, čo sú tiež hlavné ciele koncepcie μ TAS.

Metódy kapilárnej elektroforézy majú širokú oblasť využitia, v posledných rokoch nachádzajú čoraz väčšie uplatnenie vo farmaceutickom priemysle. Kontrola farmaceutických preparátov zahŕňa dva prístupy a to stanovenie hlavných zložiek alebo stanovenie prímiesí a nečistôt v preparáte. Táto práca sa zaoberá stanovením hlavných zložiek farmaceutických preparátov, preto bolo potrebné použitie analytickej metódy s vysokou separačnou kapacitou.

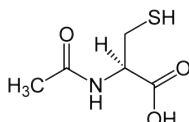
Tieto požiadavky poskytuje izotachoforéza (ITP) na čipe s vodivostnou detekciou, ktorou sa zaoberá táto práca.

Buserelin octan je synteticky vyrábaný oligopeptid využívaný pri liečbe rôznych druhov rakoviny. Má schopnosť blokovat' produkciu pohlavných hormónov, čím ničí hormonálne prostredie potrebné pre delenie rakovintvorných buniek, a zároveň ich aj priamo atakuje. Týmto spôsobom môže byť tvorba nádorov závislých na hormónoch pozastavená, prípadne nádor môže byť zničený [5].



Obr. 1 Štruktúra Buserelin

N-acetylcysteín je prioritne hlavnou zložkou mukolytík, pretože jeho sulfhydrylová skupina (-SH) reaguje s disulfidovou väzbou v mukoproteínoch a tie rozdeľuje na menšie celky, pričom dochádza ku zníženiu viskozity hlienu. Toho dôsledkom je jeho ľahšie vykašliavanie [6].



Obr. 2 Štruktúra N-acetylcysteínu

Cieľom tejto práce bol návrh a realizácia experimentov na ITP stanovenie analytov prítomných vo vzorkách vo vyššej koncentrácii (majoritne zastúpená zložka) a vypracovanie postupov ITP stanovenia hlavných zložiek – octanu v biofarmaceutickom preparáte buserelin octane a N-acetylcysteínu vo farmaceutikách Solmucol 90, Solmucol 200 a ACC Long.

Materiál a metódy

Chemikálie používané na prípravu roztokov elektrolytov a modelových vzoriek boli získané od firmy Merck (Darmstadt, Nemecko), Sigma-Aldrich (Seelze, Nemecko) Serva (Heidelberg, Nemecko) a Lachema (Brno, ČR).

Na prípravu elektrolytov a roztokov vzoriek bola použitá deionizovaná voda čistená cez Pro-PS systém (Labconco, Kansas City, KS, USA) a následne deionizovaná zariadením Simplicity (Millipore, Molsheim, Francúzsko).

Polymetylmetakrylátový (PMMA) čip so spájanými separačnými kanálkami (CC) a integrovanými vodivostnými senzorami (Merck, Darmstadt, Nemecko) použitý v tejto práci bol vyrobený technologickým postupom detailne popísaným v práci [7].

MicroCE Win softvér, ver. 2.4 (Merck) bol použitý na automatickú prípravu analýzy, časovo-programovateľné riadenie CE analýz a zber dát z detektorov a ich vyhodnotenie.

Výsledky a diskusia

Hlavnou úlohou práce bolo ITP stanovenie octanu ako hlavnej zložky v biofarmaceutickom prípravku Buserelin octane a N-acetylcysteínu ako účinnej zložky v rôznych farmaceutických preparátoch na polymetylmetakrylátovom čipe so vstavanými vodivostnými senzormi.

Robustnosť ITP kvantitatívnej analýzy bola sledovaná na základe vyhodnotenia vplyvu fluktuácií experimentálnych podmienok na stanovenie octanov.

Najväčší rozptyl hodnôt smerníc kalibračných grafov pre octan bol pozorovaný pri fluktuáciách hnacieho prúdu (RSD = 8,6 %); použitím vnútorného štandardu došlo k významnému poklesu rozptylu tejto hodnoty (RSD = 0,6 %). Fluktuácie koncentrácie vodiaceho iónu a pH vodiaceho elektrolytu nemali významnejší vplyv na hodnoty smerníc kalibračných čiar pre octan. Pri všetkých sledovaných fluktuáciách experimentálnych podmienok boli hodnoty RSD smerníc kalibračných kriviek pre octan cca. 6-násobne nižšie použitím vnútorných štandardov v porovnaní s externou kalibráciou. Na dosiahnutie presných ITP stanovení bolo potrebné zabezpečiť vysokú čistotu elektrolytových roztokov; v opačnom prípade môže byť kvantitatívna analýza zaťažená chybami.

ITP separácie boli uskutočnené v hydrodynamicky uzatvorenom separačnom systéme s potlačeným EOF a HDF. Za týchto pracovných podmienok sa hodnota RSD dĺžky zóny octanu pohybovala na úrovni 3-4 % nezávisle od použitého čipu a prístroja. Korekciou dĺžky zóny octanu na vnútorný štandard (jantáran) sa opakovateľnosť tohto kvantitatívneho parametra zlepšila cca. 6-8-násobne (0,1-0,7 % RSD), pričom merania boli uskutočnené v priebehu 3 dní na 2 čipoch a 2 prístrojoch.

V prípade N-acetylcysteínu (tab. 1) RSD hodnoty jeho dĺžok zón sa pohybovali v rozmedzí od 1-8% nezávisle od použitého čipu. Po korekcii dĺžok zón N-acetylcysteínu na vnútorný štandard (antranilát) sa opakovateľnosť zlepšila 2-4-násobne, pričom merania boli

uskutočnené na 3 čipoch a 1 prístroji. Vnútorý štandard tak eliminoval fluktuácie dávkovaného objemu od pokusu k pokusu.

Tab. 1 Opakovateľnosti dĺžok zón N-acetylcysteínu

Koncentrácia N-acetylcysteínu (mg/l)	Dĺžka zóny N-acetylcysteínu		Korigovaná dĺžka zóny N-acetylcysteínu/Antranilát	
	Priemer	RSD (%)	Priemer	RSD (%)
50 A	4,02	2,15	0,49	1,30
50 B	4,24	4,29	0,51	1,44
50 C	4,23	7,94	0,51	2,11
100 A	7,60	1,32	0,96	1,14
100 B	8,68	3,34	1,06	0,41
100 C	8,23	1,88	1,01	2,20
200 A	15,55	0,85	1,96	0,39
200 B	16,85	2,88	2,15	0,34
200 C	16,95	2,44	2,14	1,81

A,B,C = ITP merania uskutočnené počas 1 dňa, na 1 čipe (A,B,C) a jednom MCE prístroji; RSD = relatívna smerodajná odchýlka; Koncentrácia antranilátu (vnútorného štandardu) bola cca. 100 mg/l.

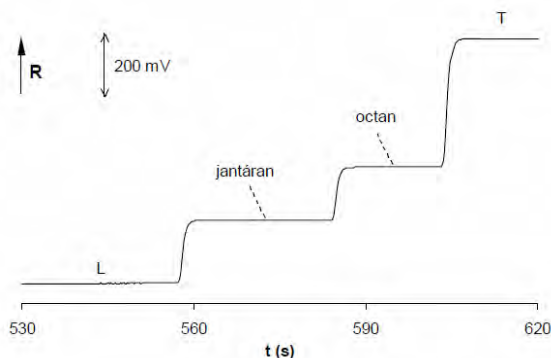
Vynikajúca zhoda parametrov regresných rovníc kalibračných grafov pre octan (tab. 2) na 2 čipoch a 2 prístrojoch dokumentuje ich dlhodobú platnosť za predpokladu, že ITP separácie sú uskutočnené za rovnakých separačných (elektrolytových) podmienok. Tieto fakty favorizujú ITP pred inými (CE) technikami na čipe v prípade, ak sa vyžaduje prenos analytickej metódy od čipu k čipu a od prístroja k prístroju.

Tab. 2 Parametre regresných rovníc ($y = ax + b$) pre kalibračné grafy octanu s použitím jantáranu ako vnútorného štandardu

Parameter	Metóda externej kalibrácie			Metóda vnútorného štandardu			n	Δc (mg/l)
	a (s./mg)	b (s)	R	a	b	R		
A	0,310	0,513	0,9988	1,179	0,011	0,9999	20	20-100
B	0,305	0,457	0,9972	1,178	0,013	0,9999	42	20-100
C	0,310	0,708	0,9833	1,166	0,015	0,9999	64	20-100
Priemer	0,308	0,559		1,174	0,013			
SD	0,01	0,13		0,01	0,01			
RSD (%)	1,0	23,6		0,6	15,9			

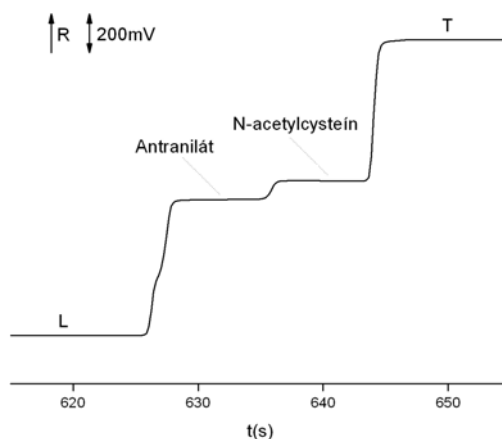
A = ITP merania uskutočnené v priebehu 1 dňa na 1 čipe a 1 prístroji; B = ITP merania uskutočnené v priebehu 2 dní na 2 čipoch a 1 prístroji; C = ITP merania uskutočnené v priebehu 3 dní na 2 čipoch a 2 prístrojoch. Y = dĺžka zóny octanu (s); X = koncentrácia octanu vo vzorke (mg/l); a = smernica kalibračného grafu; b = úsek kalibračného grafu; R = korelačný koeficient; n = počet meraní; Δc = koncentračný interval. Koncentrácia jantáranu (vnútorný štandard) v modelových vzorkách bola cca. 100 mg/l.

Na základe vyhodnotenia základných parametrov ITP kvantitatívnej analýzy na čipe bola vypracovaná metóda na stanovenie octanu ako anionicky migrujúcej zložky v buserelin octane (obr. 3). Obsahy octanu v buserelin octane boli vyhodnotené metódami externej kalibrácie a vnútorného štandardu, pričom metóda externej kalibrácie vykazovala výraznejší rozptyl hodnôt obsahu octanu vo vzorke (cca. 5-násobne vyššie RSD hodnoty). Vypočítané hodnoty výťažnosti (99-100 %) predurčujú navrhnutú ITP metódu na veľmi presné stanovenie octanu v buserelin octane.



Obr. 3 ITP separácia octanu v buserelin octane s jantáranom použitým ako vnútorný štandard na čipe. Dávkovaná vzorka obsahovala buserelin octan o koncentrácii cca. 1189 mg/l a jantáran (vnútorný štandard) o koncentrácii cca. 100 mg/l. Separácia bola uskutočnená s hnacím prúdom 10 μ A. L = vodiaci ión; T = zakončujúci ión; R = odpor.

Na základe pK_a hodnôt N-acetylcysteínu ($pK_{a1} = 9,52$ tiolová skupina a $pK_{a2} = 3,24$ karboxylová skupina) boli optimalizované základné separačné parametre pre rýchle a vysoko-presné stanovenie N-acetylcysteínu. Obr. 4 ukazuje izotachoforeogram z analýzy N-acetylcysteínu vo vzorke Solmucolu 200. Vzorka obsahovala 100 mg/l N-acetylcysteínu a 100 mg/l kyseliny antranilovej, ktorá bola použitá ako vnútorný štandard. Separácie prebiehali pri prúde 20 μ A v hydrodynamicky uzatvorenom separačnom systéme s potlačením EOF a HDF.



Obr. 4 ITP separácia N-acetylcysteínu v modelovej vzorke s antranilátom použitým ako vnútorný štandard na čipe. L = vodiaci elektrolyt; T = zakončujúci elektrolyt; R = odpor.

Metódami externej kalibrácie a vnútorného štandardu boli vyhodnotené obsahy octanu v liečive buserelin octane a N-acetylcysteín v liečivách Solmocol 90, Solmocol 200 a ACC Long. V oboch prípadoch metóda externej kalibrácie vykazovala väčší rozptyl obsahov octanu (približne 5-10-násobne vyššie RSD hodnoty) a N-acetylcysteínu (približne 10-násobne vyššie RSD hodnoty) vo vzorkách.

Záver

Hlavným cieľom práce bolo presné stanovenie účinných zložiek rôznych farmaceutík, octanu v Buserelin octane a N-acetylcysteínu v Solmucole metódou ITP na čipe s využitím vodivostnej detekcie. Výsledky práce ukázali, že vyvinuté ITP metódy môžu byť výhodne použité na rýchle analýzy týchto farmaceutík. Zároveň vývoj nových analytických metód, ktoré by poskytli rýchle a presné stanovenia týchto zložiek je v súčasnosti veľmi žiadaný vo farmaceutickej analýze. Miniaturizované analytické systémy v tomto ohľade spĺňajú všetky požiadavky na rýchly monitoring, ale aj koncentračnú citlivosť, kladené na moderné analytické prístupy vo farmaceutickej analýze.

Pod'akovanie

Práca vychádza z projektu „Priemyselný výskum nových liečiv na báze rekombinantných proteínov“ podporeného Operačným programom Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja v spolupráci s firmou hameln rds, Modra (ITMS 26240220034; ASFEU), je podporená Grantovou agentúrou MŠ SR (VEGA 1/1149/12) a Univerzitou Komenského v Bratislave (UK/142/2013).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Manz A., Graber N., Widner H. M. (1990) Sens. Actuator 1(1-6), p. 244
- [2] Reyes D. R., Iossifidis D., Manz A. (2002) Anal. Chem. 74(12), p. 2623
- [3] Lichtenberg J., De Rooij N. F., Verpoorte E. (2002) Talanta 56(2), p. 233
- [4] Huikko K., Kostianen R., Kotiaho T. (2003) Eur. J. Pharm. Sci. 20(2), p. 149
- [5] Marimus am Stein Private clinic for holistic cancer therapy [citované: 7. marec 2013] [~http://www.klinik-marinus.com/eng/index.php?page=30&subpage=3~](http://www.klinik-marinus.com/eng/index.php?page=30&subpage=3)
- [6] Tomkiewicz R. P., App E. M., De Sanctis G.T., et al. (1995) Pulm. Pharmacol. 8(6), p. 259
- [7] Grass B., Neyer A., Jöhnck M., et al. (2001) Sensor. Actuator. B-Chem. 72(3), p.249

Chémia rádio-frekvenčného zdroja negatívnych iónov vodíka

Ján Škoviera, Ivan Černušák

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyzikálnej a teoretickej chémie, Mlynská dolina CH-1, 84215 Bratislava, Slovenská Republika;
skoviera@fns.uniba.sk*

Abstrakt

International Thermonuclear Experimental Reactor (ITER) is a prototype of nuclear fusion reactor TOKAMAK currently build in Cadarache. It will use as one of primary plasma heating components a radio-frequency driven negative ion source of deuterium. The purpose of cesium evaporated in the part of this ion source is to react with free electrons which can incidentally destroy generated hydrogen ions and are co-extracted with the hydrogen beam. Goal of this work is to investigate majority of processes which might have impact on hydrogen anion in either formative or destructive way associated with cesium. Generally the caesium dynamics is very complex in such sources and the interplay of the individual contributions and their control to establish optimum caesium coverage of the plasma grid is still an open issue.

KLúčové slová: *Hydrid cézia; Zdroj negatívnych vodíkových iónov; CASPT2; CCSD(T)*

Úvod a formulácia cieľa

V súčasnosti sa veľa úsilia venuje vývoju termonukleárnych reaktorov (Tokamak), ktoré by mohli slúžiť ako mimoriadne účinný a ekologický zdroj elektrického prúdu. V súčasnosti síce existuje viacero experimentálnych termonukleárnych reaktorov, ale žiaden z ich v skutočnosti neprodukuje elektrický prúd. Je to preto, lebo množstvo energie potrebnej na udržanie termonukleárnej reakcie je zatiaľ vo všetkých súčasných experimentálnych reaktoroch väčšie ako elektrická energia, ktorá sa reakciou získa. Medzinárodný termonukleárny experimentálny reaktor ITER (International Thermonuclear Experimental Reactor) je prvý experimentálny reaktor, ktorý by mal skutočne produkovať elektrický prúd. Pre jeho potreby je nutné vyvinúť zariadenie, ktoré bude produkovať lúč záporne nabitých vodíkových (deutériových) iónov. Toto zariadenie bude teda sprostredkovať fúzny materiál a zároveň tým zahrievať plazmu. Na dosiahnutie dostatočného prúdu deutériových iónov je nutné použitie plynného cézia (zmes Cs a Cs⁺), ktorého komplexná dynamika silno ovplyvňuje výkon zdroja [1, 2]. Preskúmanie možných procesov v zdroji by mohlo pomôcť stanoviť optimálne parametre zdroja, ktoré sú stále otvorenou otázkou.

Cieľom tejto práce je výpočet vlastností a reaktivity klastrov typu Cs_xH_y. Medzi tieto vlastnosti patrí disociačná energia, reakčná energia a aktivačná energia. Cieľom je aj teoretické

popísanie priebehu jednotlivých krokov v reakciách.

Materiál a metódy

Na výpočty uvedených vlastností sme zvolili kvantovomechanický prístup implementovaný vo výpočtovom programe MOLCAS [3] so zahrnutím elektrónovej korelácie a skalárnych relativistických efektov pomocou Douglassovho Krollovho Hessovho hamiltoniánu [4]. Použili sme bázu ANO-RCC-VQZP. Geometrie boli získané výpočtovým programom Gaussian [5] metódou MP2 s pseudo-potenciálom ECP46MDF. Reakčné energie sme získali metódou counterpoise, ktorú vyvinul Xanthenas a kol. [6]. Reakčné cesty v prípade kolineárnych klastrov sa získali pomocou metódy CCSD(T) a CASPT2 – metódou state-averaging sme získali energiu pre základný stav a niekoľko excitovaných. Opakovanou zmenou medziatomárnej vzdialenosti sme získali energetický profil reakcie.

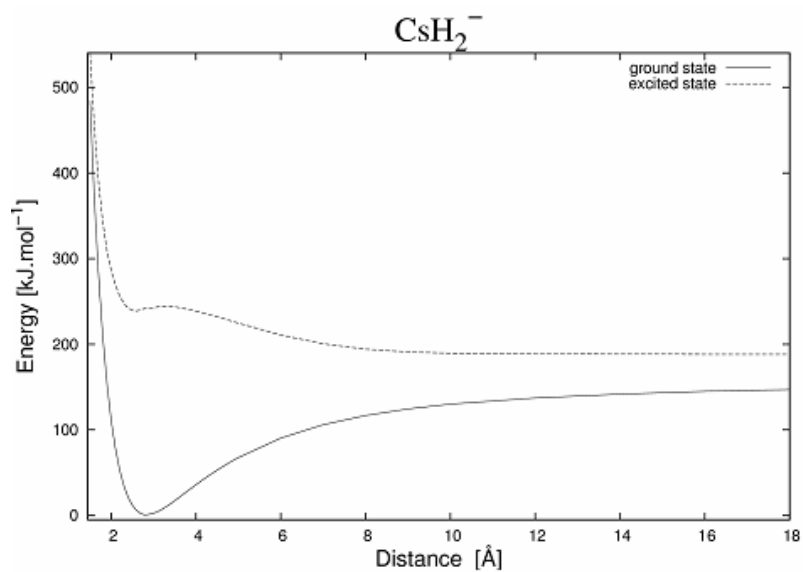
Výsledky a diskusia

Na základe geometrií získaných pomocou výpočtového programu Gaussian sme vypočítali rozdiel medzi energiou reaktantov a produktov korigovaný o báзовú superpozičnú chybu a geometrickú relaxáciu metódou counterpoise. Medzi stabilnými klastrami sa nachádzajú CsH_2^- a Cs_2H^- . Tabuľka 1 udáva reakčné energie bez korekcie a s korekciou na báзовú superpozičnú chybu a geometrickú relaxáciu.

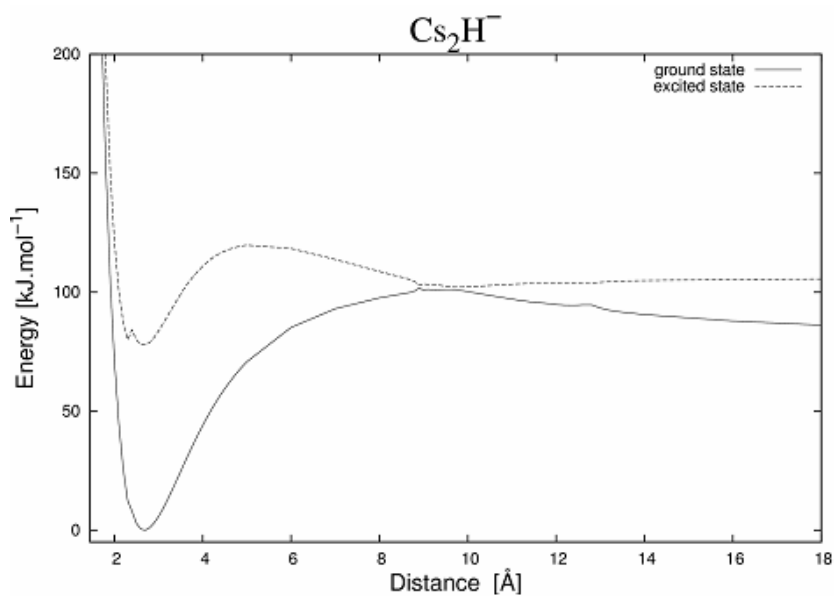
Tab. 1 Reakčné energie kolineárnych reakcií

Reakcia	Nekorigovaná energia	Korigovaná energia
$\text{CsH}^- + \text{H}$	-149.6	-146.4
$\text{CsH} + \text{H}^-$	-100.7	-95.3
$\text{CsH}^- + \text{Cs}$	-27.7	-19.7

Obrázok 1 ukazuje CASPT2 energiu závislosť energie od vzdialenosti jedného vodíka od atómu cézia, pričom druhý vodík je vo fixnej vzdialenosti. Závislosť ukazuje základný stav spolu s prvým excitovaným stavom. Táto závislosť indikuje bezbariérovosť reakcie. Z Mullikenovej populačnej analýzy vyplýva, že ide o reakciu $\text{CsH} + \text{H}^-$ (spodná krivka, základný stav produktu). Prvý excitovaný stav produktu sa rozpadá na fragmenty $\text{CsH}^- + \text{H}$.



Obr.1: Disociačná krivka CsH_2^-



Obr.2: Disociačná krivka Cs_2H^-

Obrázok 2 ukazuje disociačnú krivku Cs_2H^- . Z Mullikenovej populačnej analýzy vyplýva, že spodná krivka znázorňuje reakciu $\text{CsH}^- + \text{Cs}$. Táto reakcia má malú bariéru spôsobenú zabráneným krížením s prvým excitovaným stavom.

Záver

Získanie dát o reakciách prebiehajúcich v zdroji vodíkových iónov patrí k dôležitým úlohám kvantovej chémie, keďže môže významne pomôcť pri riešení technického zariadenia nevyhnutného pre chod medzinárodného termonukleárneho experimentálneho reaktora a termonukleárne reaktory by v budúcnosti mali slúžiť ako ekologický a stabilný zdroj elektrickej energie. V ďalšej etape podrobne vyšetríme bariéru reakcie $\text{CsH}^- + \text{Cs}$ s cieľom vypočítať rýchlostnú konštantu tohto procesu. Teoretický model podobných reakcií môže umožniť získanie presných hodnôt parametrov zdroja vodíkových iónov a optimalizovať tak jeho technologický dizajn.

Pod'akovanie

Táto práca vznikla za podpory EURATOM/CU (kontrakt FU07-CT-2006-00441) a grantu UK/304/2013. Časť práce je výsledkom projektu „Vybudovanie Centra excelentnosti metód a procesov zelenej chémie CGreen-I 26240120001“ na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] G. Wolf, A. Reiher, M. Moritz (2005) *J. Chem. Phys.* 123(18), p.1
- [2] P. Falter, H.D. Fantz, U. Kraus, W. Berger, M. Christ-Koch, S. Fröschle, M. Gutser, R. Heinemann, B. Hilbert, S. Leyer, S. Martens, C. McNeely, P. Riedl, R. Speth, E. Wunderlich, D. Franzen. (2007) *Nucl. Fusion* 47(4), p.264
- [3] G. Karlström, R. Lindh, P. Malmqvist, B.O. Ross, U. Ryde, V. Veryazov, P.O. Widmark, M. Cossi, B. Schimmelpfennig, P. Neogrady, L. Seijo (2003) *Computational Material Science* 28, p. 222
- [4] M. Douglass, N. M. Kroll, (1974) *Annals of Physics* 82, p.89
- [5] Gaussian 09, Revision A.2, M. J. Frisch et al., Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009
- [6] Xantheas, S. S. *J. Chem. Phys.* (1996), 104, p.8821

Vplyv aniónov a katiónov na kvapalinovú extrakciu TcO_4^- v iónových kvapalinách

Pavol Suchánek¹, Michal Galamboš¹, Mária Mečiarová², Pavol Rajec¹

¹Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra jadrovej chémie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská Republika; palo.suchanek@gmail.com

²Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská Republika

Abstrakt

An influence of monovalent and divalent cations and anions on an liquid extraction of pertechnetate anion from aqueous media using ionic liquids solubilized in various organic solvents has been studied. Suppression of extraction percentage was obtained with a divalent cations in a compare with monovalent cations showing almost no influence on extraction percentage. In a case of anions, perchlorate anion suppressed the extraction percentage in a highest degree.

Kľúčové slová: ionic liquids, extraction, pertechnetate, anion, cation

Úvod a formulácia cieľa

Iónové kvapaliny sú látky skladajúce sa z organického katiónu a anorganického alebo organického aniónu s teplotou topenia nižšou ako 100 °C. Hlavnými výhodnými vlastnosťami týchto zlúčením sú prakticky nulová tenzia pár, vysoká termostabilita, nízka toxicita, nehorlavosť a unikátne solvatačné vlastnosti. V ich štruktúre nedochádza ku koordinácii medzi katiónom a aniónom, tieto ióny sú objemné a nemajú lokalizovaný náboj. Medzi takéto katióny patria zlúčeniny obsahujúce kvartérny atóm dusíka, fosforu alebo síry. Anióny bývajú väčšinou tetrachloroaluminát, tetrafluoroborát, hexafluorofosfát, dusičnan, octan, trifluoroacetat, trifluorometánsulfonát, tosylát a ďalšie. Dôležitou podmienkou stability iónovej kvapaliny je, aby bol atóm nesúci náboj plne substituovaný [1-7].

Skúmanie extrakčných vlastností iónových kvapalín ako moderných zlúčenín pre extrakciu iónov kovov z vodných roztokov sa rozmohlo začiatkom deväťdesiatych rokov minulého storočia [7-11]. Extrakciu technecistanového aniónu z vodnej do organickej fázy tvorenej rozpustenou iónovou kvapalinou v bežnom organickom rozpúšťadle ovplyvňujú ako anióny, tak aj katióny. Cieľom práce bolo objasniť vplyv katiónov (Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) a aniónov (Cl^- , Br^- , I^- , ClO_4^- , NO_3^- , CH_3COO^- , HCOO^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} (COO)₂²⁻) na množstvo extrahovaného technecistanového aniónu [12,13].

Materiál a metódy

V experimentoch boli použité komerčne dostupné iónové kvapaliny, a to

1. trihexyltetradecylfosfónium chlorid -Cyphos 3653
2. 1-decyl-3-metylimidazolium bis(trifluorometylsulfonyl) imid
3. 1-hexyl-3-metylimidazolium tris(pentafluoroetyl)trifluoro fosfát
4. 1-butyl-3-metylimidazolium hexafluoro fosfát
5. tributylhexadecylfosfónium bromid
6. tributylloktylfosfónium bis(trifluorometyl) sulfonylimid

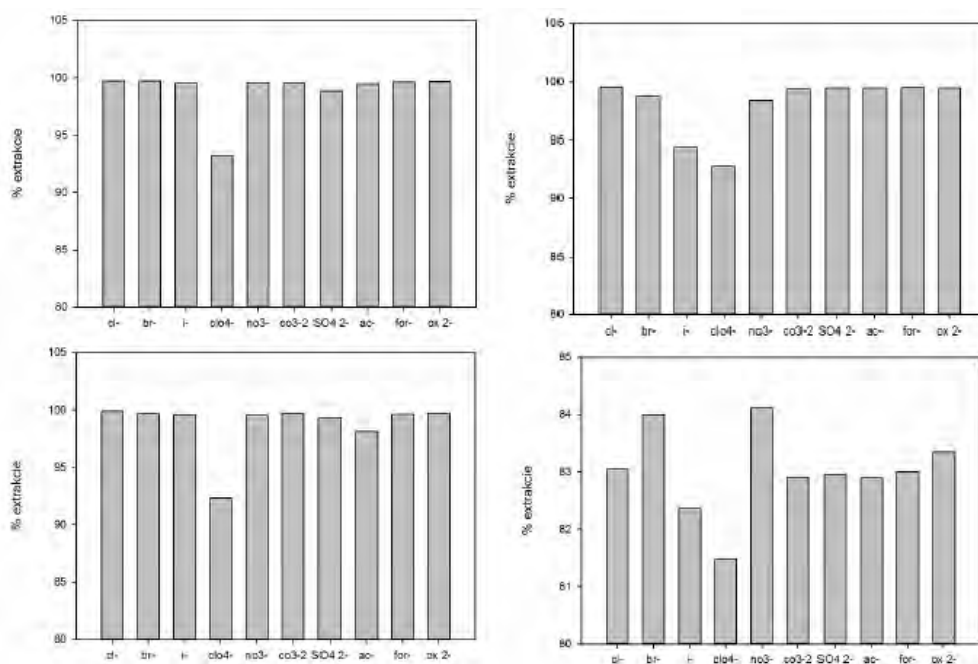
Vyššie uvedené iónové kvapaliny boli rozpustené vo vopred vytipovaných organických rozpúšťadlách vzhľadom k ich polarite, vzostupne cyklohexán, chloroform, toluén a n-butanol. Ako zdroj technecistanového aniónu bol použitý generátorový roztok vo forme sodnej soli.

Kvapalinová extrakcia bola vykonaná v statickom usporiadaní experimentu tzv. „batch“ metódou, pomer organickej a vodnej fázy 1:1, vodná fáza bola nastavená prídavkom HCl na hodnotu pH = 2. Doba miešania s využitím laboratórnej miešačky Biosan bola 15 minút. Odpipetovaná vodná fáza bola zmeraná prístrojom Perkin & Elmer 1470 a nameraný počet impulzov bol porovnaný s „blank“ roztokom technecistanu sodneho.

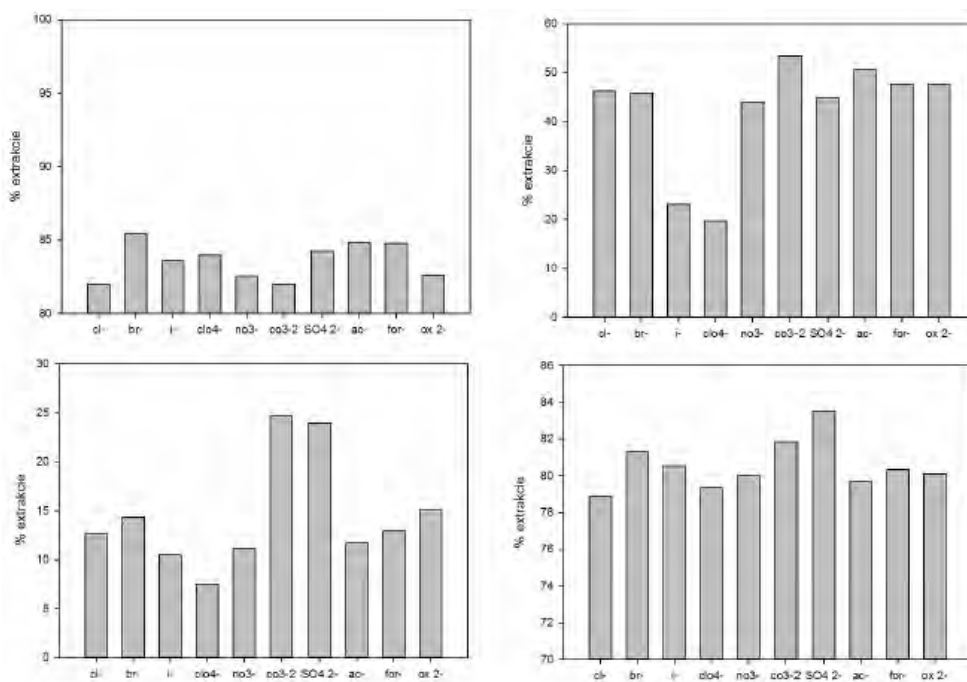
Výsledky a diskusia

Tab. 1 Zloženie vzoriek organických fáz

1	1	cyklohexán
2	1	chloroform
3	1	toluén
4	1	n-butanol
5	2	chloroform
6	2	toluén
7	2	n-butanol
8	3	n-butanol
9	4	chloroform
10	5	cyklohexán
11	5	chloroform
12	5	toluén
13	5	n-butanol
14	6	chloroform
15	6	toluén
16	6	n-butanol

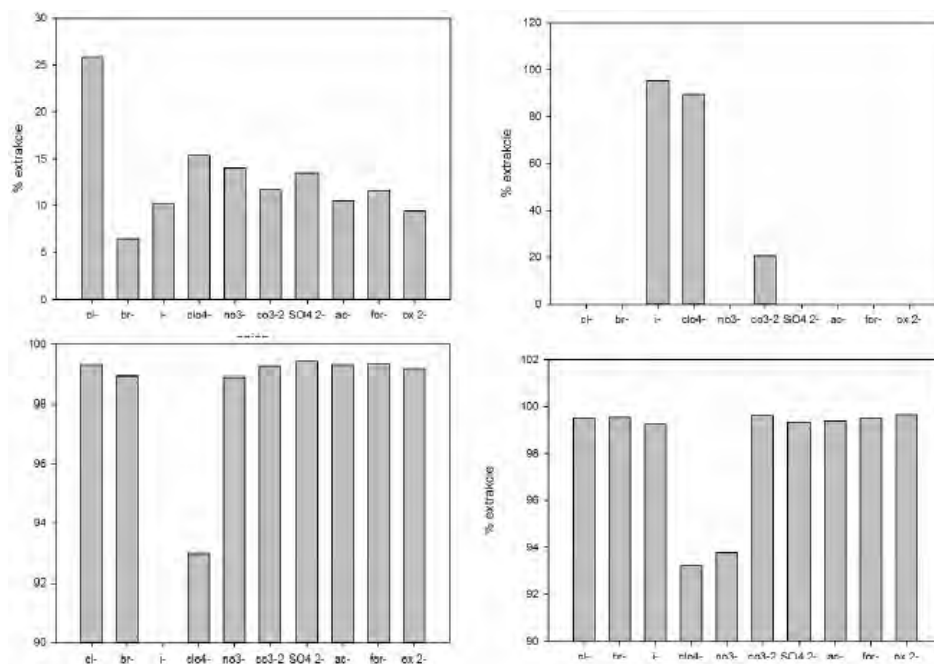


Obr. 1 Vplyv aniónov na podiel extrakcie TcO_4^- do organickej fázy s použitím vzoriek 1,2,3,4

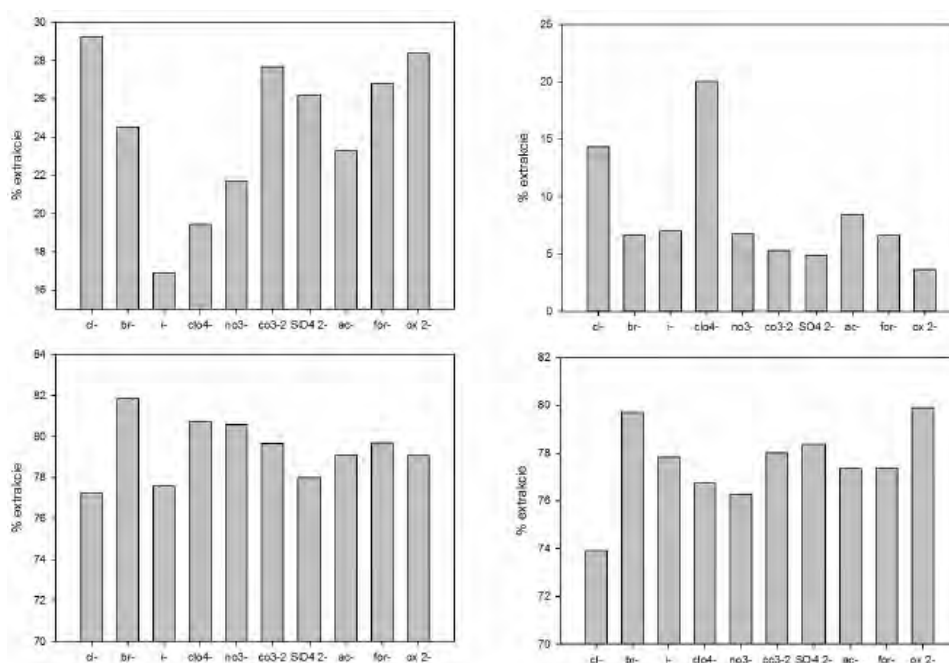


Obr. 2 Vplyv aniónov na podiel extrakcie TcO_4^- do organickej fázy s použitím vzoriek 5,6,7,8

Chloristanový anión ovplyvňuje podiel extrakcie TcO_4^- do organickej fázy so solubilizovanou iónovou kvapalinou č.1 v najväčšej miere (Obr. 1). Vo vzorkách, kde bolo použité ako rozpúšťadlo chloroform alebo n-butanol bol tiež značný vplyv iodidových aniónov, čo bolo zrejme zo zafarbenia organickej fázy.

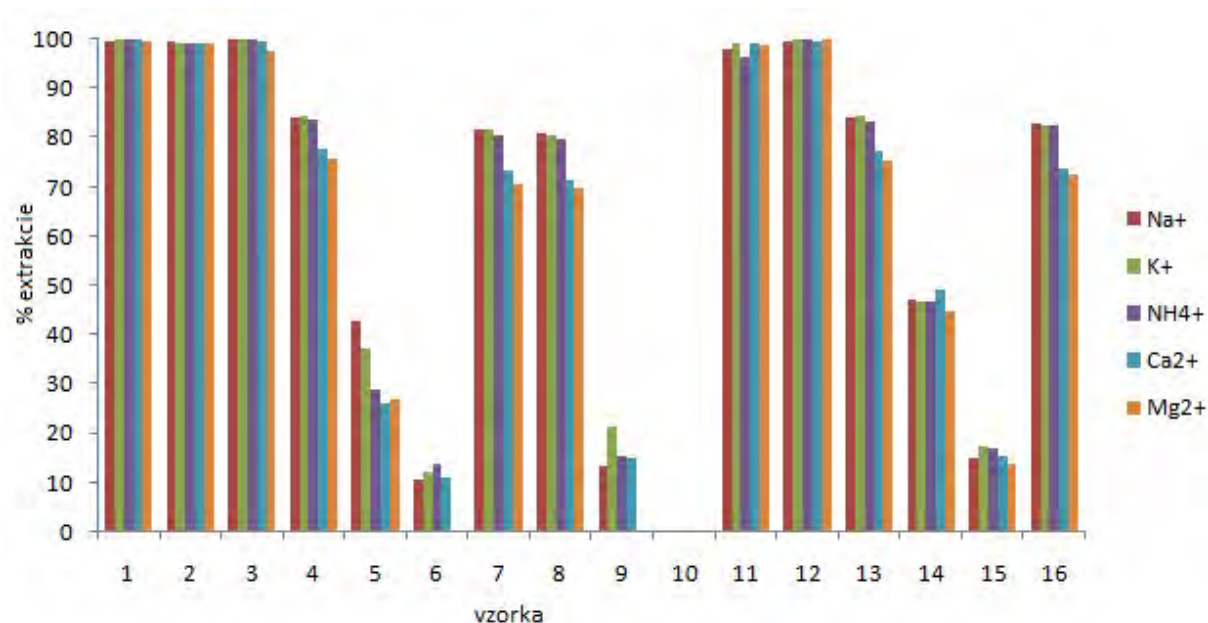


Obr. 3 Vplyv aniónov na podiel extrakcie TcO_4^- do organickej fázy s použitím vzoriek 9,10,11,12



Obr. 4 Vplyv aniónov na podiel extrakcie TcO_4^- do organickej fázy s použitím vzoriek 13,14,15,16

Pre extrakciu TcO_4^- z vodnej fázy sú vhodné iba vzorky č. 10 a 11 (Obr. 3). Pri vzorke č.13 potláčali extrakciu TcO_4^- najviac anióny I.



Obr. 5 Vplyv katiónov na podiel extrakcie TcO_4^- do organickej fázy

Dvojmocné katióny ovplyvňujú extrakciu TcO_4^- negatívne (Obr. 5), na rozdiel od jednomocných katiónov.

Záver

Z uvedených výsledkov v tejto práci vyplýva, že extrakciu TcO_4^- z vodnej fázy jednomocné katióny prakticky neovplyvňujú, na rozdiel od dvojmocných, kde je zníženie množstva extrahovaného TcO_4^- merateľné v rozmedzí do 10 %. Najviac vplyva na extrakciu TcO_4^- chloristanový anión, ktorý značne znižuje množstvo extrahovaného TcO_4^- .

Zoznam použitej literatúry

- [1] Hanusek J. (2005) Chem. Listy, 99, p. 263
- [2] Galamboš M., Kufčáková J., Rajec P. (2007) ChemZi, 3(1), p. 75
- [3] Galamboš M., Kufčáková J., Rajec P. (2007) XXIX. Dny radiační ochrany 2007, Sborník rozšířených abstraktu, Hrubý Jeseník, p. 208
- [4] Galamboš M., Kufčáková J., Rajec P. (2010) Chem. Listy, 104(6), s. 454
- [5] Galamboš M., Rosskopfová O., Pupák M., Rajec P. (2009) Zabezpečenie kvality v rádiochemických laboratóriách. OMEGA INFO, Bratislava, s. 29
- [6] Galamboš M., Rosskopfová O., Pupák M., Rajec P. (2009) Zabezpečenie kvality v rádiochemických laboratóriách. OMEGA INFO, Bratislava, s. 11

- [7] Wasserscheid P., Welton T. (2002) *Ionic liquids in synthesis*. Wiley-VCH, Weinheim, p. 7
- [8] Cejpková Z. (2005) *Chemagazín XIV(5)*, s. 22
- [9] Pitner W. (2004) *Ionic liquids Workshop*, Merck KGaA, Darmstadt, Germany, p. 27
- [10] Wilkes J. S., Levisky J. A., Wilson R. A. et al. (1982) *Inorg. Chem.* 21(3), p. 1263
- [11] Wilkes J. S., Zaworotko M. J. (1992) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* p. 965
- [12] Cole A. C., Jensen J. L., Ntai I. et al. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124, p. 5962
- [13] Visser A. E., Swatloski R. P., Reichert W. M. (2002) *Environ. Sci. Technol.* 36(11), p. 2523

Organokatalytické reakcie s využitím SOMO aktivácie

Pavol Tisovský, Mária Mečiarová, Radovan Šebesta

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie,
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; tisovsky@fns.uniba.sk*

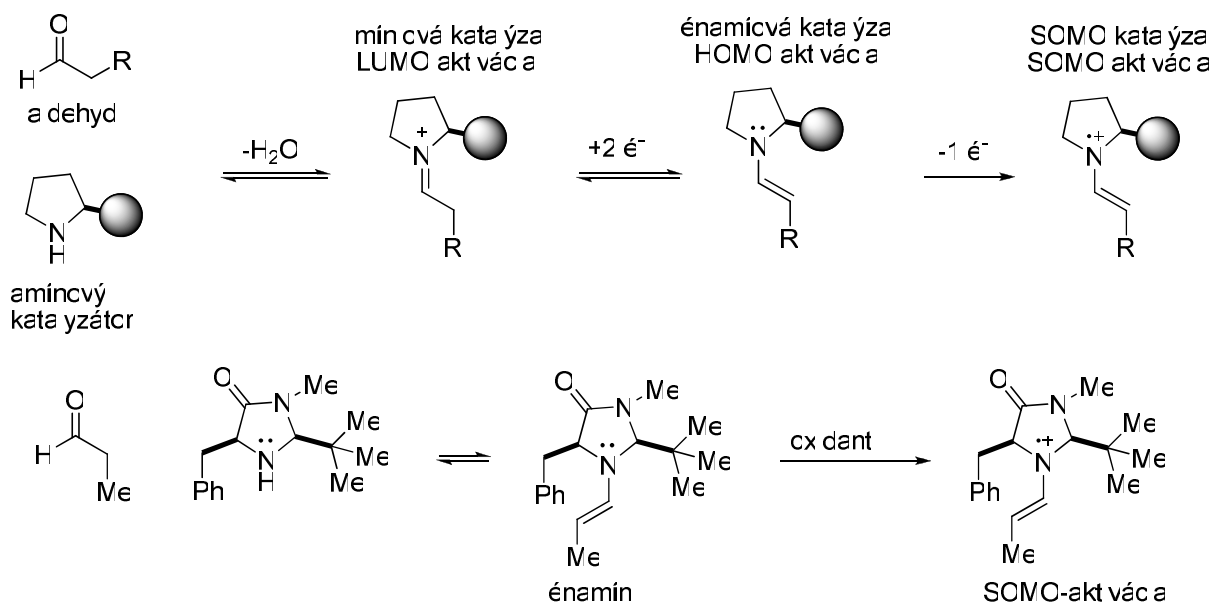
Abstrakt

The asymmetric α -addition of nonpolar hydrocarbon substrates, such as allyl and aryl groups to carbonyl compounds remains a largely unsolved problem in organic synthesis. Singly occupied molecular orbital activation provides a useful synthetic pathway for asymmetric α -substitution of aldehydes. A one-electron oxidation of a transient enamine intermediate should generate a 3π -electron radical-cation species with a singly occupied molecular orbital that is activated toward a range of enantioselective catalytic transformations not currently possible with established catalysis concepts. The scope of SOMO activation includes α -allylic alkylation, α -enolation, α -vinylation, α -chlorination and α -arylation of a range of aldehydes. The aim of our work was to study the possibility of enlarge the scope of enolsilanes used in asymmetric organocatalytic SOMO enolation. We tested cyclic enolsilanes in addition reaction to two aldehydes using different catalyst. The products were isolated in 13-70 % with e.r. 57:43 to 82:18. We also focused our attention on organocatalytic SOMO enolation of ketones.

Kľúčové slová: *organokatalýza, SOMO aktivácia, aldehyd,*

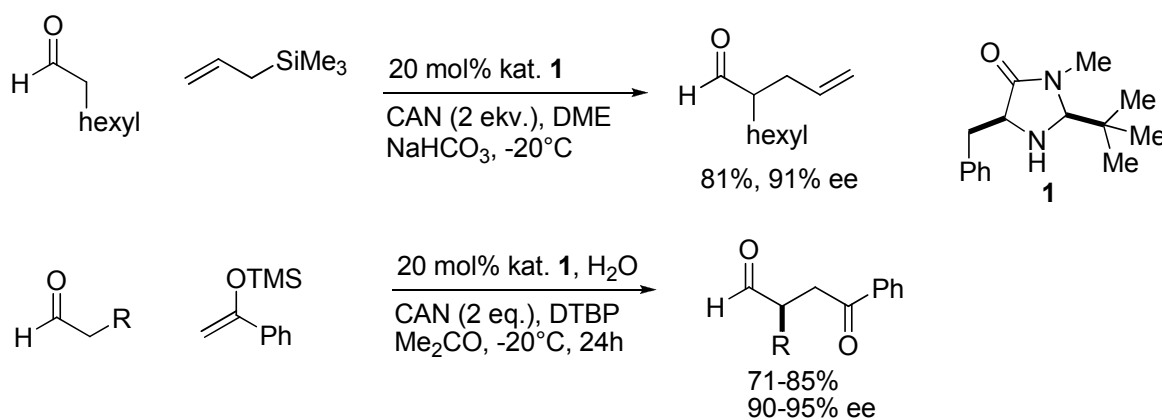
Úvod a formulácia cieľa

Od prelomu storočí sa výrazne rozvíja organokatalýza, ktorá využíva malé organické molekuly ako katalyzátory pre asymetrické transformácie. Významne k tomuto rozvoju prispel MacMillan, ktorý rozvinul koncept imíniovej katalýzy. [1] Pri týchto reakciách dochádza k zníženiu energie LUMO orbitálu substrátu, čo uľahčuje enantioselektívne C-C a C-N konjugované adície, cykloadície, hydrogenácie a Friedelove-Craftsove alkylácie. [2] Súbežne Barbas a List [3] rozvinuli koncept enamínovej katalýzy, ktorá zvyšuje energiu HOMO orbitálu aldehydov a ketónov, čím napomáha ich enantioselektívnym α -funkcionalizáciám s veľkým počtom elektrofilov. [4] MacMillan a kol. predpokladali, že jednoelektrónovou oxidáciou prechodného enamínového tranzitného stavu by mohol vznikáť kation-radikál s molekulovým orbitálom obsadeným jedným elektrónom (SOMO) (obrázok 1). [5, 6] Takto aktivovaný aldehyd podlieha rôznym enantioselektívnym katalytickým transformáciám, ktoré doposiaľ neboli uskutočniteľné alebo na ich priebeh bolo treba vytvoriť špeciálne podmienky.



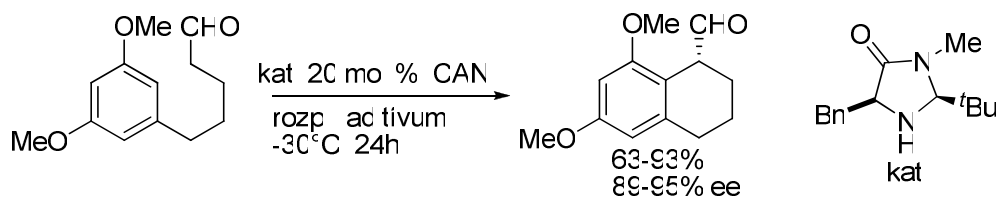
Obr.1

Ako prvé boli opísané enantioselektívne alylové alkylácie aldehydov (obrázok 2). Reakcie prebiehali pri nízkach teplotách s vysokými výťažkami (71–85%) a produkty boli izolované s enantiomérnym nadbytkom nad 90 %.



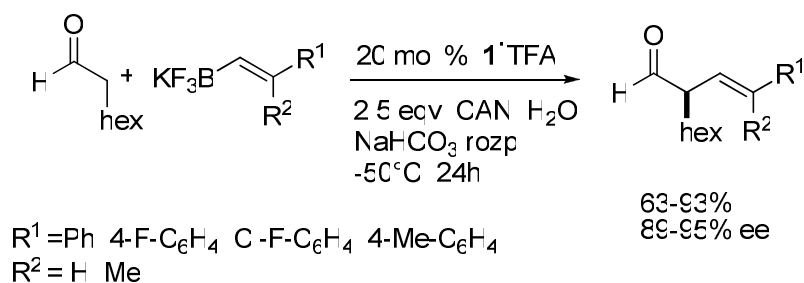
Obr. 2 Príklady využitia SOMO aktivácie

Ďalšie využitie SOMO aktivácie v enantioselektívnej intramolekulovej α -arylácií aldehydov demonštroval Nicolaou a kol. [7] Najprv uskutočnili modelovú reakciu v rôznych rozpúšťadlách s použitím 20 mol % katalyzátora **1**. Produkt vnútromolekulovej cyklizácie získali v dobrých výťažkoch (46–80%) s veľmi dobrou enantioselektivitou (85–95% ee) (obrázok 3). Túto metodiku ďalej rozšírili na sériu aldehydov obsahujúcich elektrónovo bohaté aromatické jadro. Produkty takejto cyklizačnej reakcie môžu slúžiť ako medziprodukty pri syntéze látok s cytotoxickými vlastnosťami.



Obr. 3 Využitie SOMO aktivácie pri intramolekulovej α -arylácií aldehydov

Organo-SOMO katalýza bola úspešne využitá aj pri prvej asymetrickej α -vynylácii aldehydov s využitím vinylových trifluórborátových solí a amínového katalyzátora (obrázok 4). [8] Produkty sa získali vo výťažkoch 63–93 % a hodnoty enantioméneho nadbytku dosahovali 89–95 %.



Obr. 4 Využitie SOMO aktivácie asymetrickej α -vynylácii aldehydov

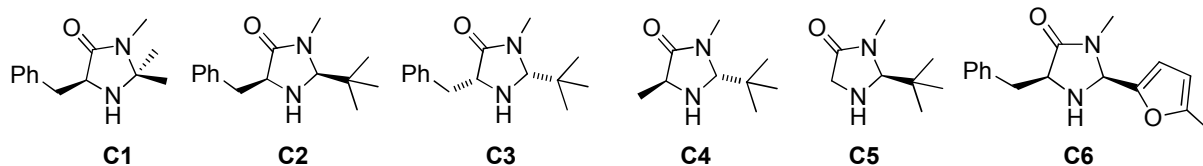
Naším cieľom bolo študovať možnosť enantioselektívnej α -enolácie aldehydov s cyklickými silylenolétermi. Ďalším cieľom bolo študovať možnosť enantioselektívnej α -enolácie ketónov.

Materiál a metódy

$^1\text{H-NMR}$ a $^{13}\text{C-NMR}$ spektrá boli namerané na prístroji Varian Mercury+, pri frekvencii 300 MHz pre ^1H a 75 MHz pre ^{13}C . Ako vnútorný štandard bol použitý TMS pre ^1H a ^{13}C spektrá. Ako rozpúšťadlo bol použitý CDCl_3 . TLC sa uskutočnila na SiO_2 platničkách. Enantiomérený nadbytok bol stanovený metódou HPLC s použitím kolóny s chirálnou stacionárnou fázou – Chiralcel OD-H alebo Chiralpak AD-H (Daicel Chemical Industries, Ltd.). Štruktúry známych zlúčenín boli potvrdené porovnávaním $^1\text{H-NMR}$ spektier s údajmi opísanými v literatúre. Všetky nové zlúčeniny boli identifikované pomocou $^1\text{H-NMR}$ a $^{13}\text{C-NMR}$.

Výsledky a diskusia

Na štúdium SOMO aktivácie karbonylových zlúčenín sme použili rôzne Mac Millanove katalyzátory, ktorých štruktúry sú uvedené na obrázku 5.

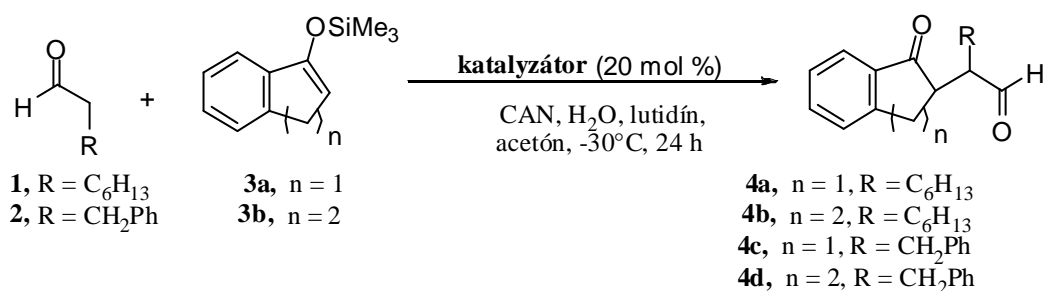


Obr. 5 Štruktúra použitých organokatalyzátorov

α -Enolácia aldehydov s rôznymi acyklickými enolsilánmi s vysokými výťažkami a výbornými enantioselektivitami už bola opísaná. [6] Keďže cyklické silylenolétery neboli doteraz použité ako somofily, zamerali sme sa na štúdium α -enolácie aldehydov práve s cyklickými enolsilánmi. Reakcie boli uskutočnené v acetóne pri -30°C , počas 24 h s lutidínom ako bázou a dusičnanom ceričito-amónnym (CAN) ako oxidačným činidlom. Reakcie prebiehali s výbornou diastereoselektivitou (d.r. = 100:0), ale s veľmi nízkou enantioselektivitou. Produkt reakcie s oktanáľu (**1**) so silyl enol éterom **3a** odvodeným od indanónu bol izolovaný vo výťažkoch 13–26 % (tabuľka 1, riadok 1, 2, 4). Podobné výsledky sa dosiahli v prípade reakcie oktanáľu (**1**) so silylenoléterom **3b** odvodeným od tetralónu. Najvyšší výťažok (38 %) bol izolovaný v prípade použitia katalyzátora **C1.HCl**. V prípade použitia katalyzátora **C3.TFA** a **C5.TFA** sa produkt **4b** bol izolovaný v 26 a 17% výťažku, s veľmi nízkym enantiomérnym pomerom (tabuľka 1, riadok 8 a 9). V prípade použitia katalyzátora **C4.HCl** sa produkt získal v nízkom výťažku (15 %) ale so sľubným enantiomérnym pomerom (82:12) (tabuľka 1, riadok 10).

Lepšie výsledky sa dosiahli v prípade reakcie 3-fenylpropanáľu (**2**) s enolsilánom **3b**. V prípade použitia katalyzátora **C1.HCl** sa produkt **4d** izoloval v 70 % výťažku. Nižší výťažok (63 %) sa získal v prípade použitia katalyzátora **C4.HCl** (tabuľka 1, riadok 7 a 11).

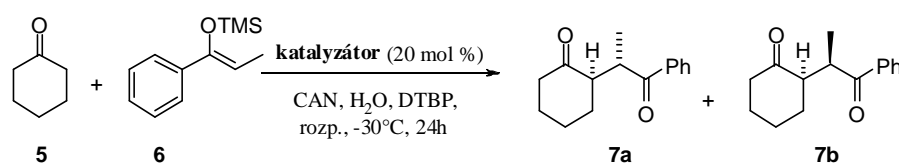
Tab. 1 α -Enolácia aldehydov s cyklickými enolsilánmi



	Aldehyd	Enolsilán	Katalyzátor	Produkt	Výt'azok (%)	e.r.
1	1	3a	C1.HCl	4a	18	54:46
2	1	3a	C3.TFA	4a	26	61:39
3	2	3a	C3.TFA	4c	0	-
4	1	3a	C4.HCl	4a	13	57:43
5	1	3a	C6	4a	-	-
6	1	3b	C1.HCl	4b	38	57:43
7	2	3b	C1.HCl	4d	70	68:32
8	1	3b	C3.TFA	4b	26	60:40
9	1	3b	C5.TFA	4b	17	56:44
10	1	3b	C4.HCl	4b	15	82:18
11	2	3b	C4.HCl	4d	63	59:41
12	2	3b	C6	4b	66	64:36

α -Enolácia ketónov s využitím SOMO katalýzy tiež nebola doteraz opísaná. Preto sme ďalej študovali reakciu cyklohexanónu (**5**) s enolsilánom **6**. Reakcia na rozdiel od predchádzajúcej s cyklickými enolsilánmi prebiehala aj v dimetoxyetáne (DME) pri -30°C počas 24 h s CAN ako oxidačným činidlom a 2,6-ditercbutylpyridínom ako bázou. Produkty reakcie sa izolovali vo výt'azkoch 58–80% s nízkym pomerom diastereoizomérov 1,2:1–2:1. Vo všetkých prípadoch boli izolované produkty v racemickej forme.

Tab. 2 α -enolácia cyklohexanónu



	Katalyzátor	Rozpúšťadlo	Výt'azok 7a (%)	Výt'azok 7b (%)	d.r.
1	C1.HCl	Me ₂ CO	50	30	1,7 : 1
2	C1.HCl	DME	41	20	2,0 : 1
3	C3.TFA	Me ₂ CO	38	21	1,8 : 1
4	C3.TFA	DME	30	25	1,2 : 1
7	C4.HCl	Me ₂ CO	0 ^a	0 ^a	-
8	C4.HCl	DME	36	24	1,5 : 1

^a Izolovaný len produkt aldolovej reakcie

Záver

Preskúmali sme možnosť enantioselektívnej α -enolácie aldehydov s cyklickými silylenolétermi. Produkty boli izolované vo výťažkoch 13–70 % s nízkym pomerom enantiomérov 54:46–82:12. Taktiež sme preskúmali možnosť enantioselektívnej α -enolácie ketónov. Produkty boli izolované vo výťažkoch 58–80% s nízkym pomerom diastereoizomérov 1,2:1–2:1 vo forme racemických zmesí.

PodĎakovanie

Za finančnú podporu ďakujem Vedeckej grantovej agentúre Ministerstva školstva SR VEGA, číslo projektu 1/0543/11 a APVV–0067-11.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Ahrendt K. A., Borths C. J., MacMillan D. W. C. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* 122, p. 4243
- [2] Lelais G., MacMillan D. W. C. (2006) *Aldrichim. Acta*, 39(3), p. 79
- [3] List B., Lerner R. A., Barbas III C. F. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* 122, p. 2395
- [4] List B. (2006) *Chem. Commun. P.* 819
- [5] Beeson T. D., Mastracchio A., Hong J-B., et al. (2007) *Science* 316, p. 582
- [6] Jang H-Y., Hong J-B., MacMillan D. W. C. (2007) *J. Am. Chem. Soc.* 129, p. 7004
- [7] Nicolaou K. C., Reingruber R., Sarlah D., et al. (2009) *J. Am. Chem. Soc.* 131, p. 2086
- [8] Kim H., MacMillan D. W. C. (2008) *J. Am. Chem. Soc.* 130, p. 398

Glykácia, glykooxidácia a zápal u pacientov s diabetes mellitus 2. typu

Dominika Tunegová¹, Jana Kalninová², Miroslava Glejtková³, Vladimír Jakuš²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra biochémie, Mlynská dolina, 845 15 Bratislava, Slovenská republika;

²Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava, Slovenská republika

³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta, Ústav lekárskej biochémie, Malá Hora 10701/4A, 036 01 Martin, Slovenská republika
dominika.tunegova@gmail.com

Abstrakt

Recent experimental findings suggest that advanced glycation end products (AGEs) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) may be significantly involved in the onset and development of diabetic complications. We determined age, duration of diabetes, BMI, fluorescent AGEs and nonfluorescent AGE product carboxymethyl lysine (CML) in each diabetic patient. We selected 9 healthy subjects and 22 patients with diabetes mellitus type 2 which were divided into two groups with the good or bad glyceemic compensation. We have found elevated levels of AGEs and CML in diabetic patients in comparison with controls and significant correlations between AGEs and CML in good glyceemic compensated patients and AGEs and CML in bad glyceemic compensated patients.

Kľúčové slová: diabetes mellitus 2.typu; AGEs; CML; TNF- α ; glykácia; glykooxidácia; zápal

Úvod a formulácia cieľa

Diabetes mellitus 2. typu postihuje v Európe 80-90 % z celkového počtu diabetických pacientov. Je charakterizovaný inzulínovou rezistenciou, teda zníženou citlivosťou tkanív voči pôsobeniu inzulínu, spojenou so zápalom, ktorý podporuje rozvoj diabetu a aterosklerózy, relatívnym deficitom inzulínu, chýbaním tendencie vzniku ketoacidózy.

Posledné výskumy ukazujú, že príčinou chronických diabetických komplikácií sú voľné radikály [1,2] a neskôr heterogénne, toxické a antigénne intermediárne a koncové produkty neenzýmovej glykácie tzv. AGE produkty (advanced glycation end products, koncové produkty pokročilej glykácie). Tieto komplexné aromatické zlúčeniny s následnou tvorbou voľných kyslíkových radikálov [3,4] podnecujú oxidačné poškodenie *in vivo*. Zodpovedajú za hndnutie a zosieťovanie polypeptidových reťazcov proteínov, tzv. “crosslinks”, skríženie väzieb, čím spôsobujú fyzikálno-chemické a funkčné zmeny vo vlastnostiach týchto látok. Počas hyperglykémie a oxidačného stresu sú AGEs produkované vyššou rýchlosťou [5]. Z proteínov sa pri hyperglykémii Maillardovou reakciou tvoria nestabilné Schiffove zásady, ktoré sa menia na stabilnejšie Amadoriho produkty. U bielkovín s dlhým polčasom rozpadu podliehajú Amadoriho produkty sledu ďalších reakcií, ktoré vedú k spomínanému skríženiu väzieb a vzniku AGEs.

Jeden z typických nefluorescenčných AGE produktov predstavuje karboxymetylyzín (CML), vzniká oxidáciou Amadoriho produktu. CML slúži ako marker glykoxidácie proteínov, nie je zodpovedný za zosieťovanie a sfarbenie proteínov. Keďže jeho tvorba silno závisí od oxidačných podmienok, bol navrhnutý ako endogénny biomarker pre oxidačné poškodenie [6], všeobecný marker oxidačného stresu a poškodenia dlhožijúcich proteínov [6].

Vysoké hodnoty CML indukujú zvýšenie zápalových cytokínov. Zápalové cytokíny sú látky bielkovinovej povahy, viažuce sa s príslušným receptorom na cieľových bunkách, aktivujúce kaskádu zápalových reakcií. Zápalové cytokíny, ako napr. TNF- α sú produkované najmä imunologickými bunkami, makrofágmi. Vysoké hladiny TNF- α sa podieľajú na rozvoji komplikácií ako sú diabetes, rakovina, skleróza multiplex, reumatoidná artritída a ďalšie.

Cieľom prezentovanej práce bolo stanoviť fluorescenčné AGEs, nefluoreskujúci, nezosieťovaný monolyzínový AGE produkt CML a zápalových cytokínov v plazme pacientov s diabetes mellitus 2. typu s dobrou a zlou glykemickou kompenzáciou a u zdravých kontrol a štatisticky vyhodnotiť. Všetci pacienti mali diabetické komplikácie.

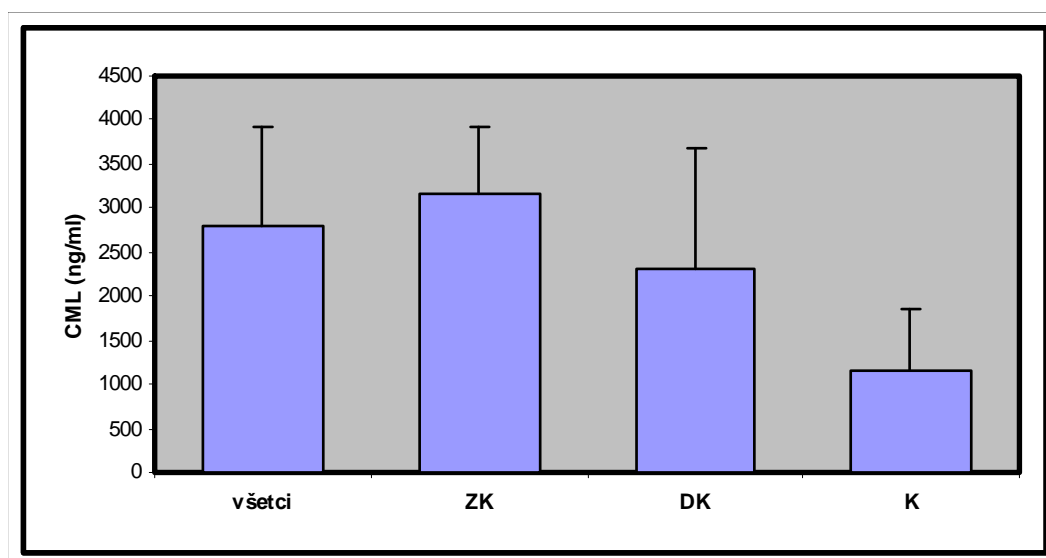
Materiál a metódy

Krvné plazmy pacientov s diabetes mellitus 2. typu sme získali z III. Internej kliniky Fakultnej nemocnice s poliklinikou Kramáre v Bratislave. Pacienti (n=22) vo veku od 24 do 82 rokov s dĺžkou trvania diabetu 1-32 rokov boli rozdelení podľa glykemickej kompenzácie na zle kompenzovaných (ZK) (n=12) a dobre kompenzovaných (DK) (n=10). Do skupiny ZK sme zaradili pacientov, ktorých priemerná hodnota glykovaného hemoglobínu (HbA1c) za posledné dva roky presiahla hodnotu 6% (podľa IFCC). Kontrolnú skupinu tvorili nediabetickí pacienti (n=9). Z klinických parametrov sme stanovili vek, trvanie diabetu a BMI u všetkých diabetických pacientov. Zápalový cytokín TNF- α bol stanovený xMAP technológiou na prístroji Luminex IS 100TM. Fluorescenčné AGEs boli stanovené v laboratóriu spektrofluorimetricky (ex. 345 nm/em. 455 nm) na prístroji Perkin Elmer LS 45. CML bol stanovený pomocou ELISA metódy.

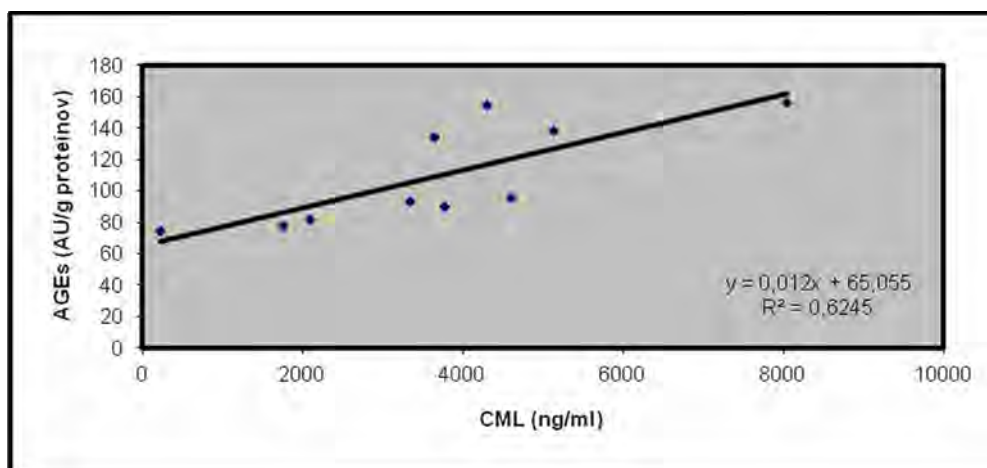
Výsledky a diskusia

Zistili sme signifikantne zvýšené hladiny fluorescenčných AGEs v plazme ($p < 0,05$) u všetkých pacientov ($123,66 \pm 32,51$ AU/g proteínov), ZK pacientov ($133,01 \pm 29,43$ AU/g proteínov), DK pacientov ($109,42 \pm 32,39$ AU/g proteínov) voči kontrole ($85,03 \pm 24,09$ AU/g proteínov) a ZK pacientov voči DK pacientom. Ďalej sme zistili signifikantne zvýšené

hladiny CML v plazme ($p < 0,05$) u všetkých diabetických pacientov ($2730,87 \pm 2112,19$ ng/ml), ZK ($3163,99 \pm 764,39$ ng/ml) a DK ($2303,74 \pm 1390,37$ ng/ml) ($p < 0,05$) v porovnaní s kontrolou ($1162,07 \pm 686,7$ ng/ml), taktiež u ZK pacientov v porovnaní s DK pacientmi. Nepozorovali sme významné rozdiely hladín TNF- α všetkých pacientov, ZK pacientov a DK pacientov v porovnaní s kontrolnou skupinou. Pozorovali sme významnú koreláciu CML a AGEs ($r = 0,89$, $p < 0,05$) u DK pacientov. Ďalej sme pozorovali významnú koreláciu medzi AGEs a CML ($r = 0,57$; $p < 0,05$) u ZK pacientov.



Obr. 1 Významný rozdiel zistený v hladinách CML u všetkých diabetických pacientov, ZK, DK pacientov v porovnaní s kontrolou, taktiež medzi zle aj dobre kompenzovanými diabetickými pacientmi.



Obr. 2 Korelácia hladín CML s AGEs u dobre kompenzovaných diabetických pacientov s diabetes mellitus 2. typu

Výsledky viacerých štúdií ukazujú, že hladiny CML v plazme u pacientov s diabetom boli výrazne zvýšené v porovnaní so zdravými subjektmi. Hladina plazmového CML pozitívne koreluje s dĺžkou diabetu a opačne s BMI. Predpokladá sa, že zvýšenie hladiny CML je spojené s príjmom potravy, najmä s konzumáciou produktov živočíšneho pôvodu a pekárenských produktov [5]. AGE produkty sa tvoria endogénne v tele alebo môžu byť prijaté do tela exogénne stravou, kedy vznikajú v jedle počas predĺženého zahrievania, alebo fajčením [7]. Jedným z najvýznamnejších faktorov ich tvorby v jedle je vysoká teplota, napr. pri grilovaní. Keď strava obsahuje vysoké hodnoty AGEs, komplikácie sa vyskytnú skôr a majú rýchlejšiu progresiu u pacientov s DM [5]. Najviac skúmaným AGE produktom je karboxymetylyllyzín (CML). Štúdia zvieracieho modelu N. Jara a kol. ukázala, že zvieratá kŕmené stravou bohatou na CML mali horšiu inzulínovú rezistenciu a vyšší stupeň zápalu. Zvieracie modely kŕmené stravou s nízkym obsahom CML ukázala nižší obsah AGE v tkanivách. U zdravých ľudí spôsobuje strava s vysokým obsahom CML významný úbytok v plazmového leptínu, zvýšenie hladín pro-zápalových molekúl IL-6, TNF- α a zvýšený oxidačný stres [5]. Niekoľko zvieracích štúdií naznačuje, že AGEs prijímané stravou súvisia s inzulínovou rezistenciou, telesnou obezitou a vývojom diabetu [8].

Záver

Zistili sme zvýšené hladiny fluorescenčných AGEs a CML v plazme u pacientov s diabetes mellitus 2. typu v porovnaní so zdravou kontrolou. Zistili sme zvýšené hodnoty TNF- α u diabetických pacientov, ale rozdiely neboli signifikantné v porovnaní so zdravou kontrolou. Fluorescenčné AGEs korelovali s CML u DK a ZK pacientov.

Hľadanie vhodných biomarkerov glykačného a glykooxidačného stresu ako aj zápalu pri diabetes mellitus je stále aktuálne v súvislosti s farmakoterapiou diabetu, ktorej hlavnou snahou je prevencia, resp. oddialenie rozvoja neskorších diabetických vaskulárnych komplikácií.

Pod'akovanie

Práca vznikla s finančnou podporou grantového projektu VEGA č. 1/0451/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Baynes J. W. (1991) *Diabetes* 40(4), p. 405
- [2] Mullarkey C. J., Edelstein D., Brownlee M. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173(3), p. 932
- [3] Zu J., Morita J., Nishikawa S., Kashimura N. (1996) *Carbohydr. Lett.* 1, p. 457
- [4] Ortwerth B. J., Prabhakaram M., Nagaraj R. H., Linetsky M. (1997) *Photochem. Photobiol.* 65(4), p. 666
- [5] Jara N., Leal M. J., Bunout D., Hirsch S., Barrera G., Leiva L., de la Maza M. P. (2012) *Nutr. Hosp.* 27(4), p. 1272
- [6] Jakuš V., Čársky J., Hrnčiarová M. (1998) *Bratisl. Lek. Listy* 99(7), p. 368
- [7] Goh S.Y., Cooper, M. E. (2008) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93(4), p.1143
- [8] Yamagishi S., Matsui T., Nakamura K.(2008) *Medical Hypotheses* 71(6), p. 876

Příprava nanočástic atorvastatinu metodou odpařování rozpouštědla

Eliška Vaculíková^{1,2}, Daniela Plachá², Josef Jampílek¹

¹Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Ústav chemických léčiv, Palackého 1-3, 61242, Brno, Česká republika, eliskavaculikova@seznam.cz

²Centrum Nanotechnologií, VŠB - Technická univerzita Ostrava, 17. listopadu 15/2172, 70833, Ostrava, Česká republika

Abstrakt

Preparation of nanoparticles from drugs is a suitable opportunity to optimize properties of these drugs such as solubility, permeability and biodistribution, eliminate adverse effects and use them for drug targeting. Antisolvent precipitation-solvent evaporation method or emulsion-solvent evaporation method are notable techniques of nanoparticle preparations that are rather fast and efficient. Many drugs are poorly soluble in water, it means that after oral administration they are not dissolved properly, and due to this fact they are poorly absorbed and do not reach the therapeutic concentration. Hardly permeable drugs represent another problem; their solubility in water can be sufficient, but they do not permeate through membranes. Also drugs with the combination of the mentioned properties, *i.e.* poorly soluble and permeable exist. This contribution deals with preparation of nanoparticles of atorvastatin by means of the above mentioned methods. All samples were analysed by means of dynamic light scattering.

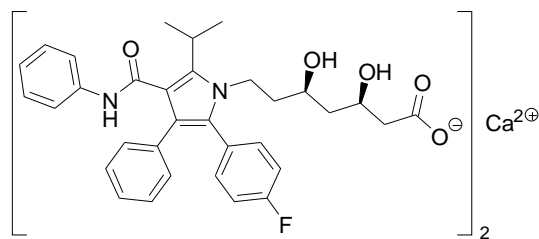
Klíčová slova: nanočástice; precipitace; atorvastatin; SDS, Tween, PEG; CM-celulosa; CM-dextran

Úvod a formulace cíle

Pro práci byla zvolena vápenatá sůl atorvastatinu jako představitel druhé skupiny biologického klasifikačního systému. Tento systém dělí léčiva podle jejich vlastností do čtyř skupin, značených I.-IV. Skupina I. obsahuje léčiva dobře rozpustná ve vodě s dobrou permeabilitou, II. skupina zahrnuje léčiva špatně rozpustná a dobře permeabilní, III. skupina léčiva dobře rozpustná a špatně permeabilní a IV. skupina léčiva s problematickou rozpustností i permeabilitou [1].

Atorvastatin, (Obr. 1), se používá k léčbě hypercholesterolemie, blokuje enzym 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A reduktasu, která je stěžejní pro přeměnu 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A na mevalonát, což je jeden z kroků v syntéze cholesterolu. V konečném důsledku blokace se nevytvoří cholesterol, čímž se sníží jeho hladina v organismu [2].

Atorvastatin je nerozpustný ve vodných roztocích o pH 4 a nižším, ve střevě se rozpuštěný podíl dobře vstřebává, avšak bylo zjištěno, že ze 40 mg podaných per os je biodostupných pouhých 12 %. Tento fakt vzniká v důsledku špatného rozpouštění, presystémové clearance a také výrazného first-pass efektu v játrech [2]. Vytvoření nanočástic je jedním ze způsobů, jak lze tyto problémy vyřešit.



Obr. 1 Struktura vápenaté soli atorvastatinu.

Cílem práce bylo nalézt vhodnou koncentraci příslušné pomocné látky (excipientu), která by dala vznik největšímu počtu nanočástic. Vybraná látka by posléze byla použita v dalším experimentu s tím, že by se u vzniklých nanočástic provedly zkoušky rozpustnosti a permeability přes membrány.

Materiál a metody

Jako modelová substance byla zvolena výše uvedená sodná sůl atorvastatinu. Rozpouštědly byly voda pro HPLC (Mili-Q), dichlormethan p.a. (LachNer) a aceton p.a. (LachNer). Z pomocných látek byly použity Tween 80, polyethylenglykol (makrogol, PEG) 6000, laurylsíran sodný (SLS), sodná sůl karboxymethylcelulosity, sodná sůl karboxymethyl-dextranu (všechny excipienty Sigma-Aldrich).

Použitá metoda byla precipitace s následným odpařením organického rozpouštědla. Podstatou je vždy příprava dvou roztoků, jeden představuje léčivo v organickém rozpouštědle (dichlormethan nebo aceton), druhý pomocnou látku ve vodě. Rozpouštědlem je vždy kapalina, ve které se příslušné látky rozpustí. Následně za stálého míchání je léčivo přidáno k roztoku pomocné látky, dojde k precipitaci, následuje 15 minutové míchání a poté je organické rozpouštědlo odpařeno v ultrazvukové lázni. Výsledkem jsou připravené nanočástice ve vodném roztoku stabilizované pomocnou látkou.

Bylo použito 200 mg léčiva v 10 ml rozpouštědla. Vždy byly použity koncentrace excipientů, které jsou uvedeny v tabulce 1. Měření vzorků probíhalo na přístroji Nanophox (analyzátor velikosti a stability nanočástic pracující na principu fotonové cross-korelační spektroskopie, výrobce Sympatec, Německo). Před měřením byly vzorky opět dispergovány v ultrazvukové lázni, aby se zabránilo případným vznikům aglomerátů.

Tab. 1 Navážky a výsledné koncentrace excipientů.

Navážka excipientu [g]	Množství vody [ml]	Výsledná koncentrace [% hmot.]
0,5	10,0	5
1,0	10,0	10

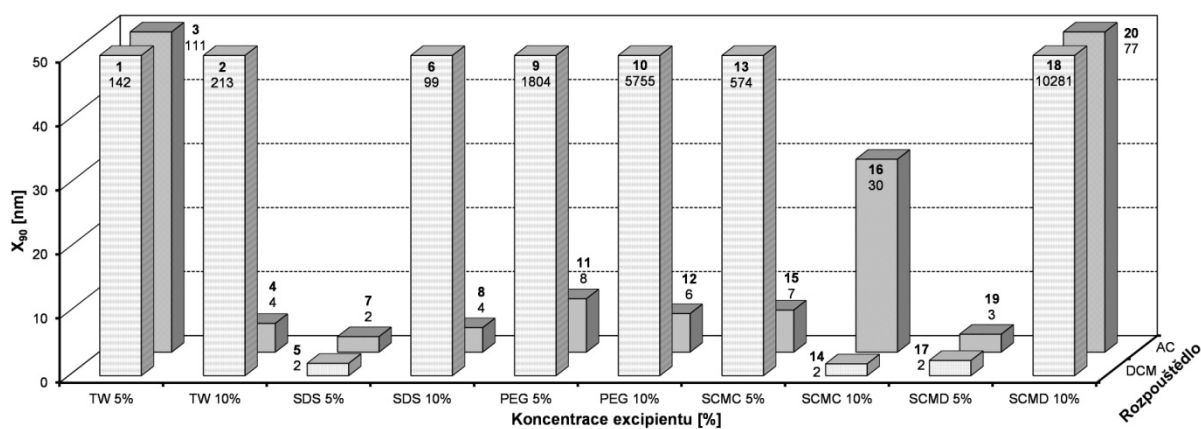
Výsledky a diskuze

Nanočástice se obecně rozměrově pohybují pod 1000 nm. Přestože například National Nanotechnology Initiative definuje nanočástice v rozměrech 1-100 nm [3], je možné v rámci farmacie používat částice od 10 do 500 nanometrů, výjimečně až do 700 nm [4]. Z hlediska průchodu cévami, jejichž vnitřní průměr je přibližně od 25 mm (aorta) do 5 μ m (kapiláry), je vhodné, aby se velikost nanočástic pohybovala pod 300 nm pro zajištění efektivního transportu v rámci cíleného přenosu léčiv [5].

Po přípravě všech koncentrací vzniklo celkem 20 vzorků. V následující tabulce 2 a obrázku 2 jsou vzorky seřazeny v závislosti na použitém rozpouštědle a excipientu společně s velikostí vzniklých částic. Parametr velikosti částic x_{90} byl použit pro hodnocení úspěšnosti metody. Tato hodnota představuje 90% kumulativní distribuci velikosti částic v měřených vzorcích. Stupeň homogenity/heterogenity velikosti částic ve vzorku byl hodnocen jako šířka intervalu distribuce velikosti částic mezi parametry kumulativní distribucí x_{10} a x_{90} , viz tabulka 2. Pokud byly eliminovány vzorky obsahující mikročástice (vzorky **9**, **10**, **18**), průměrná kumulativní distribuce x_{10}/x_{90} byla v intervalu od 0,6 do 0,9. Je rovněž možné předpokládat sférický tvar nanočástic, protože velikost částic v dynamickém rozptylu světla představuje hydrodynamický průměr částice.

Tab. 2 Velikost částic (x_{10} , x_{90} [nm]) atorvastatinu vápenatého a koncentrace [% hmot.] Tweenu 80 (TW), laurylsíranu sodného (SDS), makrogolu 6000 (PEG), sodné soli karboxymethylcelulosity (SCMC), sodné soli karboxymethyldextransu (SCMD) v dichlormethanu (DCM) nebo acetonu (AC). Všechny výsledky jsou uvedeny jako střední hodnota ze 4 nezávislých měření, opakovatelnost byla do 7 % (při vyloučení mikročástic). Vzorky obsahující nanočástice <200 nm jsou tučně; vzorky s nanočásticemi <10 nm jsou označeny hvězdičkou (*). (č.vz. = číslo vzorku)

	x10 při 5% hmot.konc.	x90 při 5% hmot.konc.	x10 při 10% hmot.konc.	x90 při 10% hmot.konc.
TW/DCM	97	142	145	213
TW/AC	101	111	3	4*
SDS/DCM	1	2*	90	99
SDS/AC	2	2*	2	4*
PEG/DCM	1639	1804	5231	5755
PEG/AC	6	8*	4	6*
SCMC/DCM	401	574	1	2*
SCMC/AC	6	7*	27	30
SCMD/DCM	2	2*	9345	10281
SCMD/AC	2	3*	70	77



Obr. 2 Velikost všech vzniklých nanočástic (x_{90} [nm]) atorvastatinu v závislosti na použitém rozpouštědle dichlormethanu (DCM)/acetonu (AC) a koncentraci [% hmot.] excipientů: Tween 80 (TW), laurylsíran sodný (SDS), makrogol 6000 (PEG), sodná sůl karboxymethylcelulosity (SCMC), sodná sůl karboxymethyldextransu (SCMD). Hodnoty na ose y jsou zobrazeny do 50 nm [6]. Čísla na sloupcích představují číslo vzorku a velikost částic.

V pokusu je diskutována jednak volba pomocné látky pro stabilizaci připravených/vzniklých nanočástic, jednak volba organického rozpouštědla jako vhodného solventu pro léčivo. Záleží na použitém rozpouštědle, zda je výsledný systém jednofázový (aceton/voda) nebo dvoufázový (dichlormethan/voda, typ emulze o/v), tedy zda budou nanočástice vznikat spontánně a ihned již během míchání (jednofázový systém, metoda

precipitace antisolventem s následným odpařením rozpouštědla) nebo zda ve vzniklé emulzi nanočástice spontánně nevznikají, ale je nutné dodat pro jejich vznik ještě vnější energii, např. ultrazvuk (emulzifikace s následným odpařením rozpouštědla). Protože způsob přípravy s oběma typy rozpouštědel byl zcela shodný (míchání a ultrazvuk), je z výsledků patrné, že použití polárního rozpouštědla acetonu je výhodnější než aplikace nepolárního dichlormethanu, tj. že precipitace antisolventem s následným odpařením rozpouštědla je vhodnější metoda/způsob přípravy nanočástic než emulzifikace s následným odpařením rozpouštědla. Výsledky ukazují, že využití acetonu pro rozpuštění atorvastatinu poskytlo více vzorků s nanočásticemi než v dichlormethanu a zároveň vznikly výrazně menší nanočástice než když byla substance rozpuštěna v dichlormethanu.

Z hlediska použitých pomocných látek se jako nejvýhodnější jevílo použití laurylsíranu sodného v 5% hmot. koncentraci, následované 10% hmot. koncentrací sodné soli karboxymethylcelulosity a 5% hmot. koncentrací sodné soli karboxymethyldextranu. Polyethylengykol v kombinaci s dichlormethanem neposkytl tak dobré výsledky, jak se očekávalo [6].

Závěr

Všechny zvolené excipienty jsou lékopisné, což je významný faktor ovlivňující praktickou využitelnost a další vývoj metody. V návaznosti na tyto pokusy bude možno dále pracovat na přípravě nanočástic stejným způsobem srážení, avšak s vyloučením dichlormethanu jako toxického rozpouštědla, které zároveň neposkytlo požadované výsledky. Rovněž budou eliminovány pomocné látky, které poskytly neuspokojivé výsledky. Dále bude hodnoceno použití vhodné kombinace pomocných látek a bude sledován vznik největšího počtu co nejmenších nanočástic. Navazovat budou testy rozpustnosti a permeability přes biologické membrány.

Poděkování

Děkuji za podporu Grantové agentuře České republiky, projektu GAČR P304/11/2246.

Seznam použité literatury

- [1] Elan Drug Technologies [Citováno 23. února 2013]
<http://mediaserver.aaps.org/meetings/09AM/Slides/11.10.09_Tue/515%20a/0830/Gary%20Liversidge.pdf>

- [2] Oishi T. S., Nimmi I., Islam A. S. M. (2011) *Bang. Pharm. J.* 14(1), p. 61
- [3] Medina C., Santos-Martinez M. J., Radomski A., Corrigan O., Radomski M. W. (2007) *Br. J. Pharmacol.* 150(5), p. 552
- [4] Mody V. V., Siwale R., Singh A., Mody H. R. (2010) *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2(4), p. 282
- [5] Sivasankar M., Kumar B. P. (2010) *Int. J. Res. Pharm. Biol. Sci.* 1(2), p. 41
- [6] Vaculíková E. (2013) Příprava nanočástic kandesartanu a atorvastatinu metodou odpařování rozpouštědla. (Rigorózní práce) Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno, p. 63

Sorption of uranium species from aqueous solutions by Greek zeolite Metaxades

Eva Viglašová, Adrián Krajňák, Michal Galamboš, Oľga Rosskopfová

Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural sciences, Department of Nuclear chemistry, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovak republic; ejka.viglasova@gmail.com

Abstract

Uranium is naturally- occurring radioactive element, which is commonly found in very small amounts in rocks, soils, waters, plants or animals (include human body). It is harmful both through its chemical toxicity and its radioactivity (all uranium isotopes are radioactive). Exposure to uranium increases your risk of getting a variety of cancers due to its radioactivity. In case of management of radioactive waste, the adsorption of radionuclides plays significant role. Among the natural sorbents applied to the adsorption of uranium zeolites offer a number of advantages (low cost, availability, quite high sorption capacity, good hydraulic properties, thermal stability etc.) as well as no introduction of additional pollution to the environment in the case of application as permeable reactive barriers. The main aims of this work are investigations of adsorption properties of Greek zeolite Metaxades, modelling of traditional isotherms and behaviour during kinetics process, influenced by temperature.

Key words: *Adsorption; Uranium; Zeolite; Adsorptions isotherms, Kinetic data*

Introduction and formula of the main aims

Uranium is a toxic and weakly radioactive heavy metal exists in the environment ubiquitously, such as rocks, soils, and waters [1]. It is widely spread throughout the environment and so it is impossible to avoid uranium. Into the body can enter when it is inhaled or swallowed, or under rare circumstances it may enter through cuts in the skin [2, 3]. Uranium does not absorb through the skin, and alpha particles released by uranium cannot penetrate the skin, so uranium that is outside the body is much less harmful than it would be if it were inhaled or swallowed. About 99 % of the uranium ingested in food or water will leave a person's body in the feces, and the remainder will enter the blood. Most of this absorbed uranium will be removed by the kidneys and excreted in the urine within a few days. A small amount of the uranium in the bloodstream will deposit in a person's bones, where it will remain for years. Bigger intakes of uranium can lead to increased cancer risk, liver damage, or both. Long term chronic intakes of uranium isotopes in food, water, or air can lead to internal irradiation and/or chemical toxicity [1, 2, 4].

The removal and recovery of uranium from contaminated surface, environment and ground water, as a result of nuclear industries, has attracted more and more attentions. Several methods are available for removing uranium from aqueous solution, such as chemical precipitation, reverse osmosis, solvent extraction, micellar ultrafiltration and adsorption [3].

Among these, adsorption is an attractive method due to its high efficiency, ease of handling, and availability of different adsorbents. Adsorption in the system adsorbent-solution plays significant role in everyday life, industry and environment protection. Also plays an important role in a large number of reactions of solids and biological mechanisms. It allows characterizing the surface and structural properties of new materials or adsorbents [5, 6].

Various kinds of new adsorbents for removing and recovering radionuclides, include uranium have been reported, among which natural zeolites and their composites are considered as particularly effective, low-cost, and chemical stability [7]. Zeolite is natural porous mineral described as crystalline hydrated aluminosilicates. Inside the framework structure of zeolite, alkali or alkaline-earth cations are reversibly fixed in the cavities and can easily be exchanged by surrounding positive ions [8]. Clinoptilolite belongs to the natural zeolite with high ion-exchange and sorption properties and it is known to have high exchange capacity and removal efficiency for some cations. It is known, that zeolite containing rocks are used in wastewater purification to remove toxic and radioactive elements [9, 10].

The main aims of this work are investigations of adsorption properties of Greek zeolite Metaxades during adsorption of uranium ($pH_{init} = 2,5$; C_{init} : 10 to 1000 mg U/L) from water solutions, fitting with isotherms (Freundlich and Langmuir) and its behaviour during kinetics process (C_{init} : 500 mg U/L; $pH = 2,5$), influenced by temperature ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $45\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Materials and methods

The natural zeolitic material from Metaxades was selected for experimental work, after grinding was sieved to obtain fraction $\sim 50\text{ }\mu\text{m}$. The main characteristic of material is in table 1 and composition of material in (%) is in table 2.

Tab. 1 The main characteristic of material (Metaxades-Greece)

Origin of the material	CEC (mol/kg)	Exchangeable cations	Zeolite type	Zeolite content (%)
Metaxades/ Greece	1,16	Ca, K	HEU-type Clinoptilolite	58

Tab. 2 The composition of material (Metaxades- Greece)

Material	SiO ₂	Al ₂ O ₃	CaO	K ₂ O	Na ₂ O	Fe ₂ O ₃	MgO	MnO	TiO ₂	H ₂ O	Si/Al
Metaxades/Greece	66,47	13,47	3,25	2,6	2,09	1,05	0,65	0,02	0,15	10	4,93

For the sorption experiments 50 mg of the zeolite was contacted in polypropylene tubes for 24 hours with 10 mL of uranium solutions (C_{init} : 10 to 1000 mg U/L, pH_{init} 2,5 adjusted using HCl or NaOH at room temperature). The uranium solutions were prepared by

dilution of a stock $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solution (Merck pro analysis) with bi-distilled water. After separation of the solid and liquid phases by centrifugation, the equilibrium pH (pH_{equil}) was measured and the uranium concentration determined spectrophotometrically by means of the Arsenazo III method at 660 nm [11]. The obtained data were used to calculate the uptake capacity in mg/g and construct the corresponding sorption isotherms. The experiments were performed under equilibrium conditions with atmospheric CO_2 .

The sorption kinetics was also investigated and modelled using pseudo-first and pseudo-second order equations [12]. The kinetics of uranium sorption by the zeolite was investigated using batch technique. 500mg of the zeolite came in contact with 100mL of uranium solution of C_{init} 500 mgU/L and pH_{init} 2,5. At predetermined time intervals (2 – 300 min.) a 2 mL sample was withdrawn and the amount of U was determined by means of the Arsenazo III method.

Results and discussion

The uranium adsorption equilibrium data obtained at $\text{pH}= 2,5$ and initial solution concentration from 10 mgU/L to 1000 mgU/L are plotted in figure 1. For correlate the experimental data were used traditional Freundlich and Langmuir isotherms, which parameters are in table 3. Freundlich isotherm model indicate the heterogeneity of the adsorbent material and is given by the equation [13]:

$$q = K \cdot C_e^{1/n} \quad [\text{I.}]$$

The Langmuir isotherm model assumes the formation of monolayer onto the adsorbent surface with a finite number of identical sites, and is given by the equation [14]:

$$q = (a \cdot b \cdot C_e) / (1 + K \cdot C_e) \quad [\text{II.}]$$

Tab. 3 Freundlich and Langmuir parameters

Freundlich isotherm	Langmuir Isotherm
$K=1,7131 \text{ L/g}$	$a= 68,0499 \text{ mg/g}$
$1/n= 0,5270$	$b= 0,0045 \text{ L/mg}$
$R^2= 0,9351$	$R^2= 0,9835$

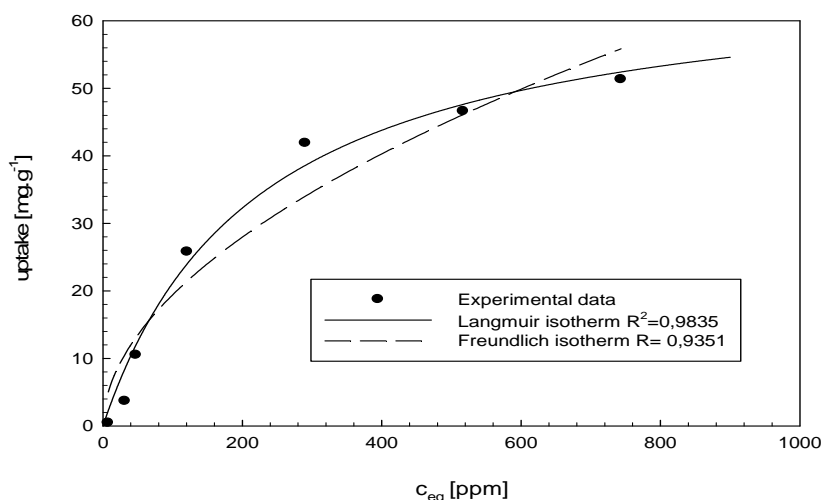


Fig. 1 Comparison of model correlations of experimental isotherms data for uranium adsorption on Greek zeolite Metaxades at pH = 2,5; C_{ini}= 10-1000mg U/L, contact time 24 h

In order to explain the controlling mechanism of adsorption processes, such as mass transfer and chemical reaction, pseudo- first-order, and pseudo-second-order kinetics equations were applied to describe the kinetic characteristic of U(VI) onto Greek zeolite Metaxades. The pseudo-first-order kinetic model is usually given [12]:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \tag{III.}$$

The pseudo-second order kinetics model is always given as [12]:

$$t/q_t = (1/k_2 q_e^2) + (t/q_e) \tag{IV.}$$

Kinetic data at pH=2,5 C_{init}= 500mgU/L T= 298,16K 308,16K and 318,16K are showed on figure 2, the pseudo-first order of this kinetic data is on figure 3 and pseudo-second order is on figure 4.

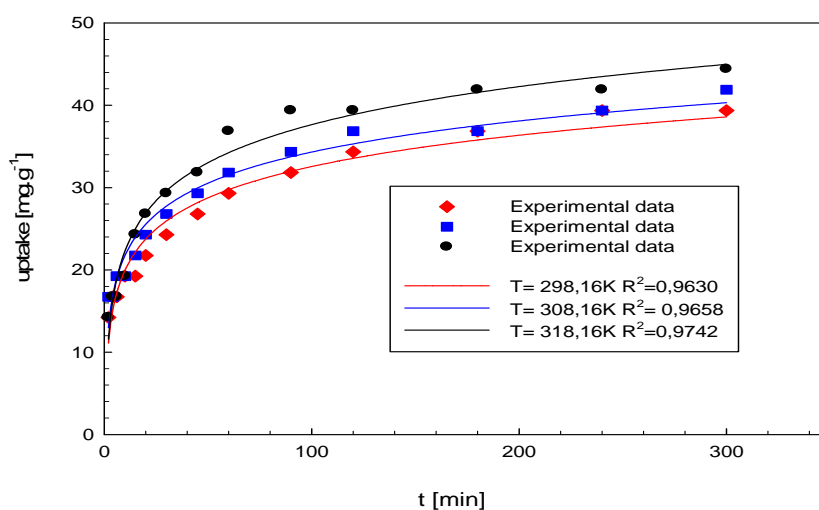


Fig. 2 Kinetics data of Greek zeolite Metaxades: pH= 2,5 C_{init}= 500mgU/L

Kinetics data of Greek zeolite Metaxades at these conditions showed that with increase of T, increases sorption ability of material.

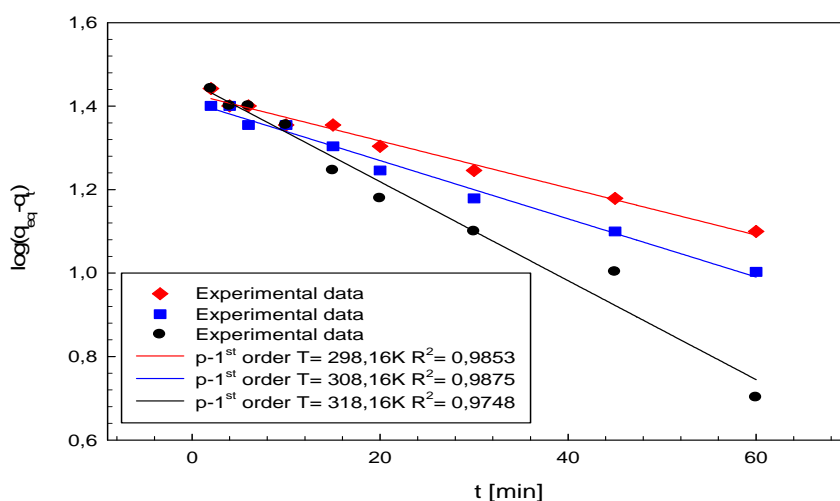


Fig. 3 Pseudo-first-order for kinetic data on Greek zeolite Metaxades

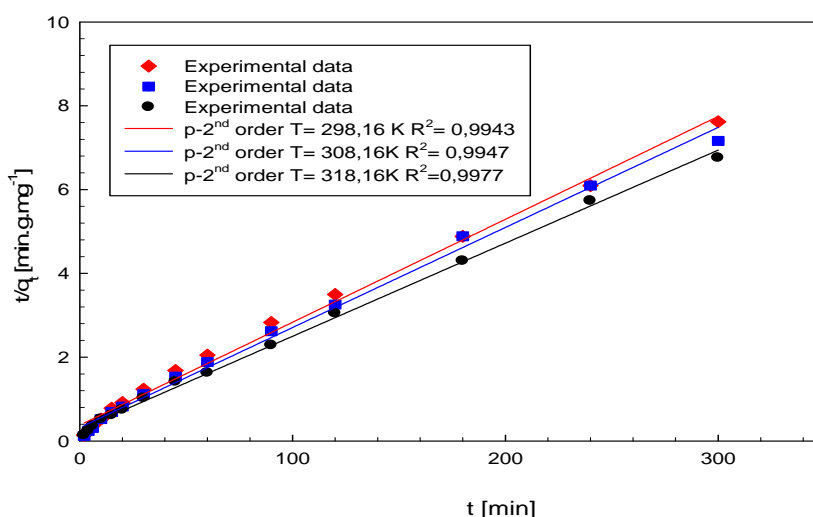


Fig. 4 Pseudo-second-order for kinetic data on Greek zeolite Metaxades

Pseudo-second order is better for describe experimental data in compare with Pseudo-first order.

Conclusion

A batch technique was employed to investigate the sorption behaviour of Greek zeolite Metaxades during adsorption of U. The value of R^2 showed that Langmuir isotherm model is better to fitted with the experimental data than Freundlich isotherm model. The pseudo-second order equation was better than the value of the pseudo-first order and increase of temperature caused increase of sorption ability of studied material. In summary Greek

zeolite Metaxades has good adsorption quality, but is necessary to do more extensive investigation with other conditions e. g. influence of pH, contact time, ratio solid/liquid phase etc.

Acknowledgment

This work was supported by grant VEGA 1/0828/13 and Scholarship program N-SPP Hlavička 2011/2012; 203/Na-2002/689. At last but not at least I would like to say thank you to Dr.rer.nat Panagiotis Misaelides, Professor at the Department of Chemistry, Faculty of Natural Sciences on Aristotle University in Thessaloniki, Greece for opportunity to collaborate with him and his research group, and for helpful advices during experimental work on AUTH, Greece.

References

- [1] Wang Y-Q., Zhang Z-B., Li Q., et al. (2012) *J Radioanal. Nucl. Chem.* 293, p.231
- [2] Warchol J., Matlok M., Misaelides P. (2011) *Microporous Mesoporous Mater.* 153, p. 63
- [3] Environmental protection agency USA [Cited: 19.02.2013] <<http://www.epa.gov/radiation/radionuclides/uranium.html>>
- [4] Bleise A., Danesi P.R., Burkart W., et al. (2003) *J. Environ. Radioact.* 64, p. 93
- [5] Meunier A. (2005) *Clays*. Springer, Berlin, Germany, p. 1
- [6] Sparks D.L. (2003) *Environmental Soil Chemistry*. Academic Press, London, UK, p. 133
- [7] Campos V. (2009) *Environ Earth Sci.* 59, p. 737
- [8] Wen D., Ho Y-S., Tang Y., et al. (2005) *J. Hazard. Mater.* 133, p. 252
- [9] Rajec P., Domianová K. (2007) *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 275(3), p. 503
- [10] Galamboš M., Suchánek P., Roskopfová O. (2012) *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 293(2), p. 613
- [11] Savvin S. B. (1961) *Talanta.* 8, p. 673
- [12] Wang Y., Zhang Z. (2012) *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 231-239, p. 293
- [13] Freundlich H.M.F. (1906) *Z. Phys. Chem.* 57(A), p. 385
- [14] Langmuir I. (1918) *J. Am. Chem. Soc.* 40, p. 1361

RP-HPLC separácia vybranej skupiny profénov na chirálnej stacionárnej fáze v reverznofázovom móde

Veronika Vojtková, Mária Chalányová, Milan Hutta

*Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina
CH-2, 842 15 Bratislava, Slovensko,
vojtkova@fns.uniba.sk*

Abstrakt

In this work we dealt with the study of chromatographic properties of the selected profens such as naproxen, fenoprofen, flurbiprofen and ibuprofen on the chiral stationary phase Chiradex. The drug study was focused on the influence of organic modifier contents, pH and the flow rate of mobile phase in reversed-phase system. The second part is devoted to the study of enantiomeric separation of fenoprofen, flurbiprofen, and ibuprofen on the chiral stationary phase, Chiradex. The mobile phase consist of methanol:ammonium formate pH 3.0 flow rate 1.0 ml/min. The chiral resolution of flurbiprofen enantiomers was 0.74 and ibuprofen 0.81. The separation was not achieved for fenoprofen.

Kľúčové slová: *profény; chirálna separácia, HPLC*

Úvod a formulácia cieľa

Predložená práca sa zaoberá štúdiom chromatografických parametrov (separačný faktor, pH, prietok mobilnej fázy) RP-HPLC separácie vybranej skupiny liečiv naproxén, flurbipofén, ibuprofén a fenoprofén zo skupiny profénov s využitím spektrofotometrickej a ELSD detekcie na chirálnej stacionárnej fáze Chiradex. Profény patria do skupiny nesteroidných protizápalových liečiv a používajú sa na zmiernenie bolesti pri chronickej a akútnej reumatickej artritíde, ako aj pri iných poruchách spojivového tkaniva. Rovnako sa dajú použiť ako liek na znižovanie horúčky. Profény sú deriváty kyseliny 2-metylarlylpropiónovej a vyznačujú sa tým že obsahujú aspoň jedno chirálne centrum. V dôsledku toho tvoria minimálne dva enantioméry. Liečivá obsahujúce účinnú latku naproxén vo svojej liekovej forme obsahuje len účinný S-enantiomér. Všetky ostatné nami študované profény v liekovej forme obsahujú racemickú zmes, z ktorých je účinný len jeden enantiomér (obvykle S). Z tohto dôvodu sme sa v predloženej práci zaoberali štúdiom vplyvu zloženia, prietoku a pH mobilnej fázy, na enantioméru separáciu analytov [1,2].

Materiál a metódy

Štandardy analyzovaných látok :

Fenoprofén, Flurbiprofén, Ibuprofén, Naproxén (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

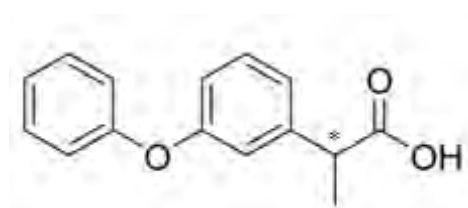
Metanol gradient grade, (Merck, Darmstadt, Nemecko)

Ultra čistá voda, Simplicity UV, (Millipore S.A.S., Francúzsko)

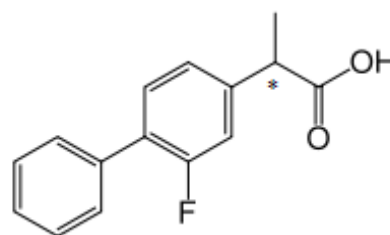
Kyselina mravčia 99,7%, (Lachema, n.p. Brno)

Kyselina octová 96%, (Merck, Darmstadt, Nemecko)

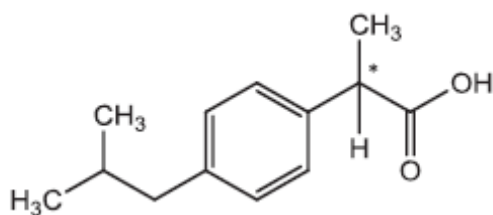
Vodný roztok amoniaku 28-30%, (Merck, Darmstadt, Nemecko)



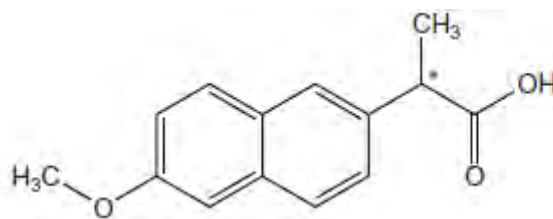
Obr. 1: Štruktúra fenoprofenu



Obr. 2: Štruktúra flurbiprofenu



Obr. 3: Štruktúra ibuprofenu

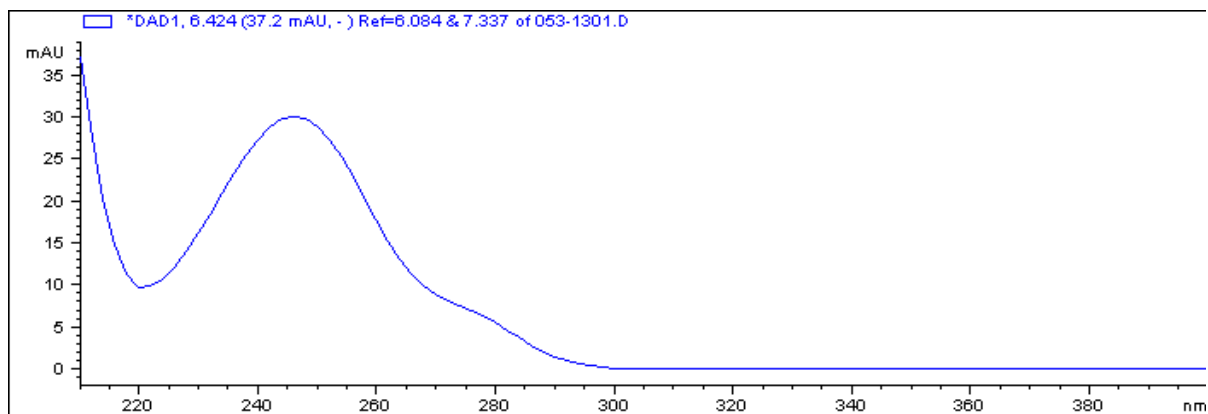
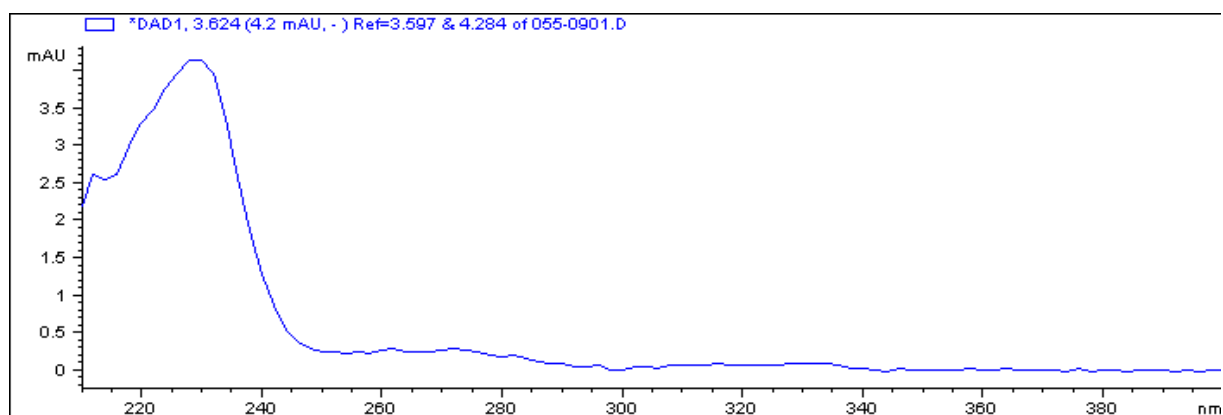
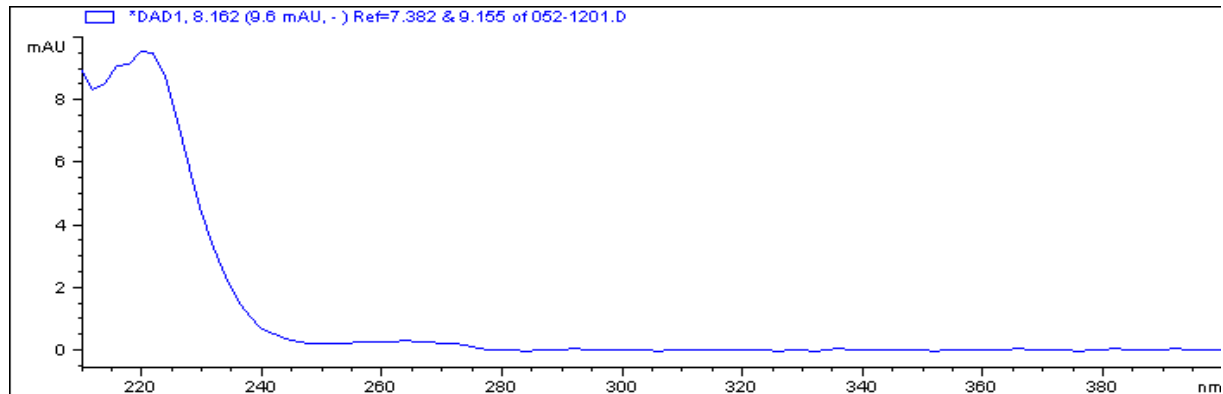
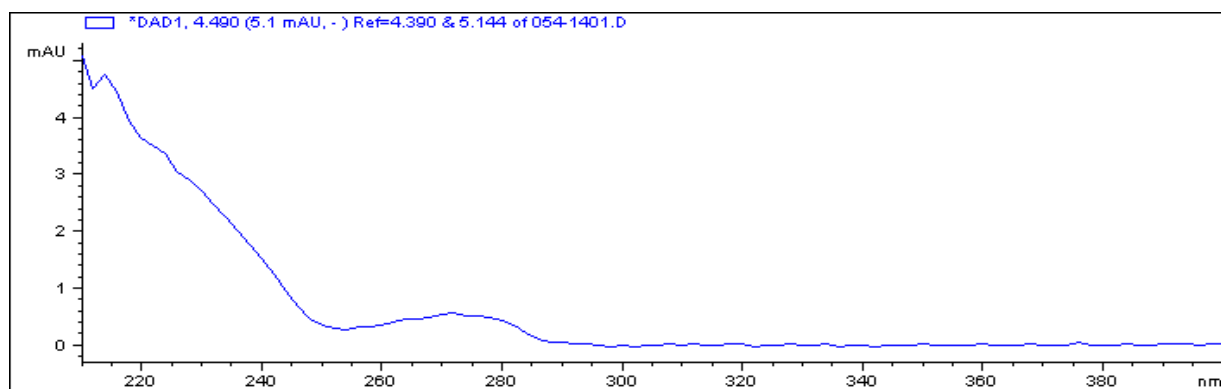


Obr. 4: Štruktúra naproxenu

Zariadenie: HPLC systém Agilent Technologies (Waldbronn, Nemecko), ktorý pozostáva z: vákuového odplyňovača mobilných fáz (G1379B), dvojkanálovej vysokotlakovej binárnej pumpy (G1312B), automatického dávkovača (G1329B), kolónového termostatu (G1316B), DAD detektora (G1315), ELSD detektora (1200 Series), vyhodnocovacieho programu Agilent.

Výsledky a diskusia

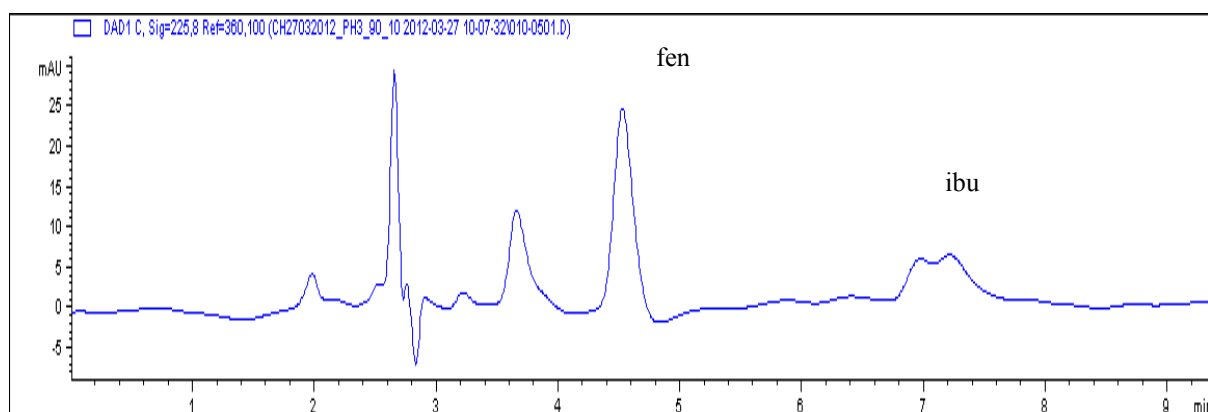
Pre štandardy študovaných profénov boli namerané spektrá v reveznofázovom móde na achirálnnej stacionárnej fáze Purospher RP-18e s detektorom s diódovým poľom v ultrafialovej oblasti spektra v rozmedzí 200-400 nm. Záznamy spektier sú na obrazkoch 5-8.

**Obr. 5:** Spektrum flurbiprofenu v UV oblasti spektra 200-400nm**Obr. 6:** Spektrum naproxenu v UV oblasti spektra 200-400nm**Obr. 7:** Spektrum ibuprofenu v UV oblasti spektra 200-400nm**Obr. 8:** Spektrum fenopropfenu v UV oblasti spektra 200-400nm

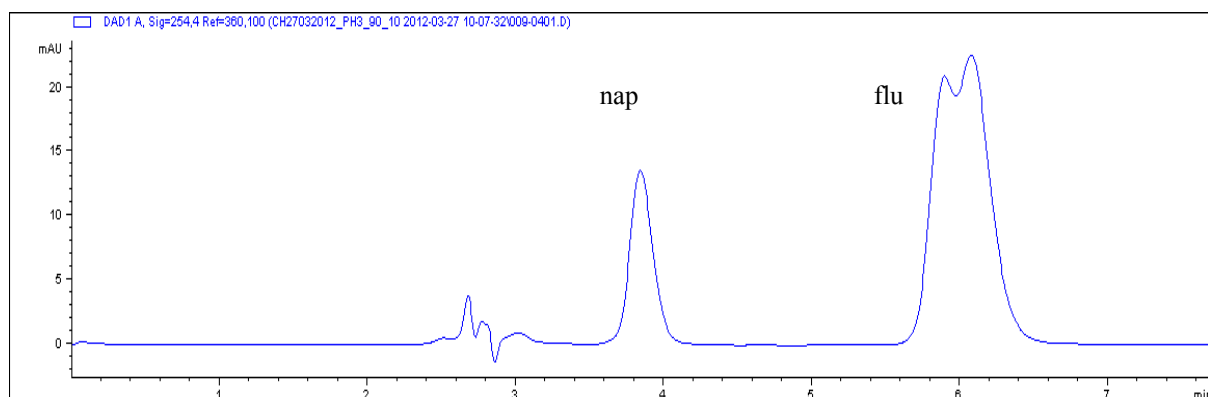
Z nameraných spektier vyplynulo, že optimálna vlnová dĺžka pre ibuprofén a fenoprofén je 225nm, pre naproxén 230 nm a pre flurbiprofén 254 nm.

Retenčné charakteristiky profénov boli sledované na β -cyklodextrínovej chirálnej stacionárnej fáze Chiradex v závislosti od zloženia mobilnej fázy metanol:mravčan amónny, v rozmedzí obsahu metanolu 75% -95% od prietoku mobilnej fázy od 0,8 - 1,2 ml/min a pH 3, 5 a 7. Čiastočná chirálna separácia flurbiprofenu $R_s=0,74$ a ibuprofenu $R_s=0,81$ bola dosiahnutá pri zložení mobilnej fázy metanol:mravčan amónny, pH 3 (90:10, v/v) s prietokom 1 ml/min. Čiastočná chirálna separácia je zobrazená na obrázkoch 9 a 10. Fenoprofén, ktorý vo svojej molekule obsahuje O -substituent sa na Chiradexovej stacionárnej fáze neseperoval na enantioméry.

Pre RP-HPLC analýzu na chirálnej stacionárnej fáze Chiradex, ktorý patrí do skupiny B-cyklodextrínových stacionárnych fáz bolo použité sériové zapojenie DAD a ELSD detektorov. ELSD detekcia v porovnaní so spektrofotometrickou detekciou poskytla nízke odozvy.



Obr. 9: Chromatografická separácia štandardov, 10 $\mu\text{g/ml}$: **fen**) fenoprofén; **ibu**) ibuprofén
Experimentálne podmienky: metanol:mravčan amónny, pH 3 (90:10, v/v), 1 ml/min, UV detekcia pri 225 nm.



Obr. 10: Chromatografická separácia štandardov 10 $\mu\text{g/ml}$: **nap**) naproxén; **flu**) flurbiprofén
Experimentálne podmienky: metanol:mravčan amónny, pH 3 (90:10, v/v), prietok 1 ml/min, UV detekcia pre naproxén pri 230 nm a flurbiprofén 254 nm.

Záver

Profény patria do skupiny protizápalových liečiv. Bola dosiahnutá čiastočná chirálna separácia flurbiprofenu a ibuprofenu na Chiradexovej stacionárnej fáze v mobilnej fáze metanol: mravčan amónny, pH 3 (90:10, v/v) s prietokom 1 ml/min. Nakoľko naproxén je dostupný v podobe čistého S-enantioméru, poskytuje len jeden pík. Fenoprofén v študovanom rozmedzí zloženia mobilnej fázy sa nám nepodarilo ani čiastočne rozdeliť na enantioméry.

Pod'akovanie

Pod'akovanie za podporu patrí projektu ITMS: 26240220061- Centrum pre priemyselný výskum optimálneho spôsobu syntézy vysokoúčinných liečiv.

Zoznam použitej literatúry

- [1.] GUBITZ, G. et al.(2001) Biopharm. Drug. Dispos.22, p.291
- [2.] CANCELLIERE, G., et al. (1999) Pharm. Sci. Technol To.12

Addition of azlactones to imines catalyzed by thiourea catalysts

Matej Žabka, Radovan Šebesta

*Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie,
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; zabka.matej@gmail.com*

Abstract

Asymmetric organocatalysis, a new and innovative field of catalysis, provides a way to synthesize complex molecules under relatively mild conditions. One of its important areas, catalysis with small molecule hydrogen-bond donors, is a frontier of research in asymmetric catalysis. Thioureas have proved to be versatile hydrogen-bond donors and owing to their variability, they have found many applications as chiral catalysts. The aim of this work is to prepare chiral α,β -diamino acids, important precursors in the synthesis of amino acid analogues and drugs, using thiourea catalysts. Reaction of azlactones, the derivatives of amino acids, with imines catalysed by thioureas, would give differently protected chiral α,β -diamino acids, thus providing starting material for further elaboration of biologically interesting molecules.

Key words: *asymmetric organocatalysis, thiourea catalyst, azlactones*

Introduction and scientific goal:

Hydrogen-bonding catalysis has been employed extensively to activate electrophiles and thus stabilize the transition state of the reaction [1]. Thioureas have recently emerged as a powerful, tunable and easily available hydrogen bond donor catalysts. Bifunctional thiourea catalysts, containing additional amino or hydroxy group, are used to activate nucleophiles at the same time and provide a transition state leading to enantiomerically pure products. One of the first examples is the addition of silyl ketene acetal **2** to the *N*-Boc imine **3** to form β -aminoacid **4** using thiourea **1**, based on (1*R*,2*R*)-cyclohexane-1,2-diamine [2].

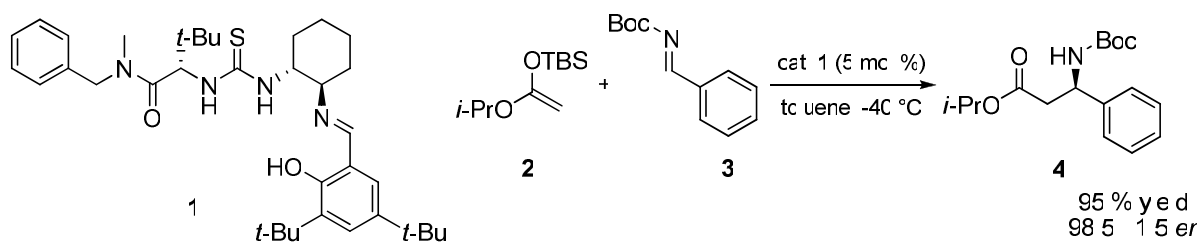


Fig. 1 Addition of silyl ketene acetal to imine

Bifunctional thiourea **5**, containing tertiary amino group, catalyzes the addition of malonate **7** to nitroalkene **6**. This catalyst contains 3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl group, which enhances the acidity of the thiourea.

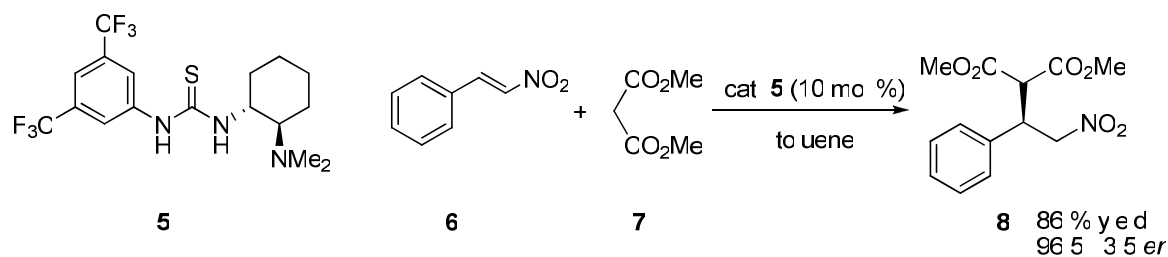


Fig. 2 Addition of malonate to nitroolefin

Addition of pentane-2,4-dione (**10**) to isatine ketimine **9** afforded the product in excellent yield and enantioselectivity. Thiourea catalyst **12** was employed, allowing also the addition of various malonate esters. Resulting 3-aminooxindol is the core structure found in many bioactive molecules.

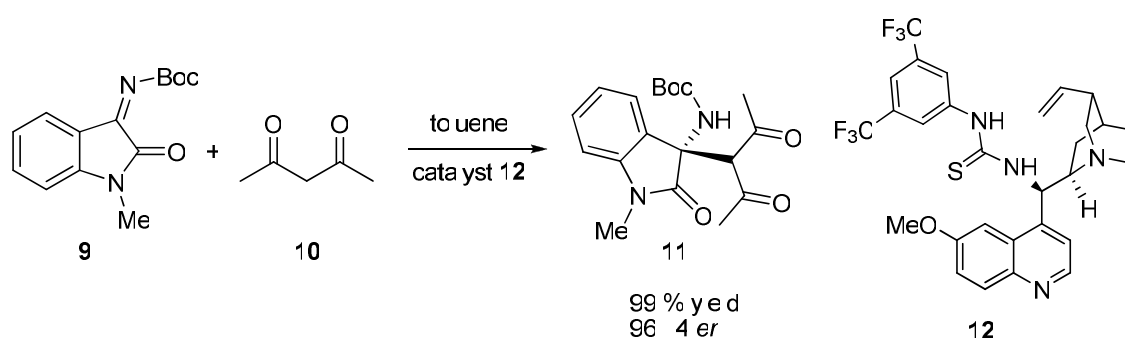


Fig. 3 Synthesis of 3-aminooxindoles

The main goal of the project is to prepare chiral, enantiopure α,β -diaminoacids containing different protecting groups, thus enabling different deprotection protocols to be employed for their further elaboration to biologically interesting molecules (e.g. amino acids analogues). These derivatives can be synthesized by reaction of substituted azlactones with aryl imines containing different protecting groups (*tert*-butoxycarbonyl (Boc), carboxybenzyl (Cbz), etc.). The azlactone moiety can finally be opened to reveal the α,β -diaminoacid structural motif (Fig. 4).

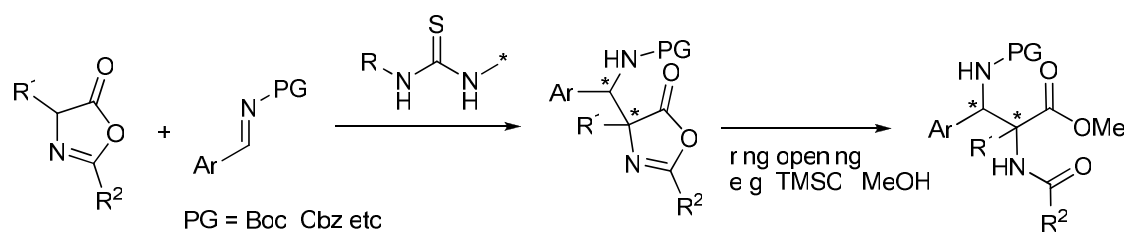


Fig. 4 Preparation of α,β -diaminoacids

Various thiourea catalysts will be tested to provide good yield, enantioselectivity and diastereoselectivity, respectively. These catalysts can provide hydrogen bonding between thiourea part and the imine nitrogen or carbonyl of the protecting group. Such hydrogen bond

thus activates the imine towards the addition of a nucleophile. Many of these catalysts contain also an additional amino group, which can deprotonate azlactone and develop another hydrogen bonding between ammonium group and the deprotonated azlactone. These interactions can stabilize a transition state, which can lead to products with high enantioselectivity (Fig. 5).

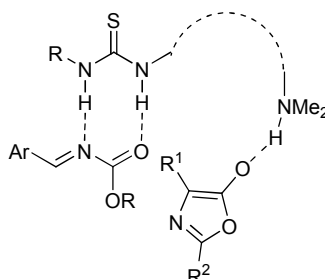


Fig. 5 Transition state for the reaction of azlactones and imines

Materials and methods:

All solvents were distilled prior to use. Thin layer chromatography (TLC) was performed on pre-coated aluminium-backed plates (Merck Kieselgel 60 F254) and visualized by ultraviolet irradiation. Column chromatography was performed on silica gel 65/40 (Merck). NMR spectra were acquired on Varian NMR System 300 spectrometer, running at 300 MHz for ^1H , and 75 MHz for ^{13}C , respectively, with tetramethylsilane (TMS) as reference. HPLC was performed on Daicel Chiralpak AD-H and IA columns with UV detection at 249 nm.

Results and discussion:

An essential part of the research has been the preparation of various chiral thiourea catalysts. Catalyst **13** was prepared according to the literature [2], starting from *L-tert-leucine* (Fig. 6).

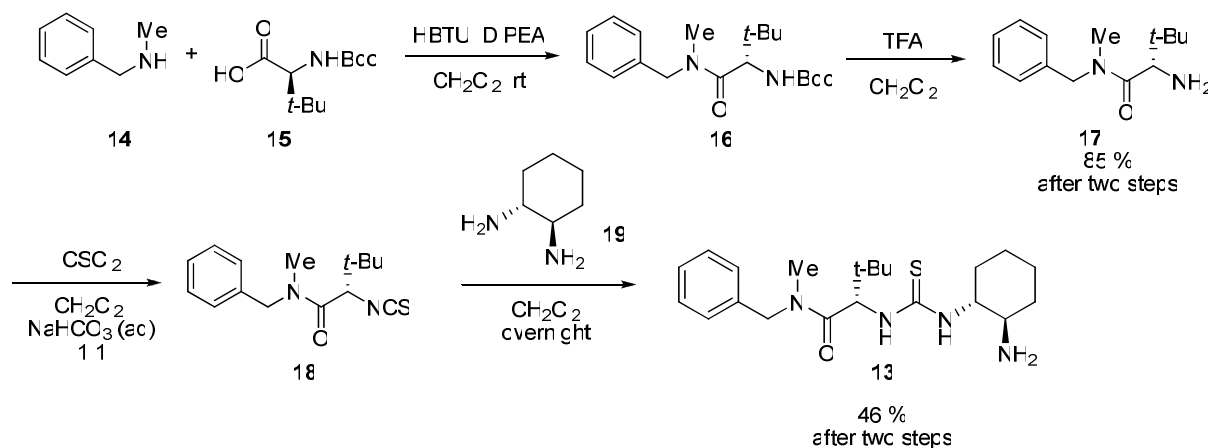


Fig. 6 Preparation of catalyst **13**

This catalyst was then further modified to give various derivatives, including new catalyst **20**, which can act as a multiple hydrogen bond donor (Fig. 7).

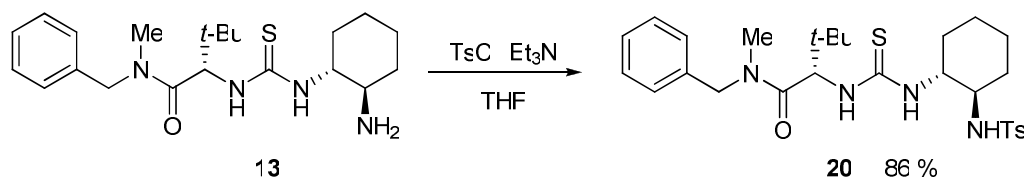


Fig. 7 Synthesis of catalyst **20**

One of the commonly employed catalysts is based on the cinchona alkaloids [5]. Their synthesis commences with their transformation into primary amine and reaction with isothiocyanate to give thiourea catalysts (Fig. 8). A new catalyst **21** was prepared in this way, which is supposed to provide tightly confined space for the transition state.

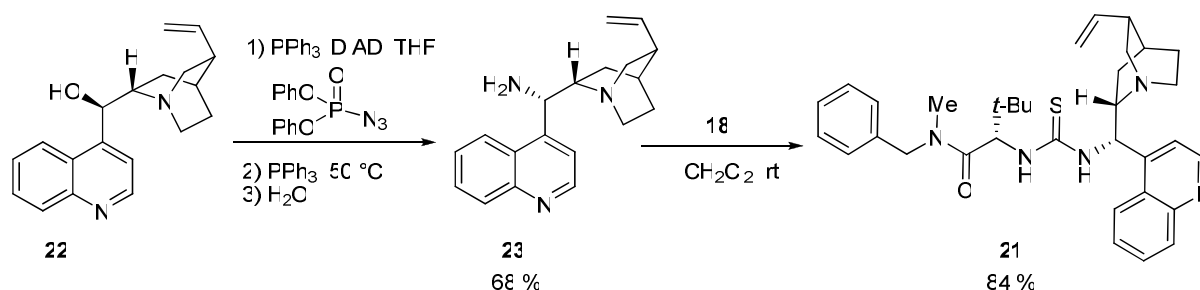


Fig. 8 Synthesis of alkaloid-based thiourea catalyst **17**

The most often used catalyst is thiourea **24**, however, it proved difficult to synthesize. Finally, after attempting several routes, it was prepared by reaction of diamine **19** and isothiocyanate **20** under high dilution conditions [6] and subsequent methylation [7] (Fig. 9). We found that using THF as a solvent improved the yield for the first step.

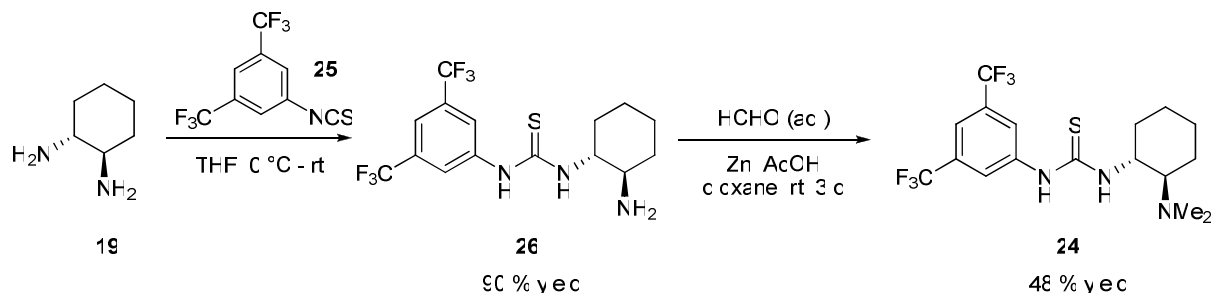


Fig. 9 Preparation of thiourea catalyst **24**

To test our hypothesis, we first utilized *N*-Boc imine **3**. Reaction of racemic azlactones **27**, prepared from the corresponding amino acids, catalyzed by thioureas, gave the required products. Initial experiments were performed with thiourea **13**. The isopropyl azlactone gave

only 15 % yield of **28a** after one week in toluene as a solvent. Methyl azlactone gave the best yield 73 % of **28b** in CH₂Cl₂ with only one diastereomer isolated, which was, however, racemic.

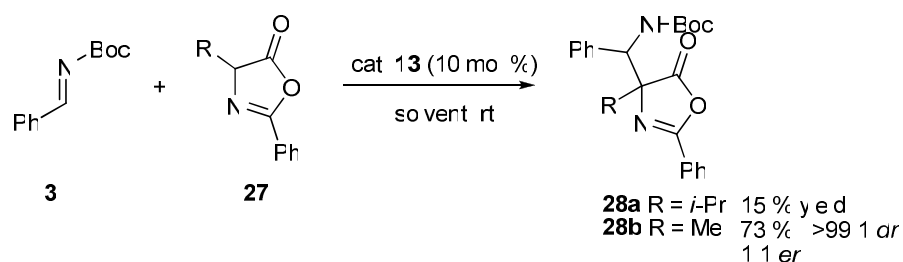


Fig. 10 Additions of azlactones to *N*-Boc imine **3**

As commercially available imines are expensive and not easily preparable, we decided to use sulphone precursors to generate imines *in situ*. Several thiourea catalysts were screened for the reaction of methyl azlactone and Boc-protected sulphonyl imine under biphasic conditions using toluene and water. The best results have been achieved using cinchona catalyst **32**.

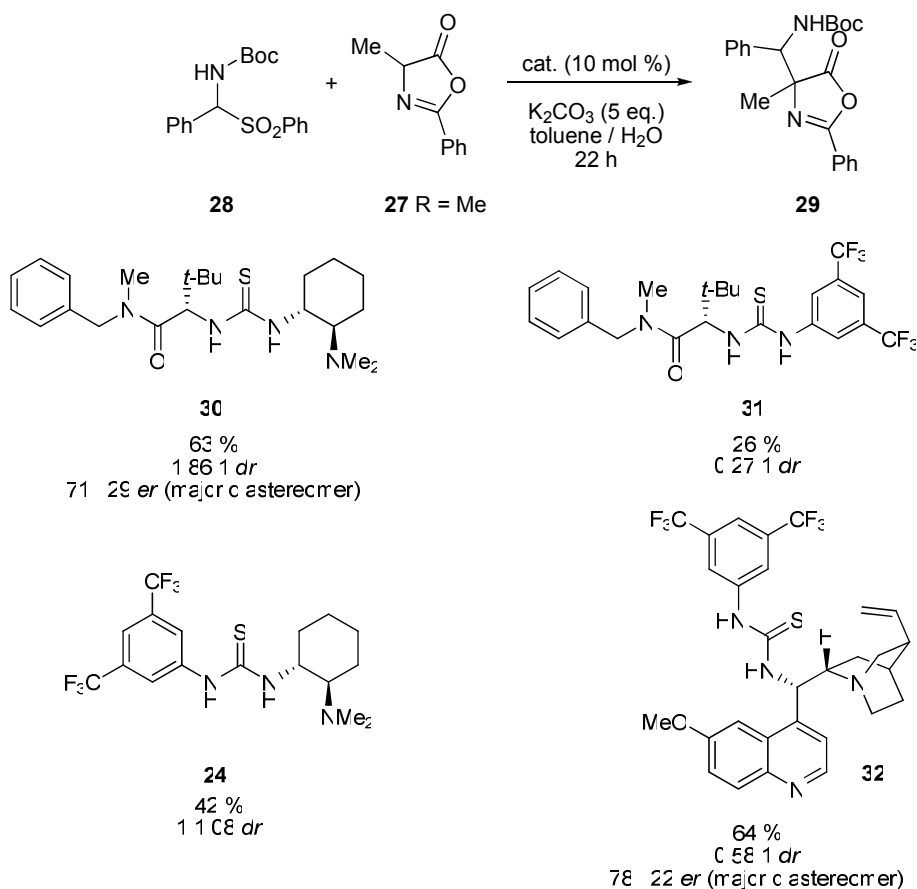


Fig. 11 Addition of azlactone to *in situ* formed imine

Benzyl azlactone was found to give products in higher yields. Only one equivalent of base was found satisfactory for the yield. Substitution of azlactone aryl group with electron donating group, such as bromine, provided slightly higher diastereoselectivity, but almost no enantioselectivity.

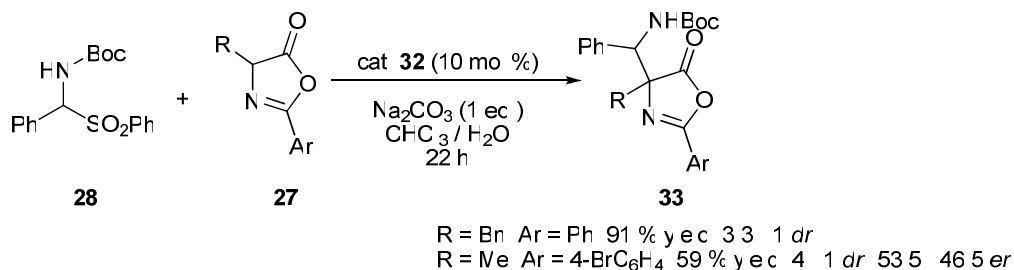


Fig. 12 Addition of benzyl azlactone

However, at the present time, it is not possible to separate all four stereoisomers of the products by HPLC and determine enantiomeric ratios precisely. Further derivatization of the products is therefore in progress to allow HPLC determination of enantiomeric purities of products.

Conclusions:

We have prepared a variety of thiourea catalysts, including new derivatives. We tested several catalysts for the Mannich reaction of azlactones with imines. We have achieved good to excellent yields, but only moderate stereoselectivity. Further optimization of the reaction is currently under investigation, including testing of the all prepared catalysts.

Literature:

- [1] Pihko P. M. (2004) *Angew. Chem. Int. Ed.* 43, p. 2062
- [2] Wenzel A. G., Jacobsen E. N. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124, p. 12964
- [3] Okino T., Hoashi Y., Takemoto Y. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* 125, p. 12672
- [4] Yan W., Wang D., Feng J., Li P., Zhao D., Wang R. (2012) *Org. Lett.* 14, p. 2512
- [5] Vakulya B., Varga S., Csámpai A., Soós T. (2005) *Org. Lett.* 7, p. 1967
- [6] Dudzinski K., Pakulska A. M., Kwiatkowski P. (2012) *Org. Lett.* 14, p. 4222
- [7] Berkessel A., Seelig B. (2009) *Synthesis* 12, p. 2113

Príprava a štúdium hybridných vrstevnatých materiálov pomocou THz-TDS

Daniel Zich¹, Juraj Darmo², Vojtech Szöcs³, Dušan Lorenc⁴, Marián Janek¹

¹Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyzikálnej a teoretickej chémie, CH1, SK-84215 Bratislava, Slovakia daniel.zich@gmail.com

²Institute of Photonics, Vienna University of Technology, Gusshausstraße 27-29, A-1040 Vienna, Austria

³Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Chemický ústav, CH2, SK-84215 Bratislava, Slovakia

⁴Medzinárodné laserové centrum Ilkovicova 3, SK-81219 Bratislava, daniel.zich@gmail.com

Abstract

Hybrid organic-inorganic materials were prepared from selected layered silicate namely montmorillonite (MMT) treated with monomethylamine hydrochloride (MMA), dimethylamine hydrochloride (DMA), trimethylamine hydrochloride (TMA), the series of amino acids – glycine (Gly), alanine (Ala) and cysteine (Cys). Fourier Transform Infra Red (FTIR) spectroscopy and X-ray diffraction (XRD) were used for characterization of original material and materials after their modification using selected organic compounds. Subsequently the THz-TDS spectroscopy was used to achieve dielectric properties of prepared organic-inorganic hybrid materials. New absorptions bands were found for MMA, DMA, TMA, Gly, Ala and Cys in Far Infrared (THz) region that had not yet been described in the literature.

Kľúčové slová: Montmorillonit; hybridné materiály; THz; RTG; FTIR;

Úvod a formulácia cieľa

Cieľom práce bolo štúdium vybraných hybridných organicko-anorganických materiálov metódou THz spektroskopie s časovým rozlíšením (TDS). Ako anorganický materiál bol zvolený prírodný ílový minerál montmorillonit (M). Okrem techniky THz-TDS teda spektroskopie s časovým rozlíšením v ďalekej IČ oblasti, boli na charakterizáciu pripravených materiálov použité štandardné metódy charakterizácie tuhej fázy, infračervenej spektroskopie (FTIR) a röntgenovej difrakčnej analýzy práškov (RTG).

Materiál a metódy

Hybridné materiály boli pripravené z ~1% disperzie montmorillonitu a príslušného roztoku látky interkalovanej do medzivrstiva pri laboratórnej teplote. K disperzii bolo pridané 25ml roztoku interkalovanej látky s koncentráciou 0,033mol/dm³. Po zmiešaní oboch zložiek sa vzniknutá disperzia odcentrifugovala a následne sa uskutočnil opakovaný prídavok roztoku obsahujúceho príslušnú organickú zlúčeninu. Po odcentrifugovaní disperzie bol pripravený materiál premývaný destilovanou vodou až do negatívnej reakcie na Cl⁻ uskutočnenej pomocou roztoku AgNO₃. Pripravené materiály boli vysušené v sušiarňi pri teplote 60°C.

THz spektroskopia

Terahertzové (THz) žiarenie, alebo T-lúče, premostujú oblasť medzi elektronickými a fotooptickými aplikáciami teda medzi infračervenou a milimetrovou oblasťou elektromagnetického spektra. Interakcia THz vln s materiálmi je ovplyvňovaná špecificky vlastnosťami samotného materiálu. Rôzne rotačné, vibračné a translačné módy molekúl možno pozorovať v rozsahu 0.1 až 10 THz ($3\text{--}333\text{ cm}^{-1}$). THz spektroskopia pritom môže byť použitá na štúdium plyných, kvapalných ale aj tuhých látok [6]. Pri interakcii THz žiarenia s látkou dochádza k vybudeniu rotačných a vibračných módov molekúl resp. ku koligatívnym vibráciám kryštalických štruktúr. Pretože tieto módy sú jedinečné a špecifické pre každý typ zlúčeniny, THz spektrum reprezentuje spektrálny „odtlačok prstov“ príslušnej latky dovoľujúci jej chemickú identifikáciu.

Výsledky a diskusia

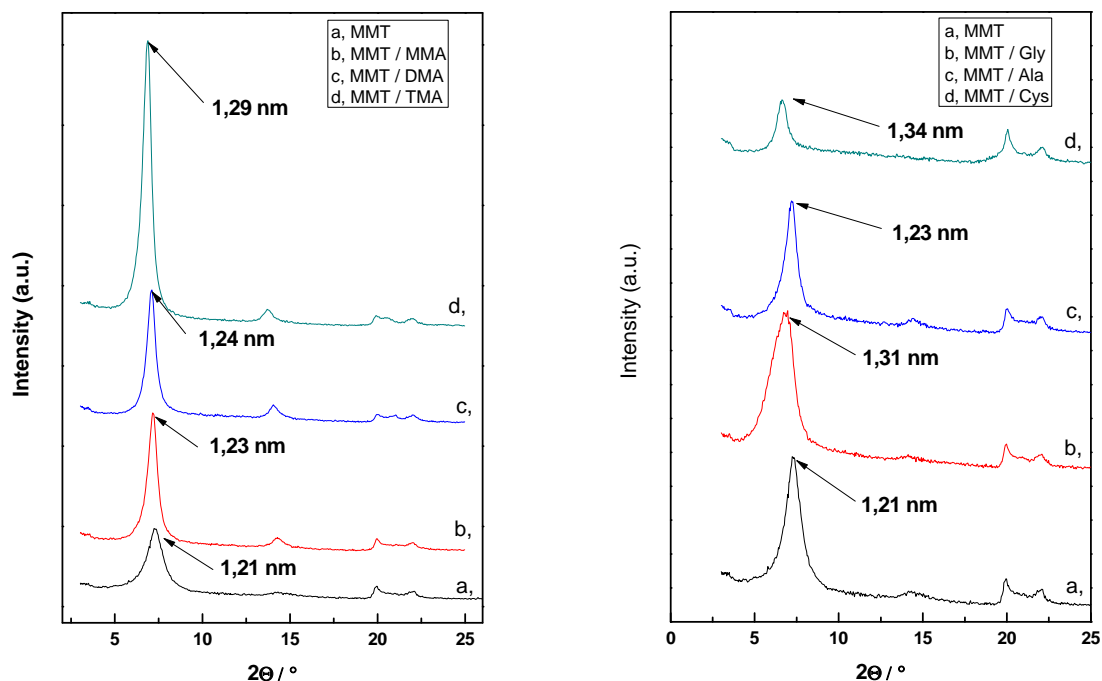
1 RTG a FTIR spektroskopia hybridných anorganicko-organických materiálov montmorillonitu

Na meranie RTG záznamu bol použitá prášková röntgenová difrakčná analýza uskutočnená pri izbovej teplote pomocou prístroja Philips Analytical - PW1710 ($\text{CuK}\alpha = 1.542475\text{ nm}$, 40kV), v rozsahu $4\text{--}64^\circ 2\Theta$ s krokom 0.02 a 2s integračným časom na krok. Nameraný RTG záznam montmorillonitu ako aj jeho interkaláty so zvolenými organickými molekulami sú zobrazené na Obr 1.

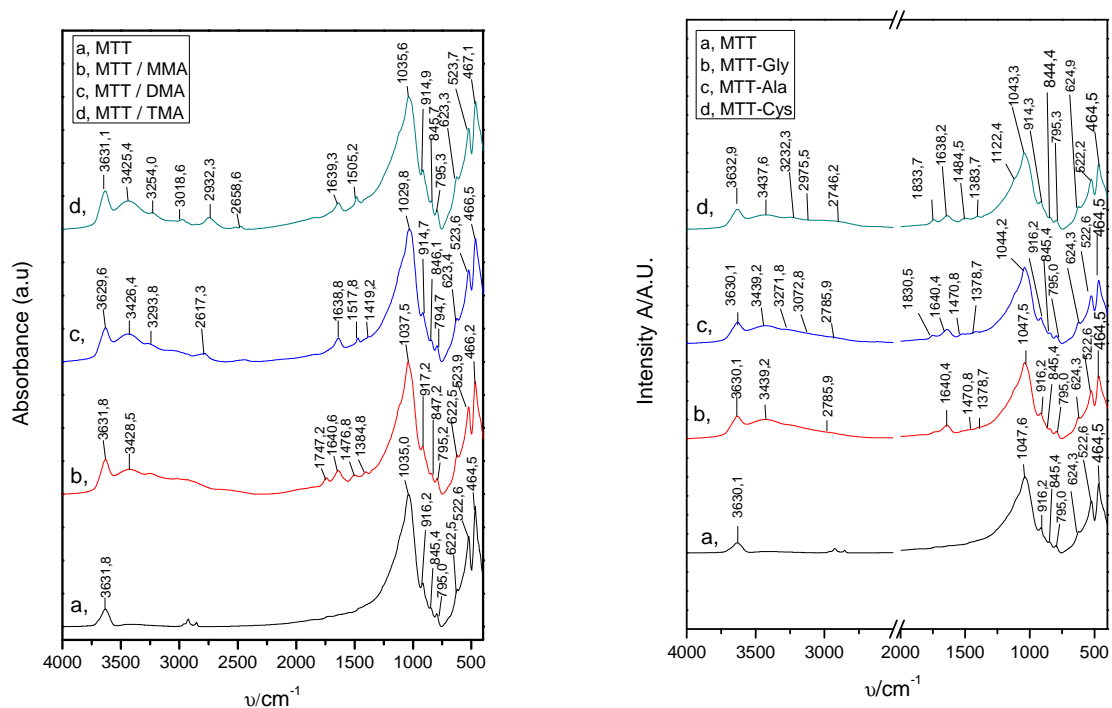
Zo záznamov vidieť zmenu v pozícii prvého bazálneho reflexu zodpovedajúce zmene vzdialenosť vrstiev v dôsledku interkalácie. Pre čistý montmorillonit bola nájdená vzdialenosť vrstiev na úrovni 1,21 nm; pre jednotlivé hybridné organicko-anorganické materiály pripravené z amínov sme získali nasledovné hodnoty: M/MMA 1,23 nm, M/DMA 1,24 nm, M/TMA 1,29 nm. Táto postupná zmena indikuje, že veľkosť použitého organického katiónu MMA je porovnateľná s veľkosťou pôvodného anorganického katiónu kompenzujúceho náboj vrstiev v medzivrství. Pre pripravené hybridné organicko-anorganické materiály pripravené z aminokyselín boli pozorované nasledovne medzivrstvové vzdialenosti M/Ala 1,23 nm, M/Gly 1,31 nm a M/Cys 1,34 nm. Bazálna vzdialenosť sa postupne mení až na hodnotu známu pre interkaláty montmorillonitu a amínov s lineárnymi reťazcami.

Meranie IČ spektier montmorillonitu bolo uskutočnené na KACH UK pomocou prístroja Nicolet Magna 750 Fourier transform infrared spectrometer používajúci DTGS detektor v intervale vlnočtov $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ s rozlíšením 4 cm^{-1} . Meranie bolo uskutočnené tak, že vzorka vysušená pri 60°C bola rozdrvená v achátovej miske a zmiešaná s KCl.

Z pripravenej zmesi sa zlisovali tabletky na merania. Získané spektrá montmorilonitu a pripravených hybridných organicko-anorganických materiálov sú zobrazená na Obr. 2.



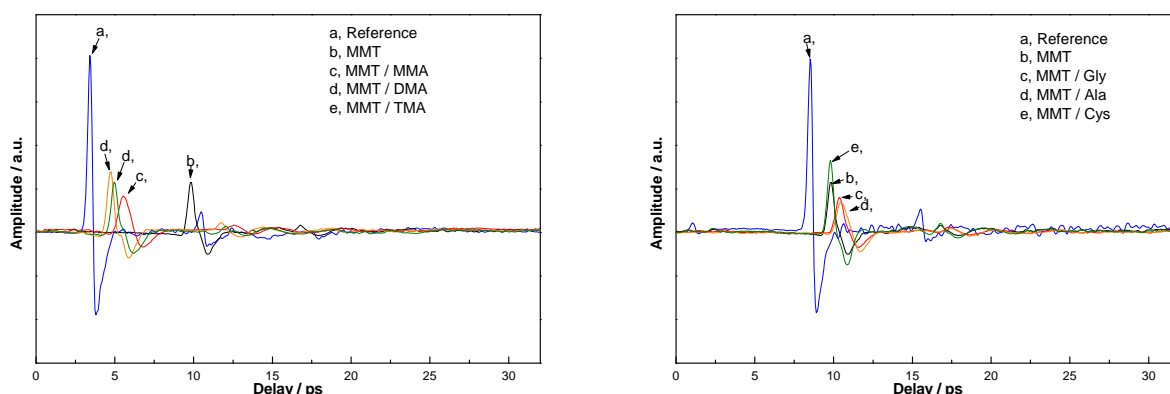
Obr. 1. Namerané RTG záznamy montmorilonitu a jeho jednotlivých organicko-anorganických hybridných foriem: MMT/MMA, MMT/DMA, MMT/TMA, MMT/Gly, MMT/Ala a MMT/Cys



Obr. 2 Namerané IČ spektrá montmorilonitu a jednotlivých organicko-anorganických hybridných materiálov MMT/MMA, MMT/DMA, MMT/TMA, MMT/Gly, MMT/Ala a MMT/Cys

2. THz-TDS spektroskopia hybridných organicko-anorganických materiálov montmorillonitu

Meranie THz spektier montmorillonitu a pripravených organicko-anorganických hybridných materiálov bolo uskutočnené v spolupráci s Technickou Univerzitou vo Viedni. V prvom kroku bolo uskutočnené meranie referencie. Ako referenciu sme použili namerané spektrum suchého vzduchu, ktoré je transparentné pre THz meranie. Vzorka montmorillonitu a pripravených hybridných organicko-anorganických materiálov boli zlisované do tabletkovej formy v lise pod tlakom $98,03\text{N/cm}^2$ ($45,36\text{kg/cm}^2$). Vzniknuté tabletky boli prichytené do držiaka THz spektrometra a meranie sa uskutočnilo po prepláchnutí spektrometra suchým vzduchom. Namerané časové spektrá referencie, montmorillonitu a pripravených organicko-anorganických hybridných materiálov sú zobrazené na Obr. 3.

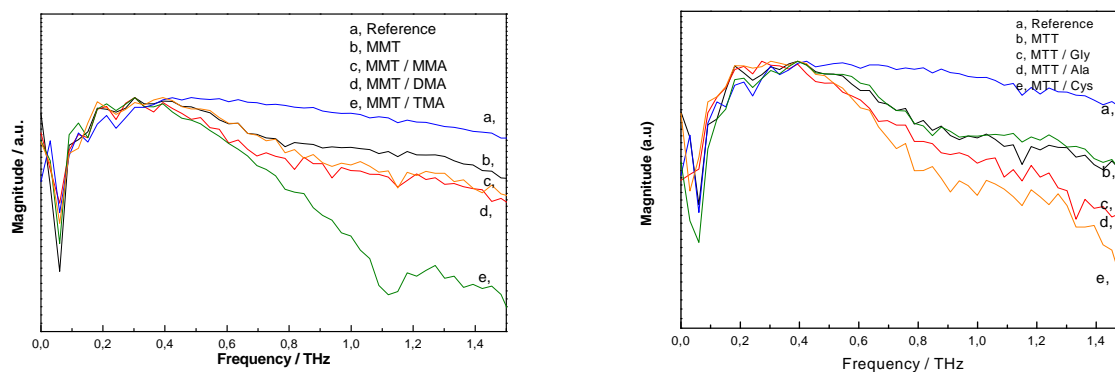


Obr. 3 Namerané časové spektrum referencie, montmorillonitu a pripravených organicko-anorganických hybridných materiálov.

Na výpočet sa použila najskôr fourierova transformácia, pričom získané spektrá vo frekvenčnej doméne boli použité na získanie transferovej funkcie (2) pre metódu iterácie z fixného bodu podľa Whitayachumnankul-a [7].

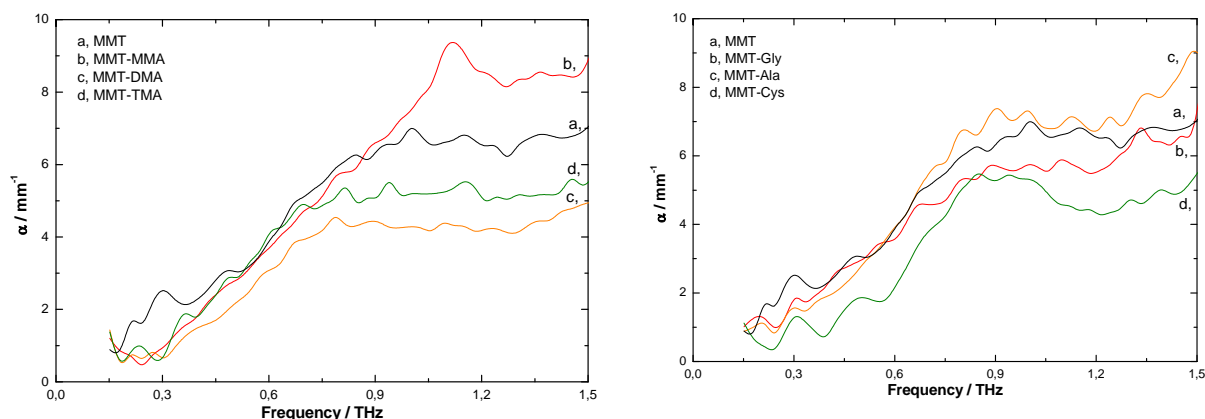
$$H(\omega) = \frac{E_{vz}(\omega)}{E_{ref}(\omega)} \quad (1)$$

Prepočítané frekvenčné spektrá montmorillonitu a pripravených organicko-anorganických hybridných materiálov sú zobrazené na Obr. 4



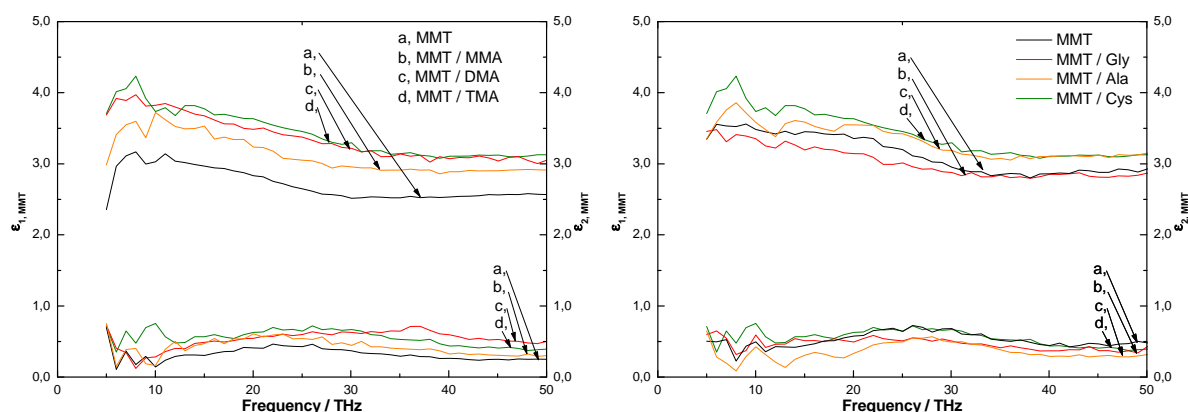
Obr. 4 Namerané frekvenčné spektrum referencie, montmorillonitu a pripravených organicko-anorganických hybridných materiálov získané Fourierovou transformáciou.

Uvedeným postupom sa získali výsledky frekvenčnej závislosti komplexného refrakčného indexu študovaných organicko-anorganických hybridných materiálov ako aj hodnoty absorpčného koeficientu vyjadrujúceho spektrálne vlastnosti montmorilonitu a pripravených organicko-anorganických hybridných materiálov v ďalej IC oblasti (Obr. 5).



Obr. 5 Prepočítaná frekvenčná závislosť absorpčného koeficientu montmorillonitu a pripravených organicko-anorganických materiálov v THz oblasti.

Ako vidieť z obrázku 5, boli zistené široké pasy pre pripravených organicko-anorganických hybridných materiálov pre MMT/MMA a MMT/Cys. Pre MMT/MMA bol široký pás s maximom pri 1,15 THz a pre MMT/Cys s maximom pri 0,88 THz. Použitím Maxwellových rovníc bola ďalej vypočítaná aj frekvenčná závislosť komplexnej dielektrickej funkcie pripravených organicko-anorganických hybridných materiálov zahrňujúca jej reálnu ϵ_{real} a imaginárnu ϵ_{imag} zložku (Obr. 6).



Obr.6 Vypočítané dielektrické vlastnosti montmorillonitu a pripravených organicko-anorganických hybridných materiálov.

Záver

Z RTG záznamov montmorillonitu pripravených organicko-anorganických hybridných materiálov sme zistili, že vzdialenosť vrstiev je pre montmorillonit 1,21 nm, a pre hybridné organicko-anorganické materiály pripravené z amínov pre MMT/MMA 1,23 nm, MMT/DMA 1,24nm, MMT/TMA 1,29nm. Pre pripravené hybridné organicko-anorganické materiály pripravené z aminokyselín MMT/Gly 1,31 nm, MMT/Ala 1,23 nm a MMT/Cys 1,34 nm.

Vypočítané vzdialenosti vrstiev pripravených organicko-anorganických hybridných materiálov je väčší ako vzdialenosti vrstiev pre montmorillonit. RTG difrakcia pripravených hybridných materiálov potvrdila zmenu bazálnej vzdialenosti vrstiev čím indikuje úspešnú prípravu hybridných materiálov na báze montmorillonitu.

Namerané IČ spektrá interkalátov montmorillonitu potvrdili prítomnosť absorpčných pásov charakteristických pre jednotlivé organicko-anorganické hybridné materiály, čím sa odlišovali od IČ spektier čistého montmorillonitu. IČ spektrum pre montmorillonit bol porovnaný s nameranými publikovanými IČ spektrami [4,5].

Z nameraných THz spektier boli identifikované absorpčné pásy interkalátov MMT-MMA s maximom pri 1,15 THz a MMT-cysteínu s maximom pri 0,88 THz. Z časových THz spektier boli vypočítané dielektrické vlastnosti materiálov, index lomu a absorpčné koeficienty pre pripravené organicko-anorganické hybridné materiály montmorillonitu.

Pod'akovanie

Na tomto mieste chceme poďakovať za spoluprácu pri THz-TDS meraniach kolegom z Ústavu Fotoniky Technickej Univerzity vo Viedni a Medzinárodnému laserovému centru v Bratislave. Katedre anorganickej chémie PriF UK ďakujeme za umožnenie FTIR meraní a Ústavu anorganickej chémie SAV v Bratislave za merania Röntgenových difrakčných záznamov.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Janek M., Matejdes M., Szocs V., et al. , (2010) Philos. Mag., 90(17–18), p. 2399
- [2] Janek M., Bugár I., Lorenc D., et al., (2009), Clays Clay Miner., 57(4) p.416,
- [3] Šucha, V. a kol. (1996) (Laboratory Determinative Methods for Mineral Resources) Laboratórne metódy výskumu nerudných surovín. UK Bratislava p. 138
- [4] Madejova J., (2003), Vib. Spectrosc. 31(1-10) p. 1
- [5] Madejová J, Komadel P. (2001) Clays Clay Miner., 49(5) p.410
- [6] Jones I., Rainsford T. J., Fischer B., et al. (2006) Vib. Spectrosc. 41, p. 144
- [7] Withayachumnankul W., Ferguson B., Rainsford T., et al. (2005) SPIE., 5840, p. 221

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA



ŠVK
PriF UK
2013

GEOLÓGIA

ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2013
ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV

Využitie satelitnej radarovej interferometrie na monitorovanie deformácií zemského povrchu

Kristína Bátorová¹, Rudolf Tornyai¹, Patrícia Ekkertová¹, Matúš Bakoň², Juraj Papčo²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra inžinierskej geológie, Mlynská dolina, 842 15, Bratislava, Slovenská republika, e-mail: batorovak@fns.uniba.sk

²STU v Bratislave Stavebná fakulta, Katedra geodetických základov, Radlinského 11, 813 68, Bratislava, Slovenská republika

Abstrakt

Satellite radar interferometry is one of the most progressive methods for remote sensing of the Earth surface. InSAR (**Interferometric synthetic aperture radar**) techniques are designed to estimate the temporal characteristics of surface deformation. In many cases, these techniques give the opportunity to measure deformation signals in locations where conventional methods fail and also to reduce the error associated with them. Among these techniques, Persistent Scatterer (PS) methods work by identifying the ground resolution elements that are dominated by a single scatterer. A persistent scatterer exhibits reduced baseline and temporal decorrelation due to its stable, point-like scattering mechanism. This technique can be used to monitor temporal evolution of deformation phenomena at millimeter scale via generation of mean deformation velocity maps (interferograms) and displacement time series from a data set of acquired SAR images.

Kľúčové slová: satelitná radarová interferometria; monitorovanie; deformácie zemského povrchu

Úvod a formulácia cieľa

Satelitná radarová interferometria je efektívnym nástrojom monitorovania deformácií zemského povrchu. Na vedeckú scénu nastúpila približne pred dvadsiatimi rokmi. Jednou z najpodstatnejších výhod radarovej interferometrie je využitie aktívnych snímacích systémov schopných poskytovať obraz zemského povrchu vo vysokom rozlíšení nezávisle od dennej doby (deň/noc) a počasia. Princíp aktívneho radaru na rozdiel od jeho pasívnej varianty spočíva v tom, že zemský povrch je ožarovaný elektromagnetickým žiarením, ktoré produkuje zdroj umiestnený na družici. Techniky radarovej interferometrie nachádzajú tiež uplatnenie napríklad pri geofyzikálnom monitorovaní prírodných nebezpečenstiev (zemetrasenia, vulkanická činnosť, zosuvy a poklesy pôdy), pozorovaní dynamiky zložiek zemského povrchu, tvorbe digitálneho modelu reliéfu, klasifikácií druhov krajinej pokrývky, alebo pri prieskume životného prostredia [1]. Príspevok je zameraný na využitie satelitnej radarovej interferometrie a metódy odrazových bodov na monitorovanie rôznych prejavov deformácií zemského povrchu na území Slovenska. Predstavuje komplexné zhodnotenie stability záujmového územia, pričom progresívna metóda diaľkového prieskumu Zeme bola využitá na

monitorovanie deformácií zemského povrchu v oblasti Žiarskej kotliny. V tejto oblasti sa vyskytuje významný neotektonický zlom. Monitoring neotektonickej aktivity je veľmi dôležitý z hľadiska racionálneho využitia krajiny.

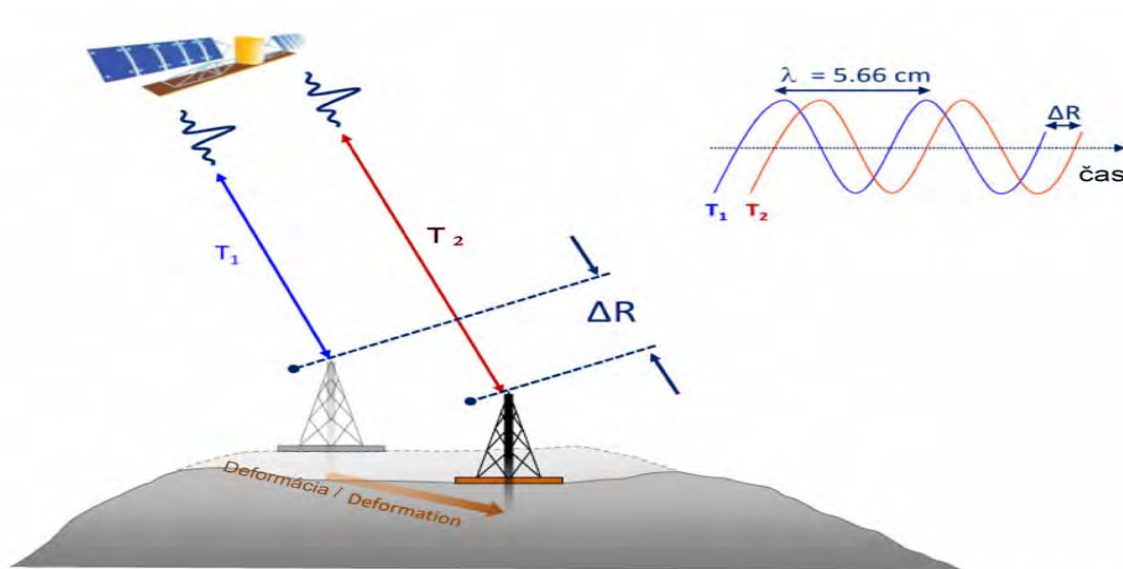
Materiál a metódy

Technológia InSAR využíva radarové snímky získané pri monitorovaní zemského povrchu družicami. Radar so syntetickou apertúrou permanentne vysiela pulzy radarových vln smerom k Zemi a zaznamenáva ich odraz od zemského povrchu. Odrazené žiarenie prijaté družicou obsahuje dvojicu dôležitých zložiek, ktoré komponujú výsledný obraz. Prvá, intenzita signálu, hovorí o tom, aké množstvo radarových vln sa odrazilo späť smerom k satelitu. Závisí to hlavne od toho, koľko elektromagnetického žiarenia bolo absorbovaného počas jeho cesty napríklad vegetáciou, a koľko ho bolo odrazeného späť do satelitu. Druhá informácia je fáza radarovej vlny [2]. Fáza je nosnou sprostredkujúcou veličinou spracovania údajov v radarovej interferometrii a má významné postavenie aj v iných geodetických metódach merania (pozemné meranie vzdialeností fázovým diaľkomerom, určovanie polohy pomocou globálnych družicových navigačných systémov, atď.). Každý obrazový prvok (pixel) radarovej snímky obsahuje teda dve informácie: intenzitu a fázu. Intenzita môže byť použitá napríklad na stanovenie materiálu, z ktorého je odrážajúci povrch zložený. Týmto spôsobom môžu byť rozpoznané olejové škvrny na mori, keďže sú hladšie ako voda ktorá ich obklopuje a teda intenzita odrazeného žiarenia je iná ako intenzita okolitej vody [3]. Fáza sa používa iným spôsobom. Keď radar na obiehajúcej družici opakovane sníma dané miesto zemského povrchu, fáza v radarovom obraze by mala byť rovnaká ako pri jej prvom prelete. Kombináciou týchto dvoch obrazov tak vieme merať ako veľmi a kde došlo na zemskom povrchu ku vzniku deformácií. V prípade, že sa reflektivita sledovaného objektu nezmení a taktiež nedôjde ku zmene atmosférického vplyvu a šumu, možno pre posudzované scény vyjadriť zjednodušenú rovnicu [I.] pre výpočet výslednej fázy signálu ako:

$$\Delta\varphi = \frac{4\pi}{\lambda} \cdot \Delta R \quad [I.]$$

pričom hodnota ΔR je charakterizovaná ako rozsah veľkosti kolísania zmeny vzdialenosti snímaného cieľa od radaru, ku ktorému môže dôjsť v dôsledku vzniku deformácie na zemskom povrchu [4]. Hodnota fázy signálu je vyjadrená symbolom φ . Začiatočná fáza kmitavého pohybu elektromagnetického žiarenia vyslaného zo satelitu, vyjadruje hodnotu

veľičiny harmonického kmitania v jeho začiatočnom okamihu. Symbolom λ je vyjadrená vlnová dĺžka signálu vyslaného zo satelitu. Vzďialenosť medzi satelitom a snímaným objektom je vyjadrená veličinou R [4]. Na „Obr. 1“ je znázornený zjednodušený matematický model snímania zemskeho povrchu využitím technológie InSAR.



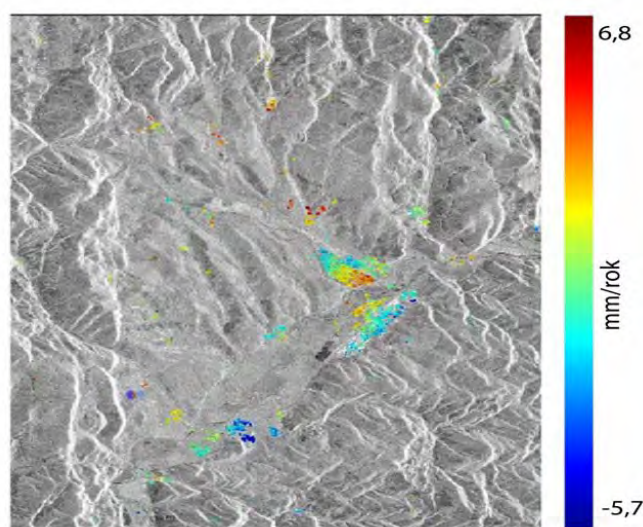
Obr. 1 Matematický model technológie InSAR [4].

Interferometrická aplikácia dát teda vyžaduje spracovanie minimálne dvoch scén rovnakého územia. Získavanie údajov preto predpokladá dvojnásobnú registráciu tej istej časti zemskeho povrchu.

Zo všetkých doposiaľ uvedených informácií môžeme načrtnúť podstatu technológie InSAR: porovnaním fázových zložiek radarových obrazov identického územia je možné určiť jeho relatívne výškové členenie a v prípade, že radarový obraz je zachytený s väčším časovým odstupom, môžeme dosiahnuť cieľ stanovený pre tento výskum, a to: vypočítať priestorové deformácie, ktoré nastali počas sledovaného obdobia. Primárnym produktom technológie InSAR sú teda digitálne modely reliéfu a mapy deformácií zemskeho povrchu. Pre určenie veľkosti deformácie zemskeho povrchu pomocou využitia technológie InSAR a algoritmu PSInSAR sú potrebné SAR údaje. Katedra inžinierskej geológie disponuje 56 SAR scénami zo satelitu ERS 1/2. Zaujímavá oblasť bola monitorovaná pomocou satelitov od roku 1992 až do roku 2000. Údaje boli autorom poskytnuté na základe projektu SAFER riešeným na Katedre inžinierskej geológie, PRIF UK v Bratislave.

Výsledky a diskusia

V príspevku bol pre historickú analýzu SAR údajov využitý algoritmus PSInSAR. Pointou algoritmu je určiť veľkosť rýchlostí pohybu všetkých objektov s dobrou odrazovou schopnosťou v sledovanom území. Ako vidieť z „**Obr. 2**“, PS (point scatterers - objekty s dobrou odrazovou schopnosťou), sú vo veľkej miere situované v obytných oblastiach a sú reprezentované prevažne budovami, čo považujeme za veľký deficit, pri celkovej interpretácii dynamického režimu záujmového územia.

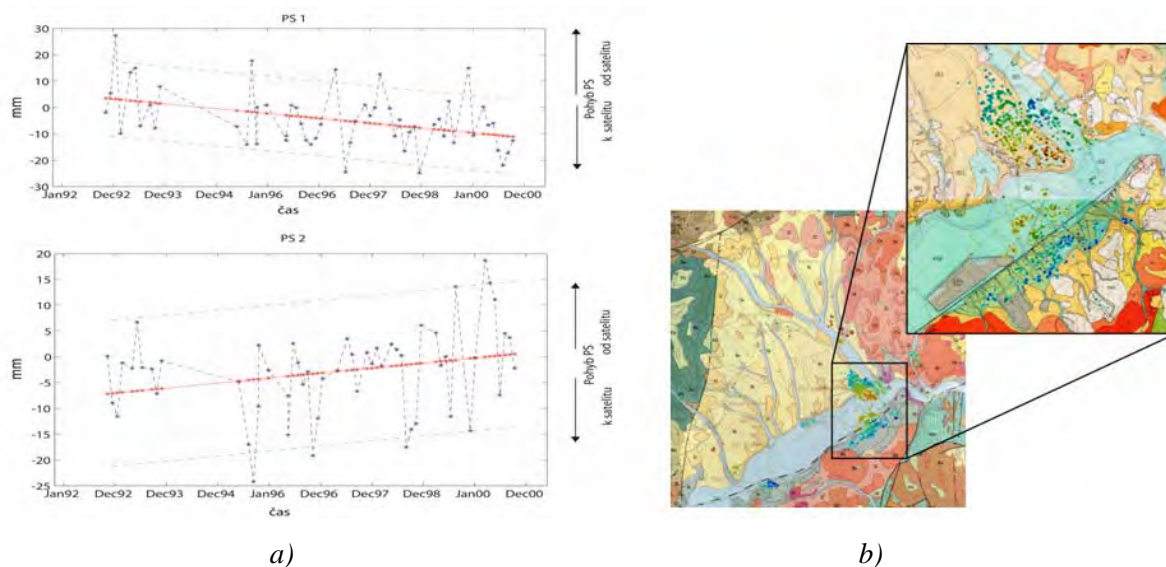


Obr. 2 Výsledok PSInSAR analýzy. Lokalita Žiarska kotlina

Farebná škála jednotlivých PS predstavuje veľkosť priemernej rýchlosti deformácie zemského povrchu v závislosti od LOS (*Line Of Sight*- v osi viditeľnosti lúča) v mm/rok [5]. Priemerná hodnota rýchlosti deformácie smerom k satelitu predstavuje hodnotu -5,7 mm/rok. Priemerná hodnota rýchlosti deformácie smerom od satelitu predstavuje hodnotu 6,8 mm/rok. Na základe získaných výsledkov možno posúdiť, že záujmové územie predstavuje relatívne stabilnú oblasť.

K pohybu jednotlivých bodov mohlo dôjsť v dôsledku subsidencie územia. Ako je vidieť z obr. 3, technológia stálych odrazových bodov môže byť využitá aj ako nástroj pre monitorovanie neotektonickej aktivity rozsiahleho územia. Na „**Obr. 3**“ je ako podkladová mapa zobrazená geologická mapa v mierke 1:50 000, prevzatá z [6]. Na detailnom obraze je vidieť, že v južnej oblasti mesta Žiar nad Hronom prechádza tektonická línia, v dôsledku ktorej dochádza k neotektonickým pohybom zemského povrchu. Deformácia zemského povrchu bola identifikovaná aj využitím technológie PSInSAR. Zhodnoteniu stability tejto

časti územia, ako aj osvetleniu niektorých zatiaľ nie je celkom jasne interpretovaných javov a presnému odhaleniu technologických obmedzení bude venovaný ďalší výskum.



Obr. 3 Priebeh vývoja deformácie PS 1 a 2 v čase a ich geografická poloha, mapa prevzatá z [6]

Záver

Aby bolo možné považovať technológiu PSInSAR spracovanú pomocou nekomerčných softvérov za dôveryhodnú metódu monitorovania, je potrebné údaje porovnať s konvenčnými metódami monitorovania deformácií zemského povrchu.

Predložený príspevok sa zaoberá využitím satelitnej radarovej interferometrie a technológie stálych odrazových bodov na odhalenie rôznych deformácií zemského povrchu. Modelové územie, Žiarska kotlina, bolo pre realizáciu výskumu vybrané z dôvodu známeho výskytu rôznych geodynamických javov ovplyvňujúcich stabilitu danej oblasti.

Z hľadiska neotektonickej aktivity spadá hodnotené územie v podsústave Západných Karpát, negatívnych jednotiek (medzihorské kotliny) do bloku s tendenciou stredného poklesu. Podľa STN 73 0036, príloha A.2 „Seizmotektonická mapa Slovenska“, sa hodnotené územie nachádza v oblasti, kde sa v historicky známom období vyskytla intenzita zemetrasenia 7^o makroseizmickej aktivity MSK-64. Podľa Atlasu krajiny SR (2002) je seizmické ohrozenie v hodnotách makroseizmickej intenzity v oblasti 7^oMSK-64 a v hodnotách špičkového zrýchlenia na skalnom podloží 1,00 – 1,29 m.s⁻², čo je o jeden stupeň viac ako je stred 7-stupňovej škály hodnotiacej územie SR [7].

Na základe porovnania výsledkov získaných z vyhodnotenia historickej analýzy satelitných snímok a porovnania voľne dostupných údajov, možno potvrdiť, že spracovanie a vyhodnotenie PSInSAR technológie pomocou nekomerčných softvérov možno považovať za veľmi presnú a dôveryhodnú metódu monitorovania rozličných prejavov deformácií zemského povrchu.

Pod'akovanie

Práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0330-10.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Fattahi, M.J.V. Zoej, M. Dehghani. (2006) [Citované: 26. február 2013], InSAR Application in Geohazards.
<http://www.gisdevelopment.net/proceedings/mapmiddleeast/2006/poster/mm06pos_60.htm>
- [2] Colesanti C., Farina. P. (2003) Engineering Geology 68(1-2), s 3-14.
- [3] Hooper, A. J.,(2006) Persistent scatterer radar interferometry for crustal deformation studies and modeling of volcanic deformation, Ph.D. thesis, Stanford University.
- [4] Treuropa, [Citované:26. február 2013]
<http://www.treuropa.com/insar/geometry/gallery_viewing_geometry>
- [5] Kampes, B. (2006) Radar Interferometry, Persistent Scatterer Technique. German Aerospace Center Germany, Springer, SBN-10 1-4020-4576-X (HB).
- [6] Konečný, L., Lexa, J., (1984) Geological map of the central Slovakia neogene volcanic field, Geologický ústav Dionýza Štúra, 1984
- [7] Dušička, P., Čubánová, L., (2009) [Citované: 16.6.2013], Malá vodná elektrárň na Hrone v lokalite Hliník nad Hronom, Slovenská technická univerzita v Bratislave.
< http://kstempo.wbl.sk/zamer_eia_-_hlinik_nad_hronom_hotovo.pdf>

Charakterizácia vplyvu mletia a ultrazvuku na zmenu štruktúry a technologických vlastností mastenca

Vladimír Čavajda¹, Peter Uhlík¹, Jana Madejová²

¹*Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Katedra ložiskovej geológie, Mlynská Dolina, 842 15 Bratislava, cavajda@fns.uniba.sk*

²*Ústav anorganickej chémie, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, Bratislava,*

Abstrakt

The main topic of presented results is characterization of talc material. Qualitative parameters of talc are mainly reflected in their crystal-chemical properties, in a particle size distribution and also different (usually harmful) ingredients. Due to the significant inventory of talc in the Slovak Republic is required to characterize the material quality compared with other deposits worldwide and to find suitable areas of application. Research is focused on the characteristics of different fractions talc raw materials and identify their possible differences after sonication and milling. The main methods used were XRD, IR spectroscopy and Scanning electron microscope. Prolonged stand-alone milling may causes aggregation of talc particles. However, the sonication can delaminate crystals while preserving their structure. This behavior can be important in nanocomposites, where shape of filling material (talc) has major influence on nanocomposite properties.

Kľúčové slová: *mastenec; nanokompozity; sonifikácia; mletie; delaminácia; amorfizácia*

Úvod a formulácia cieľa

Cieľom nášho výskumu bolo charakterizovať vlastnosti rôznych frakcií pôvodného mastenca, určiť vplyv mletia a ultrazvuku na štruktúru a technologické vlastnosti mastencov. Kvalitatívne vlastnosti mastenca sú prepojené hlavne s jeho kryštalo-chemickými parametrami, s distribúciou a veľkosťou častíc a taktiež aj obsahom (zväčša škodlivých) prímiesí. V súčasnej dobe dochádza k zvýšenému využívaniu mastencovej suroviny v nových odvetviach priemyslu (napr. nanokompozity), kde mastenec prichádza do úvahy ako plnidlo. Mechanické vlastnosti rôznych nanokompozitov sú závislé od typu plnidla, pričom nanokompozit obsahujúci plnidlo doštičkovitého tvaru má väčšiu tuhosť a odolnosť voči tečeniu ako plnidlá guľovitého tvaru [1]. Vlastnosti plnidla sa však môžu meniť aj od rôznej veľkosti kryštálov (napr. merný povrch, intenzita náboja a pod.). Je predpoklad, že sonifikácia spôsobuje delamináciu kryštálov mastenca pri zachovaní ich kryštálovej štruktúry [2].

Materiál a metódy

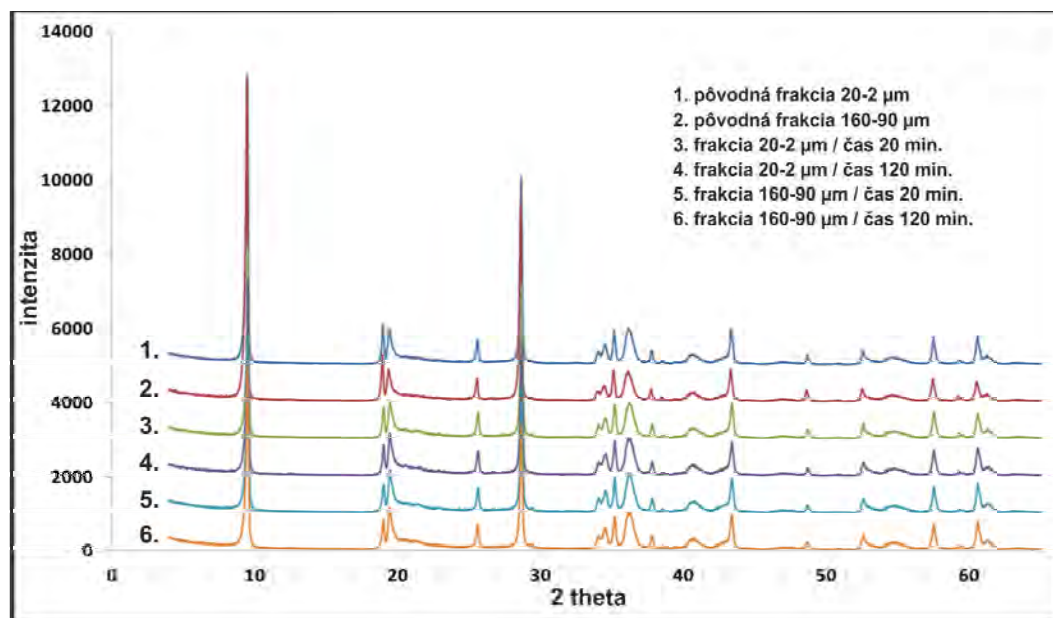
Na experiment sa použila základná vzorka po primárnej homogenizácii v guľovom mlyne (čas mletia: 10 min., otáčky: 470 ot./min.) Na úpravu mastenca sa použili dve metódy: mletie (jedno pozičný planetárny (guľový) mlyn „pulverisette 6“ FRITSCH) a sonifikácia

(ponorný ultrazvuk B.Braun LABSONIC L).

V rámci charakterizácie a sledovania zmien mastencovej suroviny boli použité nasledovné metódy. Na základnú charakteristiku pôvodného materiálu a sledovanie zmeny kryštálovej štruktúry po rôznych stupňoch úpravy bola použitá Röntgenová (rtg.) analýza (RTG difraktometer Philips 1710). Na získanie údajov o veľkosti a tvare mastencových kryštálov bola použitá Riadkovacia elektrónová mikroskopia (SEM) (JEOL JXA-840A) a taktiež laserové meranie veľkosti častíc (LDM) (Fritsch ANALYSETTE 22). Na získanie informácií o zmene v štruktúre a chemickom zložení jednotlivých frakcií mastenca ako aj o zmenách pred a po úprave pomocou ultrazvuku a mletia bola použitá infračervená spektroskopia (FT-IR Nicolet MAGNA 750).

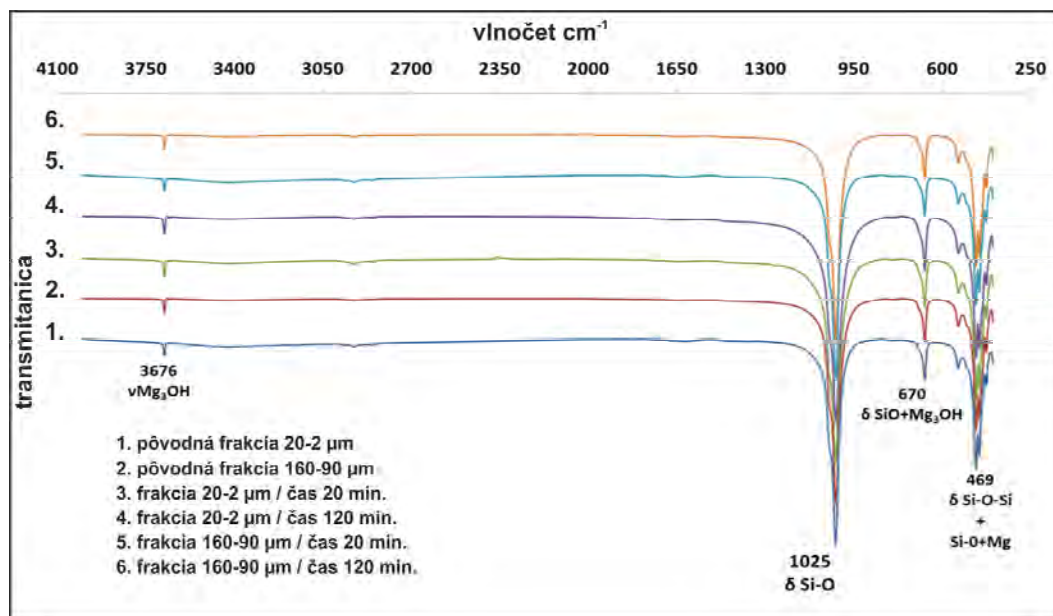
Výsledky a diskusia

Výsledky porovnania mletia a sonifikácie na vzorkách mastenca z ložiska Gemerská Poloma poukazujú na značné rozdiely medzi týmito dvoma metódami. Záznamy z RTG difrakcie (**Obr. 1**) ukazujú, že sonifikácia produkuje jemný pokles v intenzite ako aj jemné rozšírenie reflexov, čo môže byť spôsobené zmenšením veľkosti kryštalitov, avšak mastenec si zachoval svoju kryštalickú podobu. Podobné výsledky boli dosiahnuté aj v práci [3].



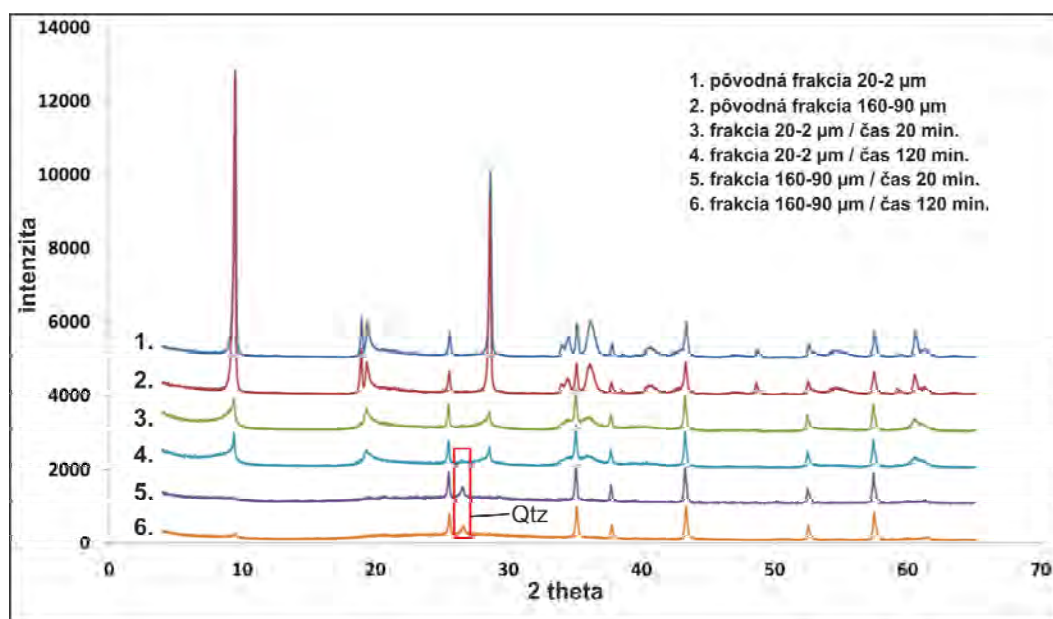
Obr. 1. RTG záznamy mastenca pred úpravou a po 20 resp. 120 minútach sonifikácie.

Spektrá z infračervenej spektroskopie (**Obr. 2**) sú takmer bez zmeny a potvrdzujú fakt, že po sonifikácií je kryštálová sústava mastenca stále zachovaná.



Obr. 2: Infračervené spektrá mastenca pred úpravou a po 20 resp. 120 minútach sonifikácie

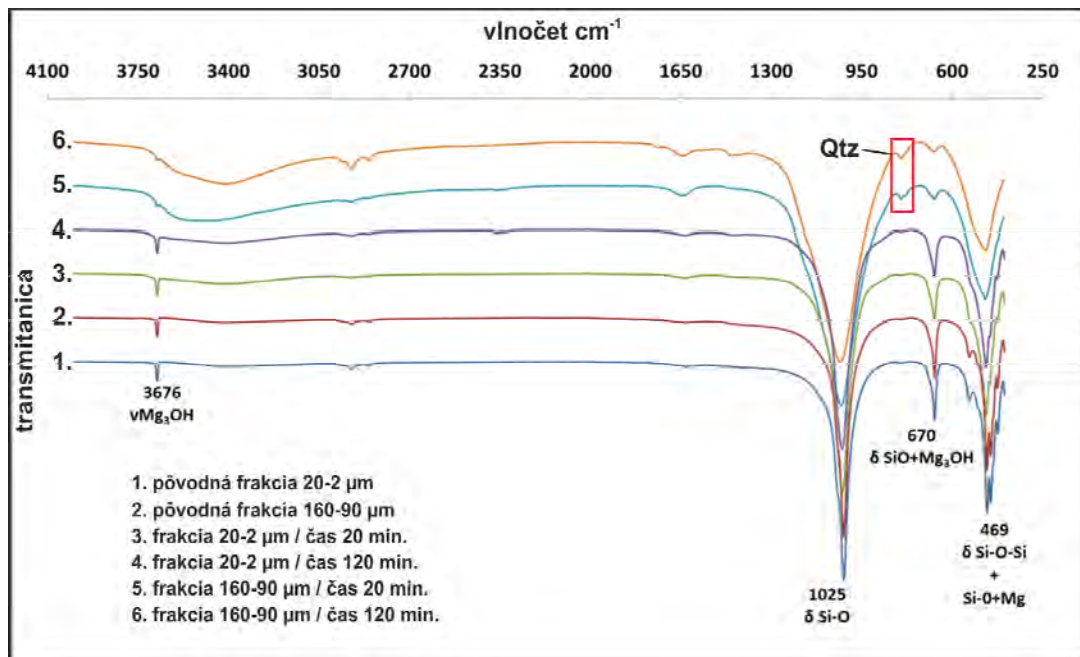
Oproti tomu RTG záznamy po mletí (**Obr. 3**) naznačujú progresívnu stratu štruktúry a následnú amorfizáciu kryštálov mastenca už po 20 min. mletia. Taktiež znižovanie koherentne difraktujúcich domén môže naznačovať postupnú delamináciu kryštálov [4].



Obr. 3: RTG záznamy mastenca pred úpravou a po 20 resp. 120 minútach mletia.

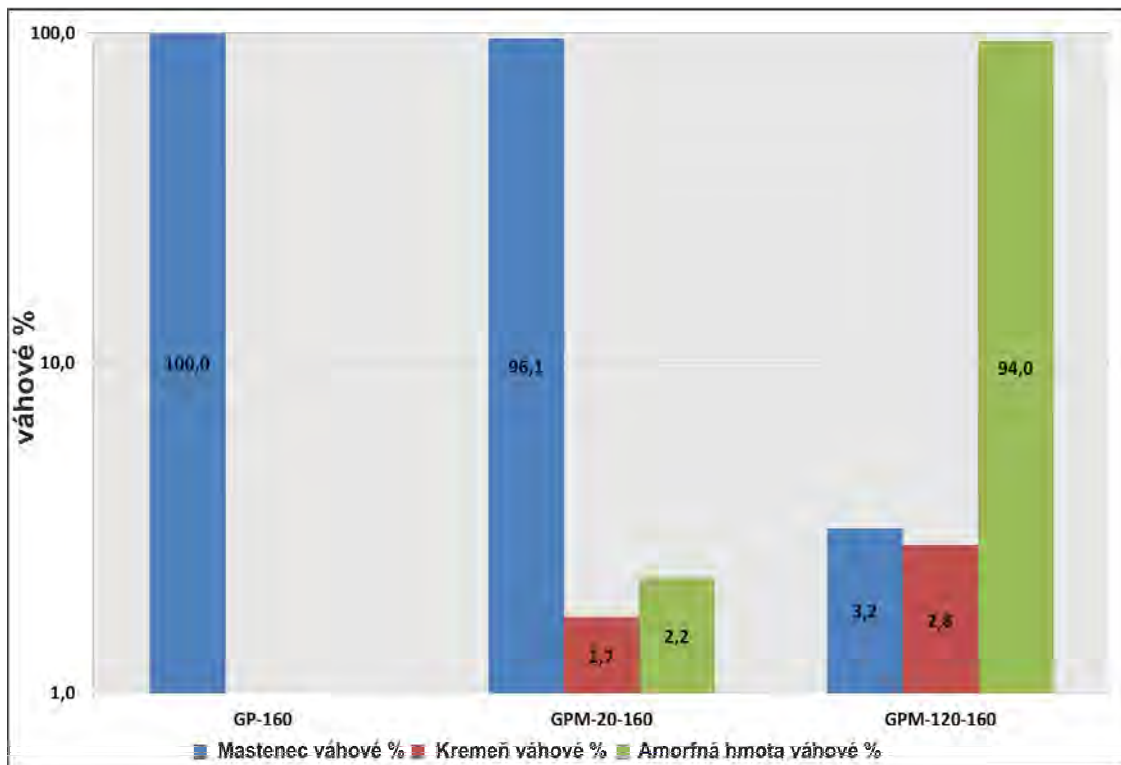
Rozširovanie Si-O deformačného pásu pri vlnočte 1025 cm^{-1} a taktiež zvýšenie obsahu vody pri vlnočte 3420 cm^{-1} podáva informáciu o amorfizácii mastencových kryštálov po procese mletia (**Obr. 4**). Po 120 minútach OH - deformačný pás klesol, čo naznačuje deštrukciu O-H štruktúry a uvoľňovanie Mg z oktaedrov. RTG difrakcia ako aj IČ spektroskopia odhalili prítomnosť kremeňa po 120 minútach mletia (**Obr. 3, 4**), ktorý nebol

identifikovaný v počiatočnej frakcii ani po 20 minútach mletia.

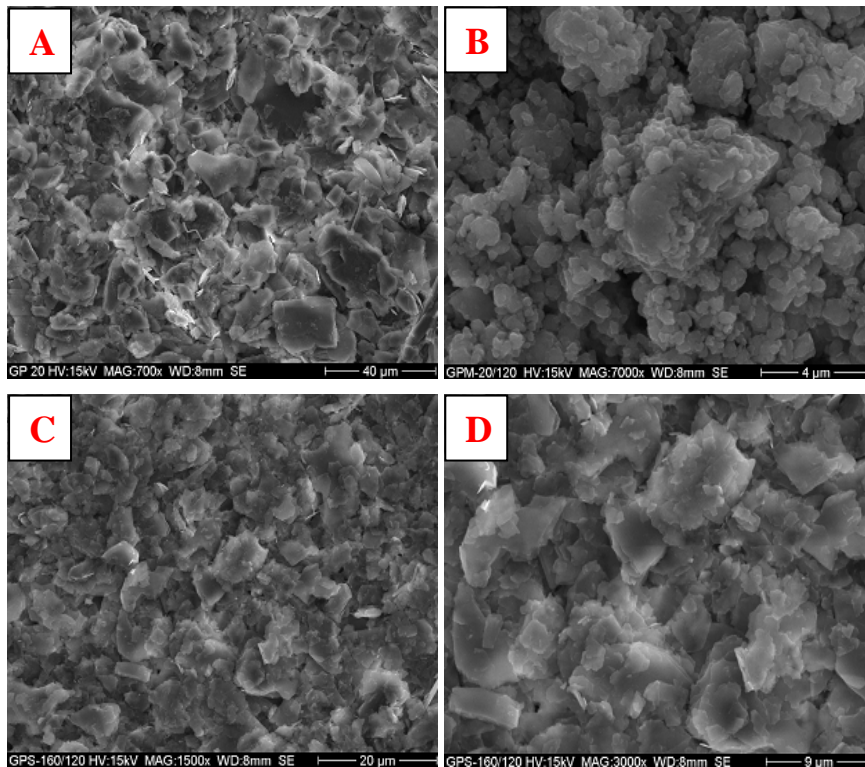


Obr. 4: Infračervené spektrá masťenca pred úpravou a po 20 resp. 120 minútach mletia.

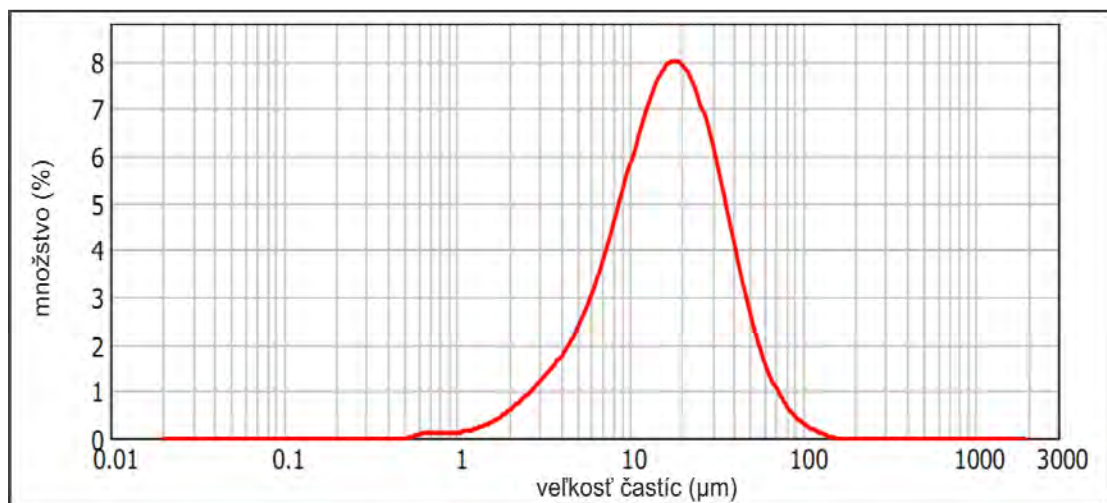
Mletie masťenca vedie k amorfizácii masťencových kryštálov (**Obr. 5**) a taktiež sa začal prejavovať proces reagregácie (**Obr. 6a, 6b**) podobne ako v práci [6]. Sonifikácia po 120 minútach spôsobuje delamináciu masťencových kryštálov bez zásadného vplyvu na kryštálovú štruktúru (**Obr. 6c, 6d**).



Obr. 5: Narastanie amorfnej hmoty pri zvyšujúcich sa časoch mletia (frakcia 160-90μm). Časy:0, 20, 120 min.



Obr. 6: A) Kryštály mastenca pred úpravou (frakcia 20-2 μm). B) Kryštály mastenca po 120 minútach mletia (frakcia 20-2 μm). C) Kryštály mastenca po 120 minútach sonifikácie (frakcia 160-20 μm). D) Detail kryštálov mastenca po 120 minútach sonifikácie (frakcia 160-20 μm).



Obr. 7: Priemerná veľkosť kryštálov mastenca (5 meraní).

Veľkosť kryštálov sa pri sonifikácií zásadne nezmenila (**Obr. 7**). Predpokladá sa že pri dlhších časoch by sa mala veľkosť znižovať resp. by sa mal prejavovať aj proces reagácie kryštálov [6].

Záver

Na základe našich výsledkov môžeme zhodnotiť, že mletie mastenca vedie k zvýšenej amorfizácii a k štruktúrnym poruchám, zatiaľ čo sonifikácia vedie iba k zníženiu veľkosti

kryštálov a štruktúra je prakticky zachovaná bez akýchkoľvek viditeľných zmien. Môžeme povedať, že metóda sonifikácie môže byť viac vhodná vo využití v nanotechnológiách, pretože je schopná delaminovať kryštály mastenca. V nanomateriáloch hrá delaminácia dôležitú úlohu, pretože práve mastenec môže byť využitý ako plnidlo, kvôli jeho doštičkovitým kryštálom.

Pod'akovanie

Práca bola podporená grantom UK č.344/2012.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Zhou X P, Xie X L, Yu Z Z, Mai Y-W. (2007) *Polymer*, 48 (12), p. 3555
- [2] Jamil, N. H., Palaniandy, S. (2010) *Powder Technology*, 200 (1-2), p. 87
- [3] Pérez-Maqueda, L.A., Franco, F., Pérez-Rodríguez, J.L. (2005) *Journal of the European Ceramic Society*, 25 (9), p. 1463
- [4] Christidis, G.E., Makri, P., Perdikatsis, V. (2004) *Clay Minerals*, 39 (2), p. 163
- [5] Dellisanti, F., Valdré, G, Mondonico, M. (2009) *Applied Clay Science*, 42 (3-4), p. 398
- [6] Pérez-Maqueda, L.A., Duran, A., Pérez-Rodríguez, J.L. (2005) *Applied Clay Science*, 28 (1-4), p. 245

Faunistické spoločenstvo z Prepoštskej jaskyne v čase prítomnosti neandertálcov

Tomáš Čeklovský

Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra geológie a paleontológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko; ceklovsky@fns.uniba.sk

Abstrakt

Submitted thesis presents recent results of a new study of faunal remains from the Prepoštská Cave, the Middle Palaeolithic site from the Horná Nitra region. Preliminary results document a Neanderthal game during the Late Mousterian. The faunal analysis is focused on the fossil record from the Mousterian layer from BARTA's pit III collected in 1967. The last dating by ^{14}C method places this settlement to the period before 40,000 BP. The assemblage is dominated by large-bodied ungulates with quite surprising large number of bird bones. Based on the taxonomic determination of findings and the sedimentary record, found taxa represent an interstadial assemblage from the Late Pleistocene period (the Last Glacial), which probably lived in an open/forest-steppe environment with the presence of water source (a travertine lake – travertine spring, waterhole) in the vicinity. Marks of human activity and the activity of predators were found on the bones. Settlements of Neanderthals took a short-term period and the cave served as a hyena den during the man absence.

KLúčové slová: *Prepoštská jaskyňa; faunistické spoločenstvo; taxonómia, tafonómia; vislan*

Úvod a formulácia cieľa

Biologická diverzita sa v období mladého pleistocénu (120 000 – 11 200 BP; MIS 5e-2) výrazne menila v závislosti na klimatických zmenách a ekologických podmienkach, ktorých odrazom v terestrickom prostredí sú zistené rozdiely v zložení fosílnych spoločenstiev v jednotlivých fázach predmetného obdobia. Slovensko už v strednom paleolite (stredná fáza staršej doby kamennej) osídlili prví známi obyvatelia – pravekí ľudia neandertálskeho typu. K hlavným zdrojom obživy neandertálcov patril lov, ktorý v moustérienskej kultúre (archeologická kultúra spájaná s neandertálcami) už predstavuje organizovanú záležitosť. Z dosiaľ známych stredopaleolitických nálezísk na Slovensku prevládajú sídliská v jaskyniach, pod skalnými prevismi alebo na travertínových kopách v okolí prameňoch minerálnych vôd.

Prepoštská jaskyňa (Bojnice I) reprezentuje jedno z dvoch zachytených neandertálskych osídlení na území Bojnického zámku pri Prievidzi (48°46' S 18°34' V) a patrí medzi najdôležitejšie paleolitické lokality na Slovensku. Objavil ju K. MEDVECKÝ v roku 1926 [1]. Lokalitu tvorí v podstate mohutný jaskynný previs (abri), prechádzajúci do 8 m dlhého, 11 m širokého a 4–8 m vysokého jaskynného priestoru [2] s otvorom v nadmorskej

výške 276 m n. m. Ide o stalaktitovú jaskyňu, na strmom svahu na východnom zakončení travertínovej kopy, na ktorej stojí prepoštský dom.



Obr. 1 Situovanie Prepoštskej jaskyne na výseku mapy.

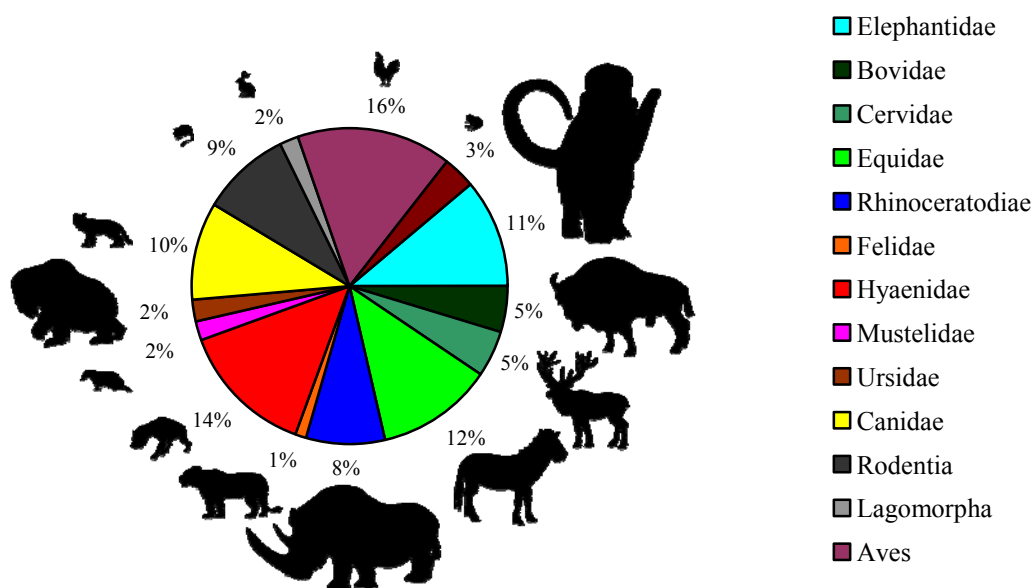
Stav riešenia skúmanej problematiky na predmetnom území je v súčasnosti založený len na základe informácií z archeologického výskumu, pochádzajúcich predovšetkým z 50. až 60. rokov minulého storočia [2, 3, 4]. Pre presné definovanie vývoja kvartérnej prírody a krajiny na našom území v čase prítomnosti neandertálcov sú hlavné ciele práce zamerané predovšetkým na vyhodnotenie paleontologických nálezov na vybranej neandertálskej lokalite (Bojnice I) a v jej okolí ako z taxonomického (rodová a druhová diverzita organizmov ako odraz klimatických zmien a ekologických podmienok počas mladého pleistocénu), tak aj z tafonomického (determinácia organických aj anorganických tafonomických činiteľov) hľadiska.

Materiál a metódy

Pri spracovávaní študijného materiálu sa použili tieto metódy:

1. morfometrická analýza – vyjadrenie obrazu o medzidruhovej variabilite na základe určenia základných morfologických znakov a meraní zubov a osteologického materiálu;
2. tafonomická analýza – procesy a zákonitosti pôsobiace na zvyšky organizmu od smrti až do okamihu jeho objavenia, resp. do chvíle, keď sa stáva predmetom vedeckého záujmu (fragmentácia, ohrýzanie inými zvieratami, abrázia, sedimentácia, farba) [5].
3. štatistická analýza – porovnanie zisteného spoločenstva s nálezmi z obdobných lokalít na Slovensku a v Európe.

Zo skúmanej lokality bolo k aprílu 2013 preštudovaných 555 fosilných zvyškov z BÁRTOVEJ sondy III. Analýza preukázala pomerne veľkú diverzitu zisteného faunistického spoločenstva, pozostávajúceho zo žiab (*Anura* indet.), vtákov (*Asio* cf. *otus*, *Asio flammeus*, Falconiformes indet., *Lyrurus tetrrix*, *Lagopus lagopus*, *Bucephala clangula*, *Anas platyrhynchos*, Aves indet.), dvojitozubcov (*Lepus* sp., cf. *Ochotona* sp.), hlodavcov (*Arvicola terrestris*, *Microtus* cf. *agrestis-arvalis*, Rodentia indet.), psovitých (*Canis lupus*, *C.* cf. *lupus-latrans*, *Vulpes* sp., *V.* cf. *lagopus*), medveďovitých (*Ursus* ex gr. *spelaeus*, *U.* sp.) a lasicovitých mäsožravcov (cf. *Gulo gulo*, *Martes* sp., Mustelidae indet.), hyeny jaskynnej (*Crocota crocuta spelaea*), leva jaskynného (*Panthera spelaea*), nosorožca srstnatého (*Coelodonta antiquitatis*), koňa stepného (*Equus ferus* cf. *germanicus*), jeleňovitých (*Rangifer tarandus*, cf. *Megaceros giganteus*, Cervidae indet.) a turovitých (*Bos primigenius* / *Bison priscus* – *B. bonasus*, Bovidae indet.) párnokopytníkov, ako aj mamuta srstnatého (*Mammuthus primigenius*) (obr. 2).



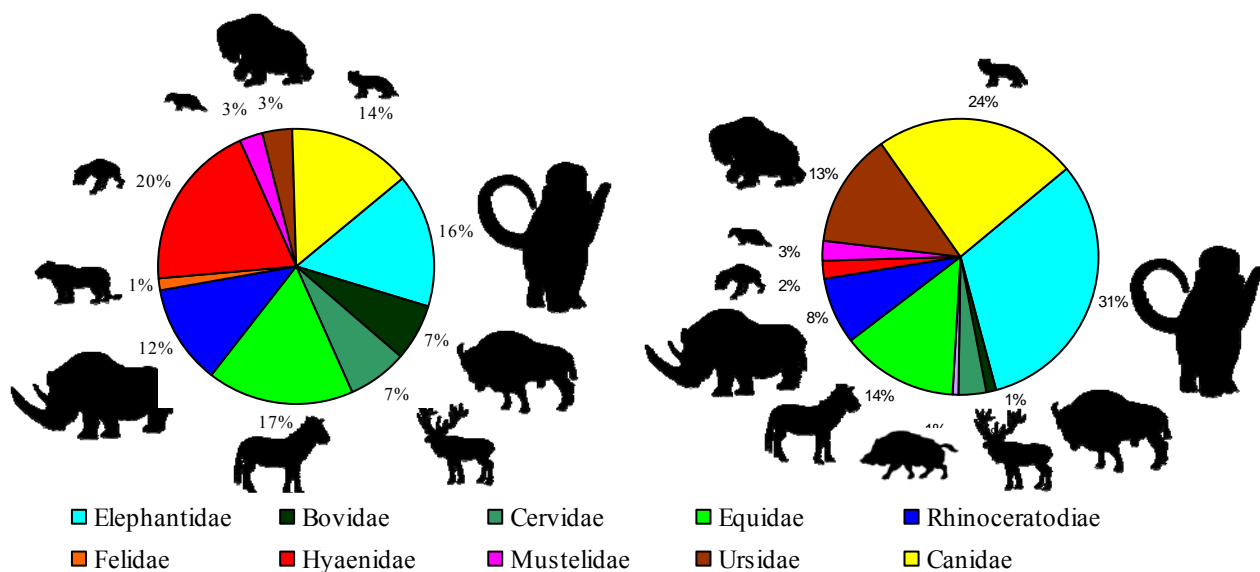
Obr. 2 Zistené fosilné spoločenstvo z Prepoštskej jaskyne – BARTOVA sonda III podľa celkového počtu určených kostí / fragmentov (NISP).

Výsledky a diskusia

Posledné datovanie pomocou metódy ^{14}C umiestnilo osídlenie Prepoštskej jaskyne do obdobia pred viac ako 40 000 rokov BP, odpovedajúc tak moravským lokalitám Kůlna (vrstva 7a,b) a Šipka (vrstva III, IV) z micoquieniu [6].

V spoločenstve z Prepoštskej jaskyne dominujú veľké cicavce (mamut, veľké kopytníky, medveď jaskynný) a stredne veľké cicavce (sob, mäsožravce), malé cicavce (hlodavce, dvojitozubce) sa vyskytujú menej a prekvapivý je výskyt pomerne veľkého

množstva vtáčích kostí. Fosilné spoločenstvo z Prepoštskej jaskyne bolo porovnané s faunou z francúzskych lokalít Harregi [7] a Gatzarria [8], poľskej lokality Raj [9] a maďarskej „open site“ lokality Tata [10]. Lokality predstavujú sídliská neandertálcov z obdobia stredného paleolitu. Grafy (obr. 3) vyobrazujú stredne veľké a veľké cicavce, ktoré sa považujú za hlavnú lovnú zver neandertálcov. Zloženie faunistického spoločenstva zo študovanej lokality sa najviac blíži tomu, ktoré bolo zistené na maďarskej lokalite Tata. Jediný rozdiel je v pomernom zastúpení fosílií hyeny jaskynnej, ktoré viac dominujú na slovenskom nálezisku, ako aj v dosiaľ nezistenej prítomnosti zástupcov čeľade Suidae (Bojnice I) či Felidae (Tata).



Obr. 3 Porovnanie zisteného fosilného spoločenstva podľa celkového počtu určených kostí / fragmentov (NISP).
a – Prepoštská jaskyňa – BÁRTOVA sonda III, b – Tata.

Na kostiach boli zistené perimortálne a postmortálne zásahy. Ľudská aktivita je dokumentovaná stopami po nástrojoch – stopy po úderoch nástrojmi (rozbíjanie, pozdĺžne lomy, štiepenie, tlčenie, zárezy), a to na kostiach mamutov, veľkých kopytníkov a vlkov ako aj spálenými polámanými kosťami, ktoré boli spaľované pri teplote 300 až 400 °C. Neandertálci odrezávali z kostí časti mäsa a zámerne rozbíjali dlhé kosti za účelom získania kostnej drene (špiku). Spálenie kostí dokazuje, že mäso si mohli aj čiastočne tepelne upravovať. Stopy po predátoroch (resp. zdochlinožravcoch) sú dokumentované v podobe stôp po zuboch, ohryzoch, odhryznutí a drvení najmä na kostiach pochádzajúcich z líšiek, medveďov, lasicovitých, ale aj väčších kopytníkov. Hlavným pôvodcom týchto stôp sú pravdepodobne hyeny, hoci nie je vylúčená ani aktivita iných mäsožravcov (napr. vlkov).

Nános sedimentu a sintra na povrchu kostí ako aj v ich dutinách je dobrým

ukazovateľom pôvodnej akumulácie a fosilizácie kostí v jaskyni. To, že sú kosti posintrované (resp. pokryté vrstvou sintra) svedčí o tom, že kosti museli istý čas ležať na povrchu. Navyše sa sinter tvorí len za istých klimatických podmienok, najmä v teplejších a vlhkejších obdobiach. Z uvedeného vyplýva, že skúmané spoločenstvo z Prepoštskej jaskyne žilo pravdepodobne v niektorom z miernejších období interštadiálneho charakteru počas posledného glaciálu, čo potvrdzuje aj posledné datovanie.

Na základe vyššie uvedeného je možné predpokladať, že Prepoštská jaskyňa je travertínovou lokalitou z obdobia posledného glaciálu. Predchádzajúcim výskumom sa zistilo, že pod jaskynným previsom sa pôvodne nachádzalo jazierko s vodným rastlinstvom. Keď sa močarina vysušila a travertín spevnil, stalo sa toto miesto vhodným na osídlenie [4]. Táborisko bolo založené na sypkom a miestami až pevnom travertíne v pomerne teplej fáze posledného glaciálu, čo potvrdzuje aj rozbor fauny, keď sa popri zvyškoch stepnej až lesostepnej megafauny našli aj fosílie hlodavcov (*Arvicola terrestris* a *Microtus agrestis-arvalis*), indikujúce skôr mierne klimatické podmienky interštadiálov ako chladnú klímu štadiálov. Spolu s kamennými nástrojmi sa v nálezovej vrstve našli aj uhľíky a spálené i nespálené zvieracie kosti. Nálezy zvieracích kostí svedčia o tom, že lovci lovili malé i veľké druhy cicavcov (mamuty, kopytníky, vlky), ktoré sa chodili napájať k rieke Nitre a Handlovke alebo priamo k neďalekému travertínovému napájadlu, ktoré mohlo v tom čase ešte existovať. Prepoštská jaskyňa bola veľmi vhodným obydľím pre neandertálcu aj k trvalejšiemu pobytu, hoci pravdepodobne v tom čase nebola jediným miestom, ktoré bolo osídlené.

Záver

V spoločenstve dominujú veľké kopytníky, sprevádzané mamutom srstnatým, hyenou jaskynnou a psovitémi mäsožravcami, s prekvapivým pomerne veľkým množstvom vtáčích kostí. Ojedinele sa vyskytuje lev jaskynný, medveď jaskynný, lasicovité mäsožravce a dvojitozubce, sprevádzané hlodavcami a žabami. Na základe taxonomickej determinácie nálezov a sedimentárneho záznamu reprezentujú zistené taxóny z Prepoštskej jaskyne spoločenstvo interštadiálneho charakteru z obdobia posledného glaciálu, ktoré žilo pravdepodobne v otvorenom až lesostepnom prostredí s prítomnosťou vodného zdroja (travertínové jazierko, resp. travertínový prameň, napájadlo) v blízkom okolí. Na kostiach boli zistené perimortálne a postmortálne zásahy spôsobené ľudskou aktivitou a predátormi. Predbežná tafonomická analýza naznačuje, že ľudia boli pravdepodobne primárnymi akumulátormi kostí. Celkový obraz sa opakuje aj na iných moustérienských lokalitách na

Slovensku, či v Európe. Lokálne neandertálske populácie existovali v pomerne malých skupinách. Osídlenia neandertálcami boli krátkodobé a v období neprítomnosti človeka jaskyňa slúžila ako hyení brloh.

Pod'akovanie

Táto práca vznikla vďaka finančnej podpore Ministerstva školstva Slovenskej republiky (grant Vega 1/0396/12). Pod'akovanie tiež patrí ing. Jánovi Obuchovi, PhD. za pomoc pri určovaní vtáčích kostí a doc. Mgr. Martinovi Sabolovi, PhD. za jeho odborné vedenie, pripomienky a cenné rady pri písaní práce.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Medvecký, K. A. (1927) XXI. Sborník Muzeálnej slovenskej spoločnosti, Paleolitická jaskyňa v Bojniciach, Martin, SR, p. 109
- [2] Prošek, F. (1952) IV. Archeologické rozhledy, Výskum Prepoštské jeskyně v Bojnicih r. 1950, , SAÚ, Praha, ČR, p. 3
- [3] Hokr, Z. (1951) XXVI. Věstník ústředního ústavu geologického, Výsledky paleoosteologických výskumů v ČSR za rok 1950, Praha, ČR, p. 35
- [4] Bárta, J. (1972) Pravek Bojnic: od staršej doby kamennej po dobu Slovanskú. Vydavateľstvo obzor, Bratislava, p. 13
- [5] Thurzo, M., Beňuš R. (2005) Základy tafonómie hominidov a iných stavovcov. Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Bratislava, p. 7
- [6] Kaminská, E., Neruda, P. (2010) 16. Kvartér 2010 – Sborník abstraktů. Revízne spracovanie paleolitickej industrie z výskumov Prepoštskej jaskynky v Bojniciach I, Brno, ČR, p. 13
- [7] Buruaga, A. S. & Ebrard, D. (2004) El Musteriense de la Cueva de Harregi en Aussurucq, Soule (Excavaciones: Pierre Boucher, 1954-1960), VELEIA, 21, p. 9
- [8] Ready, E. (2012) Neandertal foraging during the late Mousterian in the Pyrenees: New insights based on faunal remains from Gatzarria Cave, J. Archaeolog. Sci., 40, p. 1568
- [9] Kowalski, K. (1972) Folia Quaternaria, 41, p. 45
- [10] Vértes, L. (1964) XIII. Tata. Eine mittelpälolithische Travertin-Siedlung in Ungarn, Archaeologia Hungarica, Budapest, p. 43

Využitie digitálnej fotogrametrie pre štruktúrnu analýzu skalných svahov

Patricia Ekkertová, Kristína Bátorová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra inžinierskej geológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; e-mail: ekkertova@fns.uniba.sk

Abstrakt

The aim of this work was the development of methodology for measuring orientation of discontinuities of rock slopes with terrestrial digital photogrammetry and its verification in use. Selected photos were processed by software Photomodeler Scanner, where a cloud of 3D points was created from pairs of images, which allowed to automatically determine and plot of fractures in the program Split-Fx. Analysis of results allowed to create a graph of optimal distance from the camera position to rock slope to height of slope with showing the boundary distance and optimal distance between the camera positions, for the focal distances 16 and 35 mm.

Kľúčové slová: digitálna fotogrametria, skalný svah, štruktúrna analýza, mračno bodov

Úvod a formulácia cieľa

Pozemná digitálna fotogrametria je čoraz viac používaná ako mapovacia metóda pre zobrazenie morfológie prírodných a umelých skalných svahov v 3D rozmere. Často vyzdvihovanou výhodou tejto metódy, ako aj metódy laserového skenovania [1], je schopnosť prezerat' neprístupné strmé a vysoké skalné steny, znížené riziko pre pracovníkov, vznik trvalého záznamu vlastnosti skalného svahu v určitom čase a možnosť zistenia veľkosti orientácie diskontinuit. Tieto techniky pôsobia ešte atraktívnejšie vďaka metódam, ktoré umožňujú automatické, časovo efektívne rozpoznávanie diskontinuit na 3D modeloch [2,3,4]. Metódy pozemného snímania ponúkajú možnosť merať orientáciu diskontinuit na omnoho väčšej ploche než pri použití geologického kompasu.

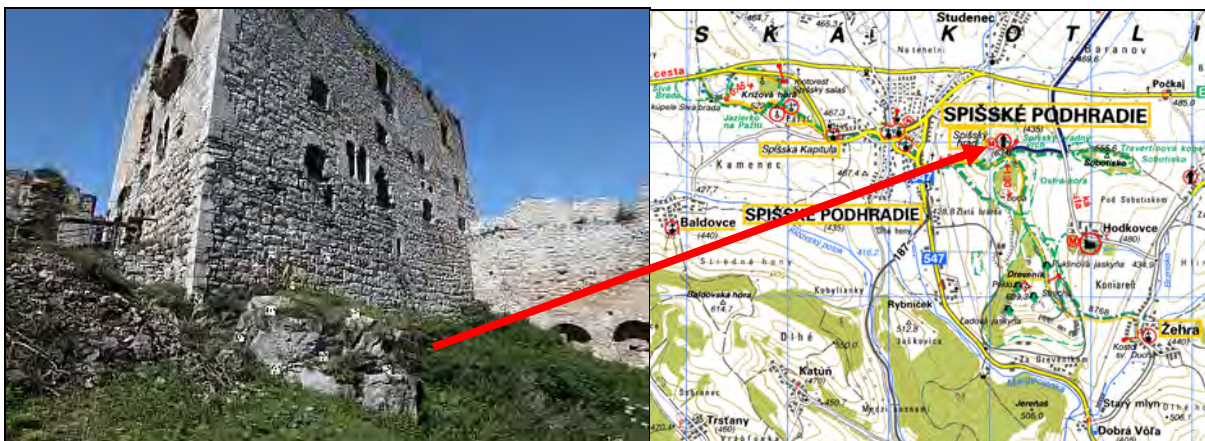
Materiál a metódy

Pre overenie metodického postupu v praxi boli ako modelové lokality pre digitálne snímokovanie vybrané skalný svah v odreze Devínskej cesty neďaleko vodného zdroja Sihot' v Bratislave s výškou približne 7 m „**Obr. 1**“, ďalej skalná stena nachádzajúca sa v podloží Románskeho paláca v severnej časti masívu Spišského hradu s výškou približne 3,5 m „**Obr. 2**“ a skalný svah v areáli uzavretého kameňolomu Srdce na SZ svahu Devínskej Kobyly s výškou približne 5 m „**Obr. 3**“.

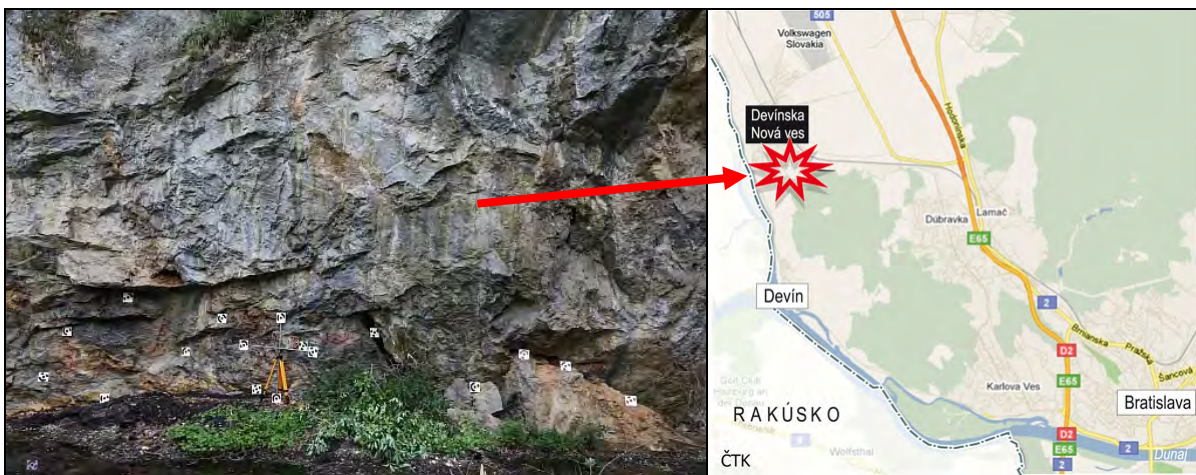
Na snímání skalných svahov bol použitý digitálny fotoaparát Canon EOS 5D Mark II; 21,1 MPix s ohniskovou vzdialenosťou objektívu 16mm a/alebo 35mm.



Obr. 1 Lokalita Devínska cesta [5]



Obr. 2 Lokalita Románsky palác.

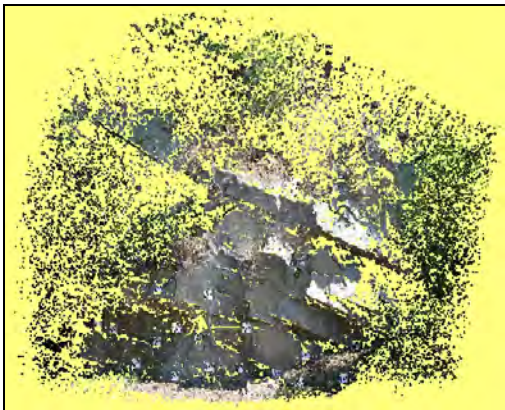


Obr. 3 Lokalita Srdce.

Pred vytvorením snímok, bolo na skalný svah náhodne rozmiestnených dvadsať kódových terčov s veľkosťou 20 x 20 cm, ktoré výrazne urýchľujú spracovanie, pretože umožňujú automatickú identifikáciu totožných bodov na jednotlivých digitálnych snímkach v programe Photomodeler Scanner.

Skalný svah bol snímkaný z viacerých stanovísk, z rôznych vzdialeností a uhlov. Pri snímkovaní bolo nutné zachovať princípy stereofotogrametrie, a to prekrytie jednotlivých dvojíc snímok (ľavej a pravej snímky) pri dodržaní podmienky, že hodnota uhla medzi dvomi snímkami by mala byť v optimálnom rozpätí $10 - 30^\circ$ a pomer b/h , t.j. pomer medzi vzdialenosťou medzi dvomi pozíciami fotoaparátu (b) a vzdialenosťou pozície fotoaparátu od skalného svahu (h) pre danú dvojicu snímok by mal mať hodnotu $0,1 - 0,5$. Výber ohniskovej vzdialenosti priamoúmerne závisel od rozmerov skalného svahu..

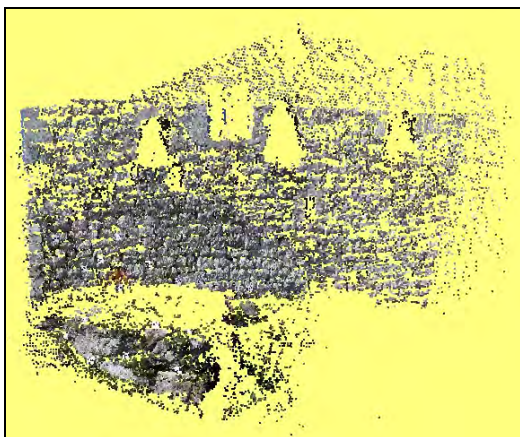
Pri vytváraní mračna 3D bodov boli menené nastavenia parametrov – kroku vzorkovania (sampling rate) a hĺbkového rozsahu (depth range). Krok vzorkovania určoval interval vzorkovania bodov na ploche skalného svahu a hĺbkový rozsah udával v akej vzdialenosti pred a za myšlenou stredovou rovinou skalného svahu má program vytvárať 3D body. Výsledkom spracovania snímok bolo mračno 3D bodov „Obr. 4“ až „Obr. 7“.



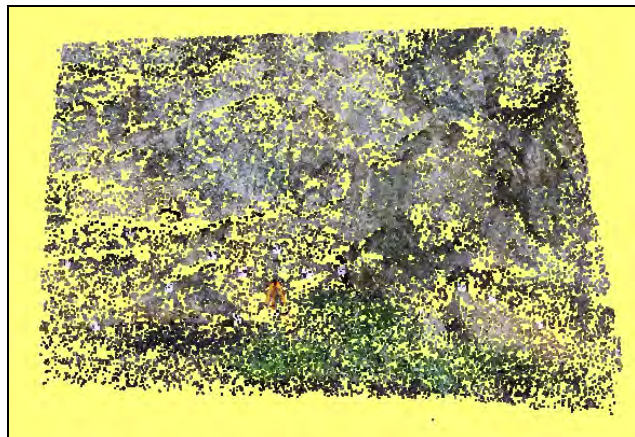
Obr. 4 Mračno 3D bodov – Devínska cesta, ohnisková vzdialenosť 16 mm



Obr. 5 Mračno 3D bodov – Devínska cesta, ohnisková vzdialenosť 35 mm

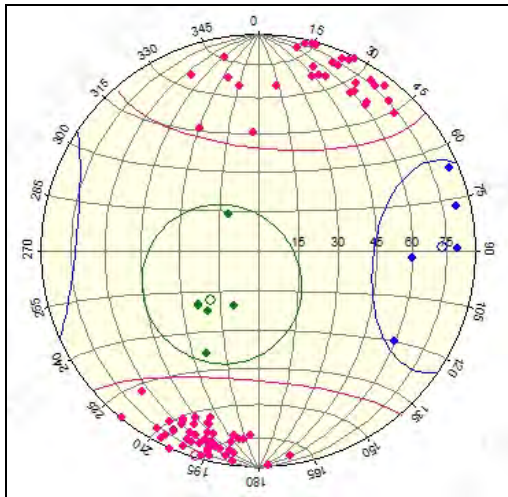


Obr. 6 Mračno 3D bodov – Románsky palác, ohnisková vzdialenosť 16 mm

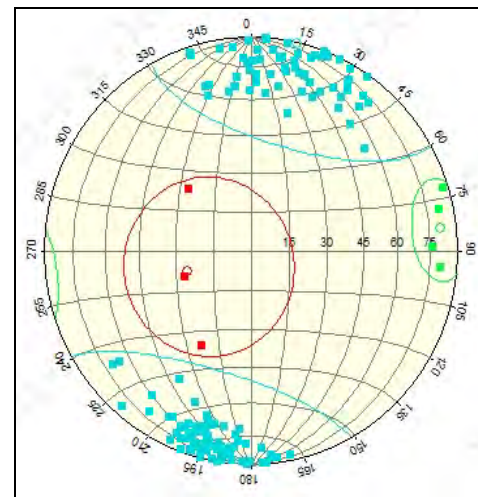


Obr. 7 Mračno 3D bodov – Srdce, ohnisková vzdialenosť 35 mm

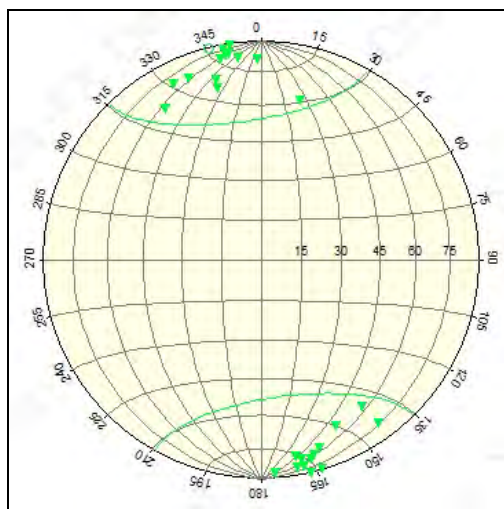
Výsledné mračno bodov bolo vo forme textového súboru importované do softwaru Split-Fx, ktorý umožnil manuálne vyznačenie plôch diskontinuit skalného svahu a následné automatické meranie ich orientácií a zakreslenie do Schmidtovej ekvatoriálnej projekcie „Obr. 8“ až „Obr. 11“.



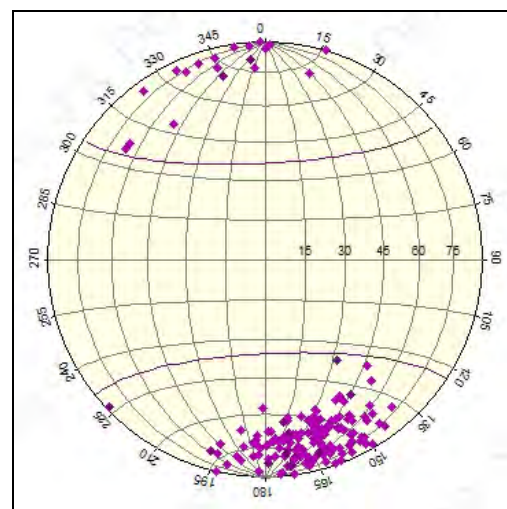
Obr. 8 Schmidtov diagram pólov diskontinuit – Devínska cesta, ohnisková vzdialenosť 16 mm



Obr. 9 Schmidtov diagram pólov diskontinuit – Devínska cesta, ohnisková vzdialenosť 35 mm



Obr. 10 Schmidtov diagram pólov diskontinuit – Románsky palác, ohnisková vzdialenosť 16 mm

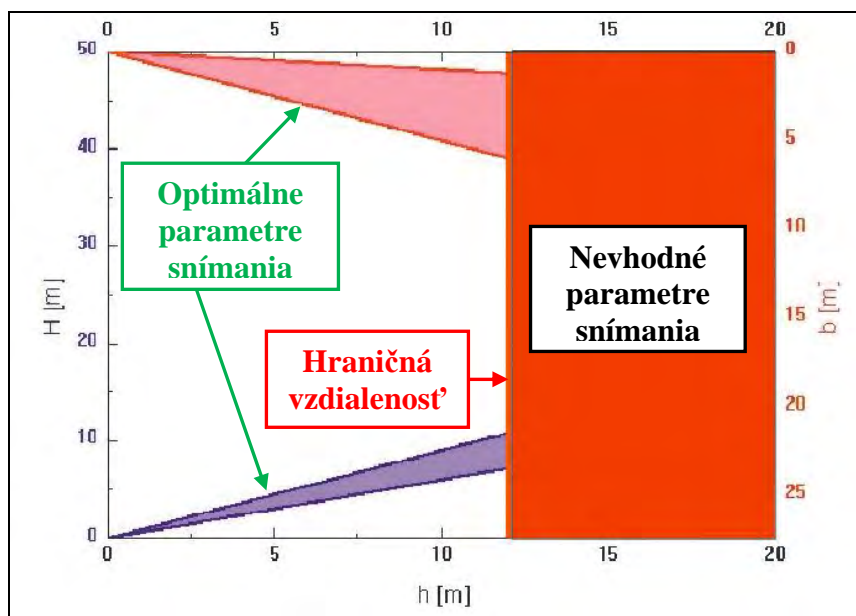


Obr. 11 Schmidtov diagram pólov diskontinuit – Srdce, ohnisková vzdialenosť 35 mm

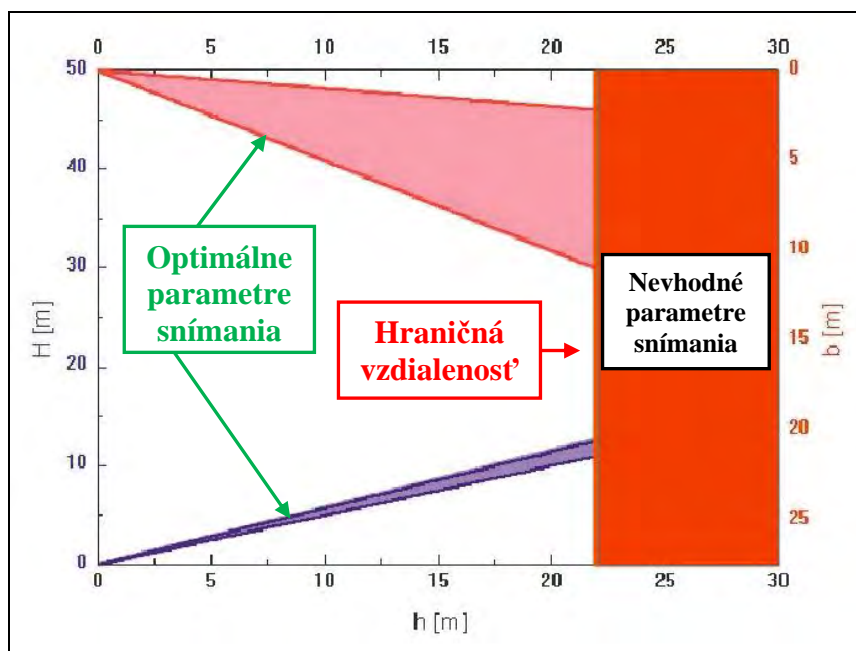
Výsledky a diskusia

Analýzou výsledkov boli zistené optimálne parametre snímkovania skalného svahu, so zameraním sa na určenie optimálnej vzdialenosti pozície fotoaparátu od skalného svahu pre

určité ohniskové vzdialenosti objektívu (16 a 35 mm). Súčasťou analýzy bolo aj zhodnotenie vzťahu medzi pomerom b/h a ohniskovou vzdialenosťou objektívu a zistenie hraničnej vzdialenosti, po prekročení ktorej je veľkosť kódových terčov umiestnených na skalnom svahu dostatočne veľká pre správnu identifikáciu programom Photodeler Scanner „Obr. 12“, „Obr 13“.



Obr. 12 Optimálna vzdialenosť od svahu „ h “ ku výške svahu „ H “ s vyznačenou hraničnou vzdialenosťou a optimálna vzdialenosť medzi pozíciami fotoaparátu „ b “ pre objektív 16 mm.



Obr. 13 Optimálna vzdialenosť od svahu „ h “ ku výške svahu „ H “ s vyznačenou hraničnou vzdialenosťou a optimálna vzdialenosť medzi pozíciami fotoaparátu „ b “ pre objektív 35 mm.

Výsledky práce potvrdili možnosť využitia digitálnej fotogrametrie pri štruktúrnej analýze skalných svahov, za predpokladu dodržania optimálnych parametrov snímkovania skalného svahu. Nevýhodou metódy je menej kvalitný výsledok a dlhší čas potrebný na spracovanie snímok v porovnaní s metódou laserového skenovania a nutnosť dodržania parametrov snímkovania, najmä vzdialenosti pozíciou fotoaparátu a skalným svahom. Nevýhodou je aj závislosť výsledku od morfológie skalného svahu a potreba prispôbiť sa slnečnej intenzite – v prípade slnečného počasia vzniká na spodných plochách diskontinuití. Výhodou metódy je najmä finančná a technická nenáročnosť a dostupnosť.

Pod'akovanie

Výskum bol spolufinancovaný grantom APVV – 0330 – 10 s podporou Vedeckej grantovej agentúry MŠVVaŠ, grant VEGA . 1/0331/09.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Sturzenegger M., Stead D., (2009) Engineering Geology, 106(3), p. 163
- [2] Kemeny, J., Donovan, J., (2005) Ground Engineering 38(11), p. 26 **In:** Sturzenegger M., Stead D., (2009) Engineering Geology, 106(3), 163
- [3] Kemeny, J., Turner, K., Norton, B., (2006) LIDAR for rock mass characterization: hardware, software, accuracy and best – practices. **In:** Tonon, F., Kottenstette, J. (Eds.), Laser and Photogrammetric Methods for Rock Face Characterization, ARMA, p. 49
- [4] Ferrero, A.M., Forlani, G., Roncella, R., Voyat, H.I., (2008) Advanced geostuctural survey methods applied to rock mass characterization. Rock Mechanics and Rock Engineering. doi: 10.1007/s00603-008-0010-4. **In:** Sturzenegger M., Stead D., (2009) Engineering Geology, 106(3), p. 163
- [5] Greif, V., Drotár, T., (2011) Acta Geologica Slovaca, 3(2), p. 163

Metaultramafics in the eclogitic Siegraben complex (Eastern Alps)

Samila Hrvanović, Marián Putiš and Peter Bačík

Comenius University, Faculty of Natural sciences, Department of Mineralogy and Petrology, Mlynská dolina G, 842 15 Bratislava, Slovakia; hvanovic@fns.uniba.sk

Abstract

Metaultramafics of the Middle Austroalpine Siegraben structural complex occur as lenses in eclogitic rocks. They represent mantle fragments emplaced into the subducted lower continental crust. Mineral composition and structure was studied by polarized-light microscope. Chemical composition of minerals was searched by electron microprobe. Metaultramafics contain olivine (forsterite), orthopyroxene (enstatite), clinopyroxene (diopside), amphibole (tremolite, magnesiohornblende, rare tschermakite), spinel group (spinel, hercynite, chromite), chlorite and serpentine group (antigorite, chrysotile). The prograde mineral assemblage of original eclogite facies was overprinted by granulite- and later by amphibolite facies during the exhumation. Maximum estimated temperature was achieved during the exhumation in granulite facies field - ca. 700-800 °C.

Key words: *eclogite/granulite facies; electron microprobe; mineral chemistry; E. Alps*

Introduction and goal of study

The Siegraben structural complex is located in the Rosalien Mts. near village Siegraben (ca. 80 km south of Vienna) in the Austro-Alpine basement units in the Eastern Alps „**Fig. 1**”. The Austroalpine (AA) basement units represent a complex nappe pile composed of pre-Variscan metasediments with intrusions of pre-Variscan, Variscan, Permo-Triassic and Tertiary magmatic rocks which experienced various grade of metamorphism during the Variscan, Permo-Triassic and Cretaceous orogenies. Tectonostratigraphy of the Middle Austroalpine and Lower Austroalpine structural complexes was defined by [1]. The Siegraben structural complex is composed of different litological sequences: metapelites (gneisses, micaschists), metabasites (eclogites, amphibolites, metagabbros), metaultramafics (serpentinites), metagranitoids (leucocrate metagranites, metapegmatites), impure metacarbonates and calc-silicate rocks (marbles) [2, 3, 4, 5]. The main goal of study was reconstruction of metamorphic evolution of subducted mantle fragments in this complex.

Materials and methods

Ten samples of metaultramafics were used for preparation of polished sections. They were examined under Leica DM2500 P polarizing microscope at the Dept. of Mineralogy and Petrology, Comenius University in Bratislava. This study was important for finding the suitable points for chemical analyses by electron microprobe (EMPA).

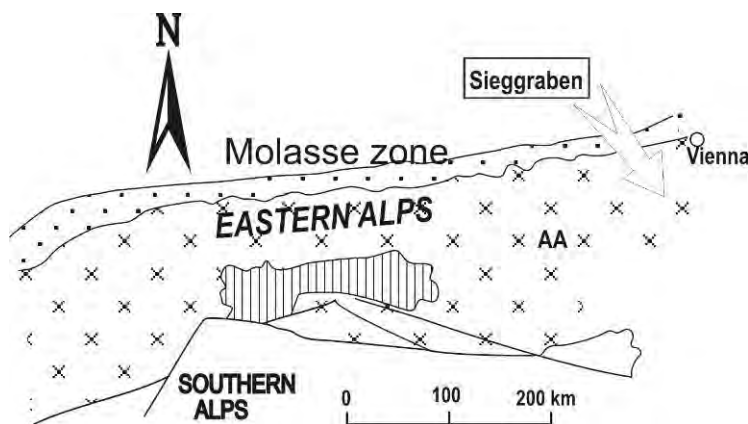


Fig. 1 Location of the Siegraben structural complex in the Austro-Alpine (AA) basement.

Mineral compositions were determined by Cameca SX-100 electron microprobe at the State Geological Institute of Dionýz Štúr in Bratislava. Analytical conditions of electron analyzer were 15 kV accelerating voltage and 20 nA beam current. Cameca Peak Sight v4.2 software was used for recalculation of measured data. We used these standards for calibration: Na on albite, Si, Ca on wollastonite, K on orthoclase, Mg on forsterite, Al on Al_2O_3 , Fe on fayalite, Mn on rhodonite, metallic V, Cr, and Ni, Ti on TiO_2 , Sr on SrTiO_3 , Nb on LiNbO_3 , La on LaPO_4 , Ce on CePO_4 , and Ta on LiTaO_3 . The beam diameter used was 10 μm . Chemical compositions of mineral phases obtained by EMPA are reviewed in „**Tab. 1-2**”. They are depicted in classification diagrams [7, 8].

Results and discussion

Identified minerals by optical microscopy in metaultramafic rocks are: olivine, amphiboles, orthopyroxene and clinopyroxene, serpentine, chlorite, hercynite and Cr-spinel.

Chemical analyses from EMPA were re-calculated for individual mineral phases and their end-members. Back-scattered electron images (BSE) show typical mineral associations of studied metaultramafics „**Fig. 2**”.

In Table 1, there are presented results from microprobe analysis of diopside calculated on the basis of 4 cations. A high amount of Mg and Ca is typical of diopside. In Table 2, there are presented results from microprobe analysis of tremolite and magnesio-hornblende [6].

Structural formulas for amphiboles were calculated on the basis assuming 13 cations excluding (Ca, Na & K) [6, 7]. Classification diagrams are in „**Fig. 3**”.

Tab. 1 Chemical analyses of diopside. Abbreviations: Wo – wollastonite, En – enstatite, Fs – ferrosilite, Ae – aegirine, Jd - jadeite

Sample	ST-S1 Diopside	ST-S1 Diopside	ST-S1 Diopside	ST-S1 Diopside
Analyses	An 30	An 32	An 40	An 44
SiO₂	54.82	54.52	54.62	54.58
TiO₂	0.02	0.03	0.03	0.05
Al₂O₃	0.71	0.70	0.70	0.78
FeO	1.72	1.84	1.72	1.60
MnO	0.07	0.07	0.04	0.06
MgO	17.93	17.69	17.89	17.80
CaO	24.88	24.78	24.79	25.02
Na₂O	0.10	0.12	0.11	0.08
K₂O	0.00	0.01	0.00	0.00
Cr₂O₃	0.109	0.161	0.11	0.15
Σ	100.34	99.89	100.09	100.12
Si⁴⁺	1.979	1.978	1.976	1.975
Al³⁺	0.021	0.022	0.024	0.025
Fe³⁺	0.000	0.000	0.000	0.000
Σ	2.000	2.000	2.000	2.000
Al³⁺	0.009	0.008	0.01	0.008
Fe³⁺	0.015	0.015	0.017	0.012
Ti⁴⁺	0.000	0.000	0.000	0.000
Cr³⁺	0.003	0.005	0.003	0.004
Mg²⁺	0.965	0.957	0.956	0.96
Fe²⁺	0.008	0.014	0.004	0.013
Mn²⁺	0.000	0.000	0.000	0.002
Σ	1.000	0.999	1.000	1.000
Mg²⁺	0.000	0.000	0.000	0.000
Fe²⁺	0.029	0.026	0.03	0.024
Mn²⁺	0.002	0.002	0.001	0.002
Ca²⁺	0.962	0.963	0.961	0.97
Na⁺	0.007	0.008	0.007	0.006
K	0.000	0.000	0.000	0.000
Σ	1.000	0.999	0.999	1.002
Wo	48.18	48.35	48.1	48.47
En	49.92	49.55	50.11	49.81
Fs	1.90	2.10	1.78	1.72
Ae	0.35	0.43	0.39	0.26
Jd	0.46	0.55	0.5	0.39

Discussion and conclusion

Metaultramafic rocks from the Siegraben structural complex (Rosalien Mountains, Eastern Alps, Austria) preserve mineral assemblages characterized by coexistence of hercynitic spinel, Ca-amphibole (tremolite and Mg-hornblende), Mg-rich chlorite, olivine (forsterite), orthopyroxene (enstatite) and clinopyroxene (diopside). A large amount of

hercynite and Ca-amphibole is characteristic. Prograde metamorphism reached P-T conditions close to the equilibrium chlorite=forsterite+enstatite+spinel+H₂O and the upper stability of Ca-amphibole (beside clinopyroxene) corresponding to the temperatures of 700–800 °C (in CMASH system) at high to medium pressures according to a petrogenetic grid in [9]. The P-T estimates are consistent with geothermobarometry from associated eclogites [4]. The prograde temperature regime reached the conditions of the upper amphibolite to lower granulite facies during the early stage of exhumation. Replacement of spinel by secondary chlorite, orthopyroxene and olivine by serpentine (\pm talca), represent typical retrograde reactions in studied metaultramafics. The metaultramafics most probably represent the fragments of metaperidotites, attached to the subducted lower continental crust during the Cretaceous tectonometamorphic event.

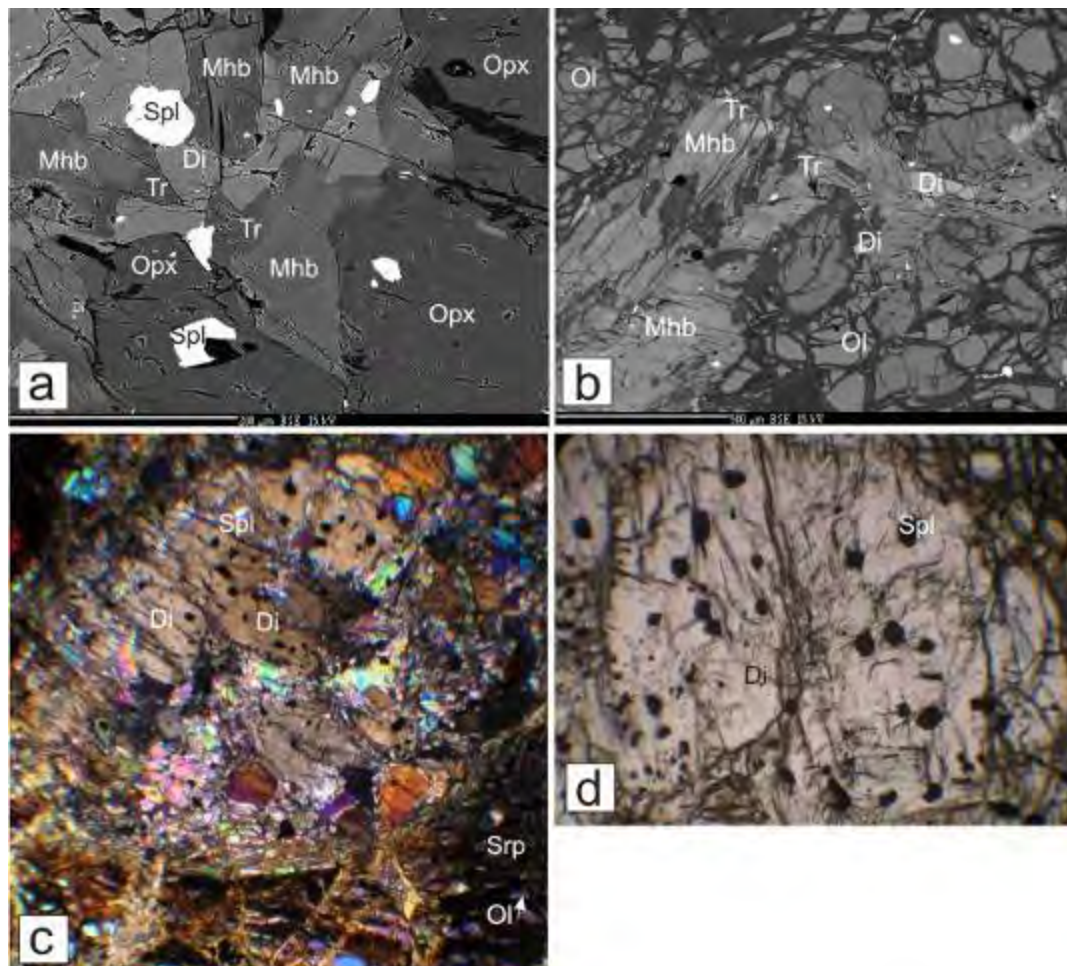
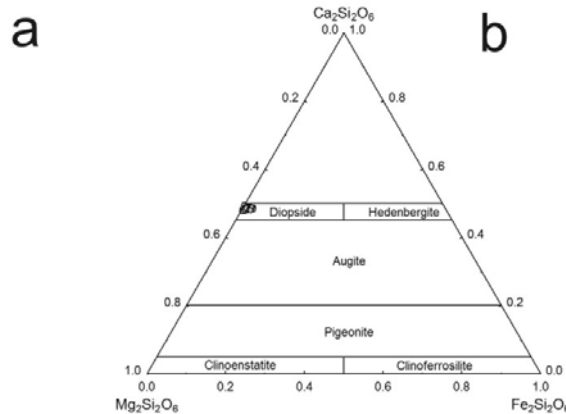
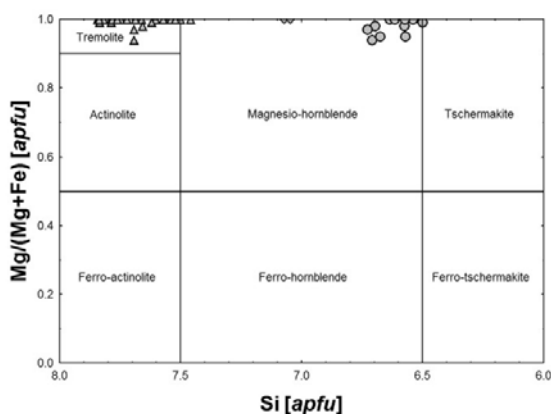


Fig. 2 BSE (a-b) and polarized microscope (c-d) images of analyzed minerals by microprobe. Mineral abbreviations in figures: Di-diopside, Tr-tremolite, Ol-olivine, Opx-orthopyroxene, Spl-spinel, Srp-serpentine, Mhb-magnesian-hornblende.

Tab. 2 Chemical analyses of tremolite and magnesio-hornblende.

Sample	S-200e Tremolite	S-200e Tremolite	S-200e Tremolite	ST-S1 Magnesio-hornblende	ST-S1 Magnesio-hornblende
Analyses	An 19	An 20	An 21	An 17	An 26
SiO₂	56.07	56.51	55.26	51.26	51.13
TiO₂	0.03	0.03	0.05	0.09	0.12
Al₂O₃	2.61	2.27	2.67	6.98	7.59
FeO	2.06	2.19	2.19	3.62	3.70
MnO	0.11	0.08	0.09	0.05	0.10
MgO	23.65	23.68	23.46	20.93	20.47
CaO	12.61	12.51	12.63	13.16	12.99
Na₂O	1.04	0.97	1.22	0.71	0.77
K₂O	0.12	0.08	0.10	0.19	0.17
Cr₂O₃	0.41	0.21	0.40	0.51	0.62
Σ	98.70	98.52	98.06	97.58	97.64
Si⁴⁺	7.548	7.607	7.512	7.072	7.046
Al³⁺	0.415	0.360	0.428	0.928	0.954
Σ	7.963	7.967	7.940	8.000	8.000
Ti⁴⁺	0.003	0.003	0.005	0.010	0.012
Al³⁺	0.000	0.000	0.000	0.207	0.279
Cr³⁺	0.044	0.022	0.043	0.056	0.067
Mg²⁺	4.746	4.752	4.753	4.304	4.204
Mn²⁺	0.013	0.009	0.010	0.006	0.011
Fe³⁺	0.232	0.247	0.243	0.417	0.426
Fe²⁺	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Σ	5.037	5.033	5.060	5.000	5.000
Ca²⁺	1.818	1.804	1.839	1.945	1.917
Na⁺	0.182	0.196	0.161	0.055	0.083
Σ	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000
K⁺	0.021	0.014	0.016	0.034	0.030
Na²⁺	0.089	0.058	0.161	0.136	0.122
Σ	0.110	0.072	0.177	0.170	0.152
Mg/(Mg+Fe²⁺)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Fe³⁺/(Fe³⁺+^{VI}Al)	1.00	1.00	1.00	0.67	0.60



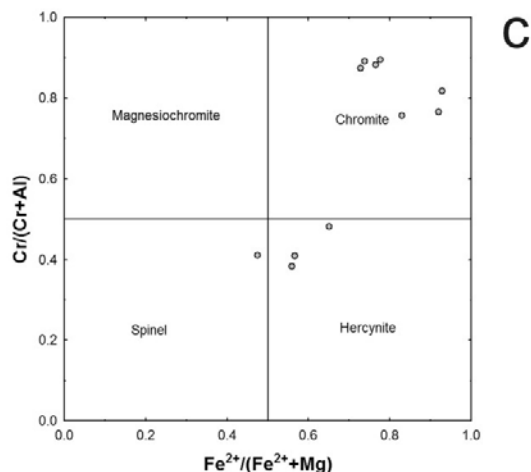


Fig. 3 Classification diagrams of a) amphiboles; b) pyroxenes; c) spinels.

Acknowledgement

This work was supported by the APVV-0081-10 and VEGA-1/0255/11 grants.

References

- [1] Tollmann A (1980) Abh. der Geologischen Bundesanstalt 34, p. 197
- [2] Kümel, F., (1935) Tschermarks Mineralogische und Petrographische Mitteilungen, 47, p. 141
- [3] Putiš M., Korikovskiy S. P., Pushkarev D. Y. (2000) Jahrb. Geol. Bundesanst. 142(3), p. 73
- [4] Putiš M., Korikovskiy S. P., Wallbrecher E., Unzog W., Olesen Oe.N., Fritz H. (2002) J. Struct. Geol. 24(2), p. 339
- [5] Kromel J., Putiš M., Bačík P. (2011) Acta Geologica Slovaca 3(1), p. 1
- [6] Fabries J., Ferguson A. K., Ginzburg I. V., Ross M., Seifert F. A., Zussman J., Aoki K., Gottardi G. (1988) Am. Mineral. 73, p. 1123
- [7] Leake B. E., Woolley A. R., Arps C. E. S., Birch W. D., Gilbert M. C., Grice J.O., Hawthorne F. C., Kato A., Kisch H. J., Krivovichev V. G., Linthout K., Laird J., Mandarino J. A., Maresch W. V., Nickel E. H., Schumacher J. C., Smith D. C., Stephenson N. C. N., Ungaretti L., Whittaker E. J. W., Youzhi G., (1997) Can. Mineral. 35, p. 219
- [8] Morimoto N., Fabries J., Ferguson A. K., Ginzburg I. V., Ross M., Seifert F. A., Zussman J. (1988) Can. Mineral. 27, p. 143
- [9] Bucher K., Frey M. (1994) Petrogenesis of Metamorphic Rocks, Springer-Verlag, Berlin, p. 147

3D density modelling of Turiec basin including topographic gravity effect of the sedimentary fill

Martin Krajňák¹, Marián Bošanský¹, Miroslav Bielik^{1,2}, Irina Makarenko³, Olga Legostaeva³, Vitaly I. Starostenko³

¹*Department of Applied and Environmental Geophysics, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská dolina, pav. G, 842 48 Bratislava, Slovak Republic
e-mail: krajnak@fns.uniba.sk,*

²*Geophysical Institute of the Slovak Academy of Sciences Dúbravská cesta 9, 845 28 Bratislava, Slovak Republic;*

³*Institute of Geophysics National Academy of Sciences of Ukraine, Palladin, av. 32, Kiev, 03680, Ukraine*

Abstract

New results related to the thickness and density of the sedimentary fill of the Turiec Basin allowed us to construct the first original stripped gravity map for this typical intramontane Neogene depression of the Western Carpathians. The stripped gravity map of the Turiec Basin represents the Bouguer gravity anomalies corrected for the density contrast of its Quaternary-Tertiary sedimentary basin fill. It means, that the map reflects the gravity effects of the density inhomogeneities which are located beneath the sedimentary basin fill. This map is therefore suitable for the interpretation of the structure and composition of the pre-Tertiary basement. Based on the new data analysis, two different density models of the sedimentary fill were constructed. The 3D density modelling was used to calculate the gravity effect of the density models. The stripped gravity maps were produced by subtracting the density model gravity effects from Bouguer anomalies. Regional trend was also removed from the stripped gravity maps.

Key words: *applied geophysics, 3D density modelling, stripped gravity map, Turiec Basin*

Introduction

Based on the geophysical constrains, two dimensional interpretation of the gravity field in the Turiec basin by the density modelling method was presented by [1] and [2]. [3] extended this study by the calculation of the first preliminary stripped gravity map in the Turiec basin. This preliminary stripped gravity map did not take into consideration the real topography of the basin. The upper boundary of the density model was approximated only by sea level (0 m). This approximation is inadequate for a quality interpretation of the gravity field by the stripping gravity method.

From this point of view the main goal of the paper presented here is to apply 3D gravity modelling for the calculation and presentation of new, more precise, stripped gravity maps in the Turiec basin. The improvement of the new stripped gravity maps presented here consists in the construction of more precise density models including the topography of the

basin. The aim was the computation of stripped gravity maps calculated for two different density models and two stripped gravity maps corrected for the regional gravity anomalies.

Methods

The 3D density modelling method was applied to generate the stripped gravity map from the Bouguer gravity map in the Turiec basin. The Bouguer gravity map was compiled from Bouguer gravity anomalies rather than gravity disturbances (c.f., [4,5]), since the geophysical indirect effect is on the regional scale of the Turiec basin negligible from the viewpoint of our study (c.f. [6]). Stripping is often applied in geophysical studies, on global or regional scale, to unmask the signal of unknown sources, when the signal of known sources or structures can be computed (e.g., [7]). Stripping is particularly useful in geophysical and geological investigations of the basement and the deep-seated structure beneath sedimentary basins (e.g.,[3]). The 3D gravity effect of the sedimentary fill of the Turiec basin was computed by the GMT-AUTO software package [8,9].

The principle of the method is that the geological structures are divided into horizontally or vertically stratified medium with an arbitrary density distribution in each layer. The geological structure is approximated by inhomogeneous, arbitrarily truncated vertical rectangular prisms. An automatization of the input of initial graphic information (maps) by digitization is also very useful in the process of the modelling [10]. The gravity effect of three dimensional bodies can be determined not only by constant densities, but also by different densities on the upper and lower limits having a linear or exponential vertical transition. After the gravity effect calculation of Turiec basin sedimentary fill the resultant stripped gravity map is calculated by subtraction of this effect from the complete Bouguer anomaly map. The same holds for the subtraction of regional gravity anomalies from the stripped gravity maps.

Results

Based on the 3D gravity modelling method, the gravity effects of the two different density models (Fig. 1) were calculated by the GMT-AUTO software package. The analysis of the gravity effect maps shows clearly that the character of the gravity field is very similar for both models. They vary only in the amplitudes of the gravity anomalies. These are smaller for the first model, while higher for the second one . Note that the gravity effects in the northern and central part of Turiec basin are lower (-6 mGal) for the first density model and

higher for the second one (-12 mGal). The amplitudes of the gravity effect in the southern part are almost the same (about -11 mGal) for both density models.

The stripped gravity maps (Fig. 2a, 2b) were determined for each one of the sedimentary density models by subtracting their gravity effects from the complete Bouguer anomalies. Looking more detailed on the stripped gravity maps, it can be recognized immediately that their gravity fields are affected significantly by the regional trend. This trend has a decreasing tendency in the direction from SW to NE. This regional trend reflects the gravity effects of the deep-seated crustal inhomogeneities, mostly Moho gravity effect. As the regional gravity trend masks the residual gravity field, which is the fundamental goal of our study, it is necessary to remove it from the stripped gravity maps (Fig. 3a, 3b). The same approach has also been applied in the interpretation of gravity field in Israel [11]. For the elimination of the regional gravity trend we used the map of regional gravity anomalies in the wider area of the Turiec basin, which was calculated for a radius of 5000 m [1].

Discussion and Conclusions

Very important element for the quality of the resultant stripped gravity map is the existing lack of knowledge on a course boundary between the Neogene and Paleogene layers in the Turiec basin. The local gravity low located in the western part indicates that the gravity effect of the sedimentary fill here is probably underestimated.

Nevertheless, we think that even if the results of the stripping gravity method are by definition, non unique, the results presented in the paper are important and valuable at this stage of research in the Turiec basin. The results showed that the applied method can be very useful for investigating the structure, composition and tectonics of the basements of Tertiary depressions in the Western Carpathians.

Acknowledgments

The authors are grateful for the support of the Slovak Grant Agency VEGA, under grants No. 1/0095/12, 2/0067/12 and 1/0587/11. This work was supported also by the Slovak Research and Development Agency APVV under grants No. APVV-0194-10, APVV-0625-11, APVV-0099-11, and ESF-EC-0006-07).

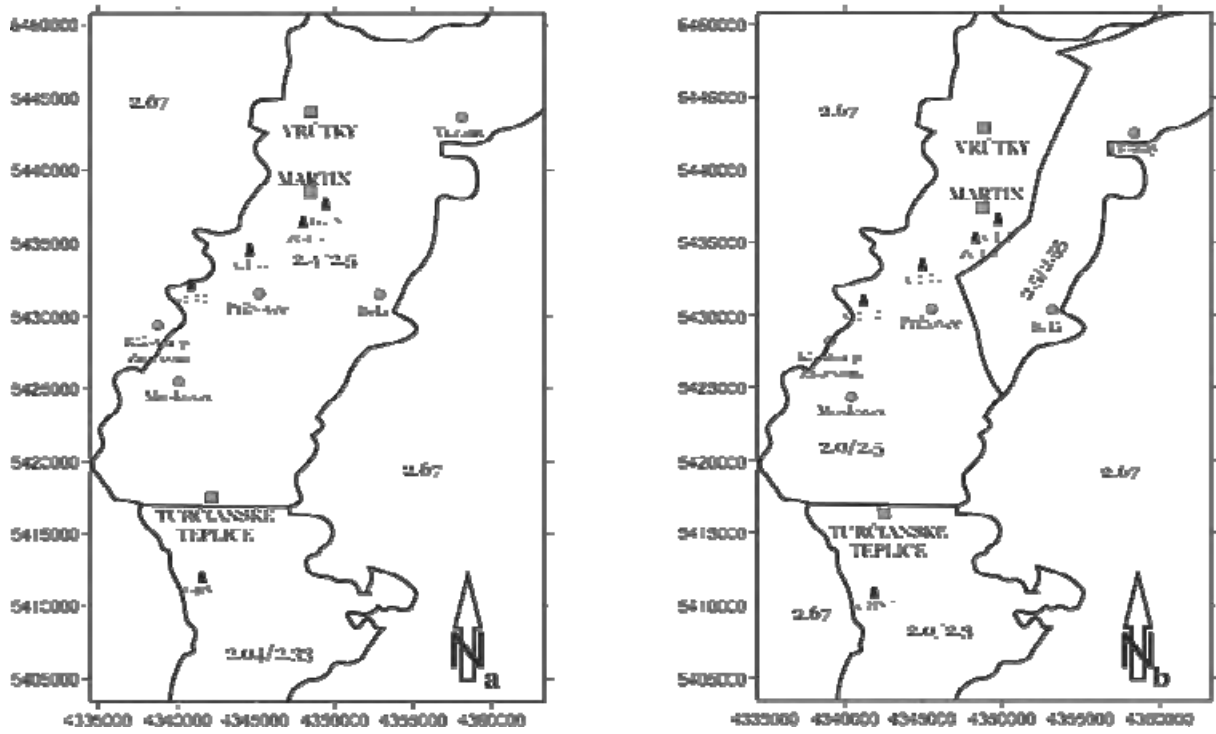


Fig. 1 Two alternative density models of the Turiec basin

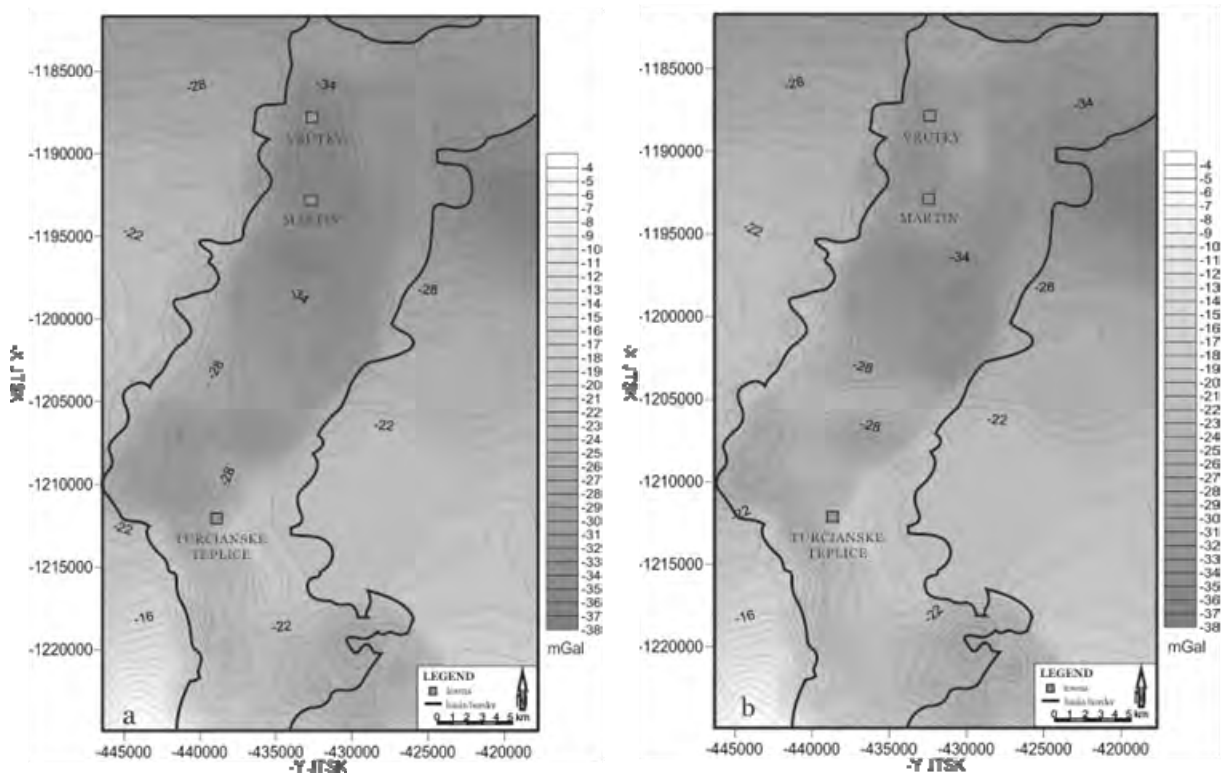


Fig. 2 Stripped gravity maps for the first (a) and second (b) density model

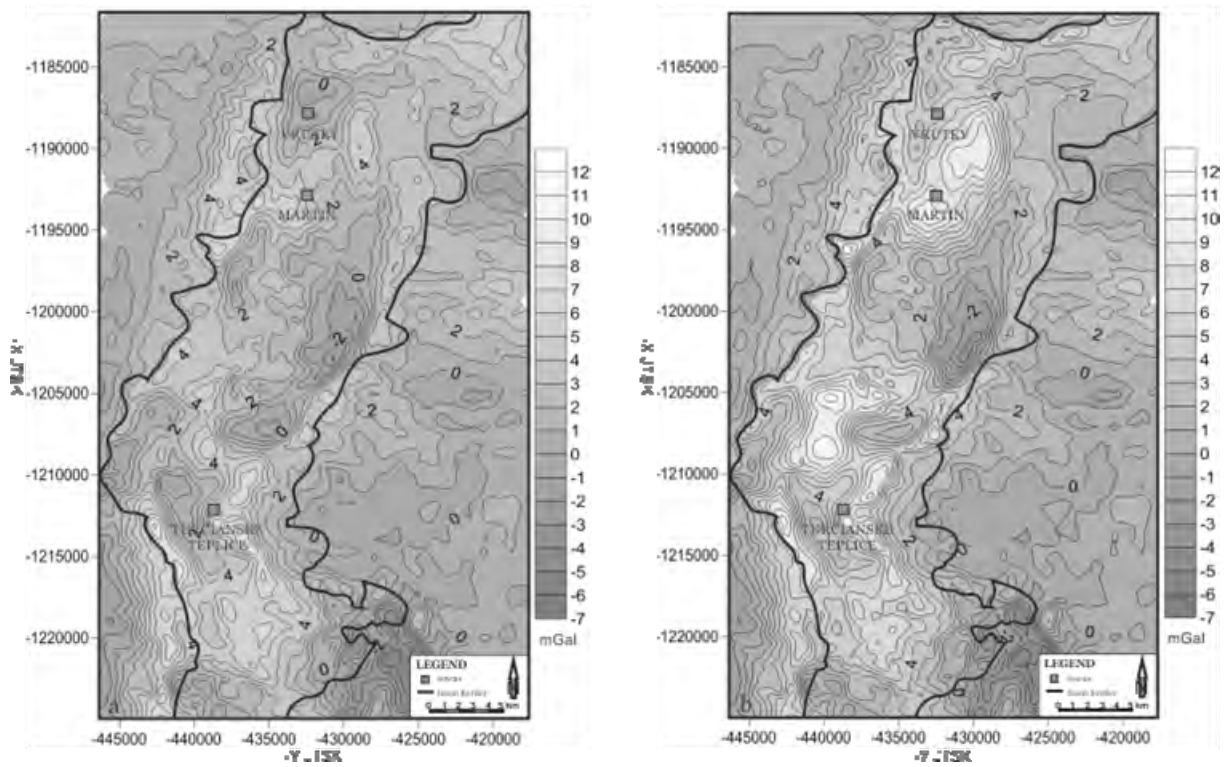


Fig. 3 The resultant stripped gravity maps for the first (a) and second (b) density model corrected by regional gravity anomalies, which were calculated for a radius of 5000 m [1]

Literature

- [1] Bielik M., Hók J., Kučera I., Michalík P., Šujan M., Šipka F. & Šefara J. (2007) Application of the geophysical field modelling - impulse of the regional development. Solution of the Turčianska kotlina basin model area. Final report. Manuscript – Archive Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, 1-58 (in Slovak).
- [2] Grinč, M., Bielik, M., Mojzeš, A. & Hók, J. (2010) Contribution to Geophysics and Geodesy, 40 (2), p. 103
- [3] Krajňák, M., Bielik, M., Makarenko, I., Legostaeva, O., Starostenko, V.I. & Bošanský, M. (2012) Contribution to Geophysics and Geodesy, 42 (2), p. 181
- [4] Vajda P., Vaníček P. & Meurers, B. (2006) Studia Geophysica et Geodaetica, 50 (2), p. 189
- [5] Vajda P., Vaníček P., Novák P., Tenzer R. & Ellmann A. (2007) Journal of Geophysical Research, 112 (B6), p. 112
- [6] Vajda P. & Pánisová J. (2007) Geol. Carpath., 58 (1), p. 97
- [7] Tenzer R., Gladkikh V., Novák P. & Vajda P. (2012) Surveys in Geophysics, 33 (5), p. 817
- [8] Starostenko V. I., Sharypanov V. M., Savchenko A.S., Legostaeva O. V., Makarenko I. B. & Kuprienko P.Ya. (2011) Geophysical Journal, 33 (N1), p. 54
- [9] Starostenko V. I. & Legostaeva O. V. (1998) Izvestiya, Physics of the Solid Earth, 34 (12), p. 991
- [10] Legostaeva O. (1999) Geophysical Journal, 21 (3) p. 693
- [11] Bielik, M., Rybakov, M. & Lazar M. (2013) Estimation of reliability and accuracy of geological gravity back stripping. *The Leading Edge* (submitted)

Petrografický a biostratigrafický rozbor klastov kržlianskej brekcie – významného paleokrasového fenoménu Malých Karpát

Alexander Lačný, Jakub Havrila, Milan Sýkora

Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra geológie a paleontológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; lacny@fns.uniba.sk

Abstrakt

The Kržla breccia is a significant phenomenon of the Malé Karpaty mountains. The outcrop that was located near the village Sološnica. The breccia is composed of clasts and red matrix. Research is focused on clasts that are angular carbonates and rounded siliciclastics. Probable age of the breccia known from older research is Upper Cretaceous to Paleocene. During this period is expected to expose part of the territory and then started processes of karsting. This gives possibility that in paleokarst sediment may be present a paleontological material of terrestrial animals but this was not confirmed. Supposed age of majority of analyzed carbonate clasts is Middle to Upper Triassic. An exception is one clast of Jurassic age that source probably could be taticum or fatricum. Source of siliciclastic rocks (not source of clasts) according to mineral composition of clasts could be granitoid rocks.

KLúčové slová: Malé Karpaty; veterlínska sukcesia; paleokras; kržlianska breccia; krasovatenie.

Úvod a formulácia cieľa

Príspevok sa zaoberá opisom paleokrasovej brekcie typu Kržla „**Obr. 1**“ nachádzajúcej sa na západnom okraji centrálnej časti Malých Karpát. Cieľom práce bolo analyzovať klasty na základe petrografického a biostratigrafického výskumu, prípadne určiť zdrojové oblasti klastického materiálu.

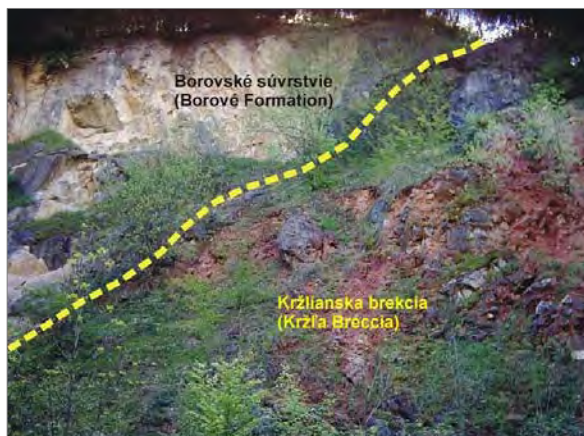
Brekciu definoval Michalík [1] ako brekciu vrchnokriedového až paleocénneho veku vzniknutú v prostredí s dominujúcim mechanickým zvetrávaním. Obsahuje 75% klastov annabergských vápencov veľkosti 0,2 - 0,6 m³. Zvyšok tvoria detritické vápence, dolomity, reiflingské a „pseudo-reiflingské“ vápence. Matrix tvorí červenosivý a sivý slieňovcový pelitický materiál alebo laminovaný červený slieňovec. Spomenutý vek by mali dokazovať aj paleontologické nálezy planktonických foraminifer a fytoplanktónu v základnej hmote. Podľa Aubrechta [4] je breccia paleokrasového pôvodu. Matrix tvorí ílovitá frakcia červenej farby poukazujúca na procesy krasovatenia.

Činčura et al. [2] sa zároveň domnievajú, že počas senónu a začiatkom paleocénu boli komplexy karbonátových hornín veterníckeho a havranického príkrovu vystavené intenzívnej subaerickej erózii. Vysoké priemerné ročné teploty a výdatné zrážky podmienili na vápencoch a dolomitoch vznik krasových foriem spočiatku na povrchu a postupne procesom krasovatenia aj do hĺbky. Tieto procesy mali za následok aj vznik paleokrasových sedimentov.

Odber vzorky na petrografický rozbor bol realizovaný v opustenom lome neďaleko Sološnice, ktorý je lokalizovaný po ľavej strane na začiatku Sološnickej doliny (GPS: N 48° 27.291' E 17° 14.317'). Na lomovej stene „**Obr. 2**“ je možné pozorovať gutensteinské – annabergské vápence aniského veku veterlínskej sukcesie Havrila in [3]. Nad triasovými vápencami vystupuje kržlianska brekcia s výraznou červenou matrix, ktorá zároveň vyplňa malé dutiny a praskliny podložných karbonátov [4]. Na tieto predtransgresívne sedimenty podľa Aubrechta [4] nasadá borovské súvrstvie a vo všeobecnosti podľa Bučeka in [3] na tieto predtransgresívne sedimenty transgresívne nasadá paleogénne súvrstvie jelenej hory (?spodný ilerd – vrchný kuis), ktoré je súčasťou Malokarpatskej skupiny. Je charakterizované v spodnej časti klastickými sedimentmi – dolomitovými pieskovecami na báze s dolomitovými brekciami, karbonátovými brekciami a drobnozrnnými zlepenkami. Na vhodných miestach paleoreliéfu sú zachované organodetritické pieskovce / piesčité vápence a organogénne vápence Buček in [3].



Obr. 1 Kompaktná časť kržlianskej brekcie.



Obr. 2 Odkryv s vyznačenou plochou transgresie medzi kržlianskou brekciou a borovským súvrstvím [4] (lokality odberu vzoriek).

Materiál a metódy

Na lokalite „**Obr. 2**“ sme odobrali 15 kg brekcie typu Kržla. Materiál bol nehomogénny, z väčšej časti tvorený litifikovaným sedimentom. Tvorili ho obliaky a angulárne klasty do veľkosti cca 2,5 cm, matrix bola tvorená načervenanou pôdou typu terra rossa „**Obr. 1**“.

Pre čo najúčinnejšie a pomerne šetrné rozpustenie veľmi kompaktného sedimentu sme zvolili ľadovú kyselinu octovú – CH_3COOH , ktorej koncentrácia dosahuje 99,7%. Dôvodom použitia bol aj fakt, že sme nechceli, aby procesu rozpúšťania podľahli klasty karbonátov, prípadne bioklasty tvorené kalcitom. Vysoká koncentrácia ľadovej kyseliny spôsobí, že uhličitan vápenatý po reakcii s kyselinou vytvorí na povrchu vzorky vrstvu octanu

vápenatého, ktorý sa v koncentrovanej kyseline octovej nerozpúšťa, resp. rozpúšťanie nepostupuje do hĺbky. Napriek tomu medzizrnový (mikrokryštalický) tmel, ktorý litifikuje sediment sa vplyvom tejto kyseliny naruší. Dôsledkom čoho, je možné vyseparovať jednotlivé komponenty.

Sediment sa v kyseline rozpúšťal 7 dní. Po zliatí kyseliny bol veľmi rýchlo opláchnutý vodou a neskôr presitovaný na niekoľko veľkostných frakcií. Tie boli následne podrobené makroskopickému aj mikroskopickému štúdiu. Z časti obliakov boli vyhotovené výbrusy pre petrografické a biostratigrafické zaradenie klastov.

Výsledky a diskusia

Klasty kržlianskej brekcie

Analyzované boli klasty troch vzoriek kržlianskej brekcie. Výskum bol zameraný na zistenie zastúpenia jednotlivých horninových typov a ich petrografického charakteru. V nasledovnom sú uvedené percentuálne hodnoty zastúpenia klastov jednotlivých horninových typov, ktoré sú výsledkom analýzy 110 vybraných klastov z tretej vzorky kržlianskej brekcie. Je potrebné upozorniť, že neboli analyzované všetky klasty vzorky, ale iba vybrané. To mohlo ovplyvniť nižšie uvedené percentuálne hodnoty zastúpenia jednotlivých horninových typov vo vzorke.

Na základe analýzy klastov z odobraných vzoriek bolo zistené, že kržlianska brekcia obsahuje klasty karbonátových a siliciklastických hornín. Klasty karbonátových hornín sú angulárne a klasty siliciklastických hornín sú dobre zaoblené. Poukazuje to na rozdielny stupeň opracovania uvedených hornín. V súvislosti s tým možno predpokladať rozdielnu dĺžku transportu karbonátových klastov v porovnaní so siliciklastickými klastami. Za zdroj siliciklastického materiálu možno pravdepodobne považovať súvrstvie karpatského keupru (nález karbonátového tmelu v niektorých obliakoch).

Litologická analýza karbonátových klastov

Karbonátové klasty sú z vápencov (33,6% vybraných klastov z tretej vzorky kržlianskej brekcie) a dolomitov, pričom vápence podstatne prevládajú. Väčšina vápencov je pravdepodobne stredotriasového až vrchnotriasového veku na základe ojedinelého výskytu mikrofosílií a celkového mikrofaciálneho zloženia. Rozlíšené boli nasledovné typy vápencov: 1. tmavosivé a svetlohnedosivé stredotriasové (potvrdené nálezom foraminifery) vápence (4,5%), 2. sekundárne sfarbené žltohnedé mikrokryštalické vápence (7,3%), 3. sekundárne dočervena sfarbené mikrokryštalické ojedinele sa vyskytujúce vápence, 4. strednojurské až

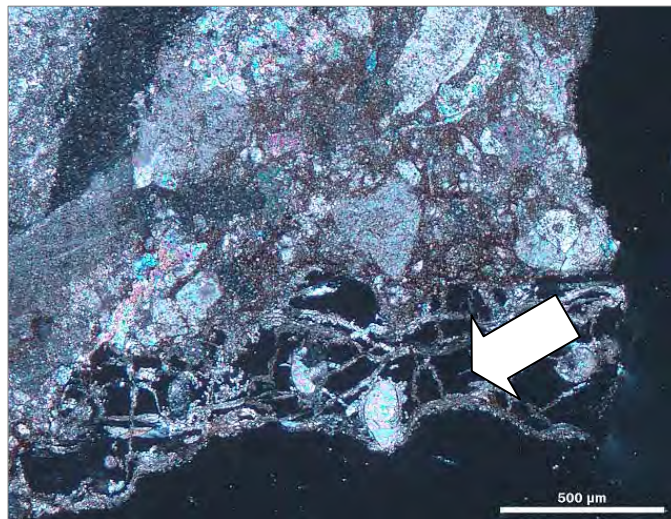
vrchnojurské vápence a 5. ostatné stratigraficky nezaradené vápence (tmavosivé, svetlosivé, až svetlohnedosivé škvrnité mikrokryštalické vápence tiež pravdepodobne stredotriasového až vrchnotriasového veku) (21,8%). Dolomity sú triasové svetlosivé mikrokryštalické. Prítomné sú aj tmavosivé rohovce (2,7%).

Mikrofaciálna analýza karbonátových klastov

Mikrofaciálne bolo analyzovaných dvanásť klastov tmavosivých stredotriasových vápencov, deväť klastov žltohnedých pravdepodobne triasových vápencov a jeden klast jurských vápencov. Bola použitá Dunhamova klasifikácia [5].

Tmavosivé stredotriasové vápence majú štruktúru mudstone a wackestone. Obsahujú peloidy a zriedkavo bioklasty: foraminifery (z nich bola určená *Meandrospira deformata* SALAJ - určil J. Soták, vyskytujúca sa vo vekovom rozpätí od spodného do stredného anisu), krinoidové články a ďalšie neidentifikovateľné fragmenty. Vápence sú prestúpené kalcitovými žilami. Priemerná veľkosť vybraných analyzovaných klastov je 11,6 mm.

Žltohnedé pravdepodobne triasové vápence majú štruktúru mudstone. Obsahujú peloidy a zriedkavo bioklasty: ostrakódy, tenkostenné lastúrniky a ?kalcisféry. Vápenec je prestúpený kalcitovými žilami. Niektoré klasty majú fenestrálnu štruktúru. Priemerná veľkosť vybraných analyzovaných klastov je 21,4 mm.



Obr. 3 Fragment kosti pravdepodobne plazy s haversovými kanálkami, XN.

Jurské vápence majú štruktúru packstone. Obsahujú bioklasty: fragmenty článkov echinodermát, dva fragmenty kosti pravdepodobne plazy „**Obr. 3**“, tenkostenné lastúrniky *Globochaete alpina* LOMB. a vzácne uniseriálne foraminifery. Veľkosť vybraného analyzovaného klastu je 8 mm. Asociácia bioklastov umožňuje predpokladať strednojurský až vrchnojurský vek vápenca.

Analýza siliciklastických klastov

Klasy siliciklastických hornín sú psamity až pelity (tvoriace spolu 63,6% vybraných klastov z tretej vzorky kržlianskej brekcie), pričom psamity podstatne prevažujú.

Mikroskopicky boli analyzované dva klasy psamitu, pričom bolo zistené nasledovné zastúpenie jednotlivých zložiek. Vzorka 1 obsahuje: kremeň (65,8%), živce (25,4%), litoklasy (8,6%), muskovit (pod 1%) a zirkón (pod 1%). Vzorka 2 obsahuje kremeň (64,1%), živce (33,7%), litoklasy (2%), muskovit (pod 1%) a zirkón (pod 1%). Ojedinele boli zistené zrná kremeňa vulkanického pôvodu. Sporadicky sa vyskytuje kalcitový tmel. Obidve vzorky podľa Pettijohnovej klasifikácie [6] odpovedajú arkózam. Vytriedenosť komponentov v skúmaných horninách je stredná až veľmi dobrá. Podľa priemernej veľkosti zrn (0,1 mm až 0,3 mm) patria analyzované horniny medzi veľmi jemnozrnné až strednozrnné pieskovce podľa klasifikácie Blaira a McPhersona [7] a Pettijohna l.c. Na základe minerálnej asociácie analyzovaných pieskovcov boli ich zdrojom pravdepodobne granitoidné horniny.

Záver

Výskum kržlianskej brekcie sa realizoval za účelom získania a identifikácie paleontologického materiálu v matrix, ktorý by potvrdil vrchnokriedovo-paleocénny vek brekcie. Prípadne by sa v nej mohli nachádzať zvyšky suchozemských živočíchov, keďže je známe, že procesy krasovatenia sú charakteristické pre vynorené oblasti.

Už pri samotnom odbere vzorky bolo zrejmé, že zachovanie paleontologického materiálu v sedimente bude veľmi problematické. Najmä klastický materiál a matrix tvorený terra rossou nie sú vhodné pre zachovanie paleontologických fosílií. Pri makroskopickom aj mikroskopickom štúdiu matrix sa nepodarilo nájsť žiadne paleontologické zvyšky. Nálezy planktonických foraminifer a fytoplanktónu v základnej hmote kržlianskej brekcie [1] neboli potvrdené.

Karbonátovým klastom je možné na základe obsahu mikrofosílií a celkového mikrofaciálneho zloženia priradiť pravdepodobný vek – stredný až vrchný trias a v prípade jedného klastu strednú až vrchnú juru. Jurský karbonát obsahuje aj fragment kosti presne neidentifikovateľného plaza. Keďže jura veterlínskej sukcesie nie je známa, je možné predpokladať, že klast karbonátu pochádza z tatrídneho mezozoika, prípadne fatrika a bol dotransportovaný prostredníctvom vodných tokov v období vzniku brekcie. Väčšinou ostrohranné klasy karbonátov stredného triasu (gutensteinské - annabergské vápence) pochádzajú z materskej horniny substrátu brekcie. Ich prevažná neopracovanosť poukazuje na

lokálne procesy in situ – kolapsy jaskynných dutín, zvetrávanie mrazom a pod.

Pestrosť zdrojových oblastí dotvárajú siliciklastické klasty, kde pravládajú psamity až pelity. Dobrá opracovanosť klastov indikuje dlhší transport. Nález vulkanického kremeňa v jednom z klastov poukazuje na zdroj z acidných vulkanických hornín.

V budúcnosti by bolo vhodné sa systematicky venovať zloženiu brekcií a pokúsiť sa o bližšiu interpretáciu zdrojových oblastí klastov a vystopovať ich možné smery transportu.

Pod'akovanie

Príspevok bol vypracovaný s podporou projektu VEGA č. 1/0712/11 „Geodynamický vývin karpatského strižného koridoru v období kenozoika”.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Michalík J. (1984) Geol. Carp. 35(4), 489-504.
- [2] Činčura J., Gross P., Köhler E. (1991) Slovenský kras, 29, 69-81.
- [3] Polák M., Plašienka D., Kohút M., Putiš M., Bezák V., Maglay J., Olšavský M., Havrila M., Buček, S., Elečko M., Fordinál K., Nagy A., Hraško Ľ., Németh Z., Malík P., Liščák P., Madaras J., Slavkay M., Kubeš P., Kucharič Ľ., Boorová D., Zlínska A., Síránová Z., Žecová K. (2012) Vysvetlivky ku geologickej mape regiónu Malé Karpaty v mierke 1 : 50 000. MŽP SR, Štátny geologický ústav, Bratislava, 309 p.
- [4] Aubrecht R. (2012) Journal of Alpine geology 54, 1-32.
- [5] Dunham R.J. (1962) Classification of carbonate rocks according to depositional texture, In: Classification of carbonate rocks (Ed. By W. E. Ham), 108-201.
- [6] Pettijohn F. J., Potter P.E., Siever, R. (1987) Sands and sandstones. 2nd Edn., Springer-Verlag, New York, 553 p.
- [7] Blair T.C., McPherson J.G. (1999) Journal of Sedimentary Research 69(1), 6-19.

Nové nálezy druhu *Discosauriscus pulcherrimus* (Seymouriamorpha, Discosauriscidae) zo spodného permu Boskovickej panvy na Morave (Česká republika)

Marika Mikudíková

Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra geológie a paleontológie, Mlynská dolina, 842 15, Bratislava, Slovenská republika; mikudikova.m@azet.sk

Abstrakt

Discosauriscids are the most diverse and the best studied seymouriamorphs. They are known from the (?) Upper Carboniferous and Lower Permian of Europe and Asia. New finds of three-dimensionally preserved specimens of *Discosauriscus pulcherrimus*, what are described here, come from the Lower Permian of the Boskovice Basin. Unfortunately, this taxon is very rare in the area of Central Europe. However, these two specimens are the best known preserved individuals. For this reason, it brings a perfect opportunity to study all cranial and postcranial elements. Based on these new data, new finds represent larval and metamorphic ontogenetic grown stages.

Kľúčové slová: *Seymouriamorpha; Discosauriscus pulcherrimus; spodný perm; osteológia; ontogenéza*

Úvod a formulácia cieľa

Zástupcovia čeľade Discosauriscidae sú najviac diverzifikovaní a najlepšie preskúmaní zástupcovia skupiny Seymouriamorfa (Tetrapoda: Amphibia). Sú známi z (?)neskorého karbónu až skorého permu a sú reprezentovaní stovkami exemplárov z Európy a Ázie. Nálezy diskosauriscidov z Boskovickej panvy na Morave (Česká republika) sú trojrozmerné zachované, čo umožnilo dokonalé preskúmanie lebky a postkranialneho skeletu. Dokonca sa zachovali aj zuhoľnatené zvyšky mäkkých častí tela, napr. oči, koža, šupiny, vonkajšie žiabre a chorda. Všetky jedince čeľade Discosauriscidae sú známe z lakustrinných sedimentov [1]. Väčšina anatomických znakov čeľade Discosauriscidae je odvodená od doposiaľ najlepšie preskúmaného druhu *Discosauriscus austriacus* [2, 3, 4].

Rod *Discosauriscus* je z lokalít v Boskovickej panve zastúpený dvomi druhmi. Početnými nálezmi je zastúpený najmä druh *Discosauriscus austriacus*, zatiaľ čo *Discosauriscus pulcherrimus* tu bol donedávna reprezentovaný len piatimi jedincami. Tento rod tu dlho predstavoval jediného známeho zástupcu čeľade Discosauriscidae. No pomerne nedávno sa v Boskovickej panve podarilo identifikovať dva nové taxóny tejto čeľade, a to *Makowskia laticephala* [5] a *Spinarerpeton brevicephalum* [6], obidva známe len na základe jedného jedinca. Druh *Discosauriscus pulcherrimus* je na lokalitách v Boskovickej panve vzácny (pozri vyššie). To je v kontraste s inými ranopermskými lokalitami vo Francúzsku

a Nemecku, odkiaľ je známych mnoho nálezov. Napriek tomu však, tieto jedince nie sú zďaleka tak dobre zachované ako tie z Boskovickej panvy.

Nedávno boli objavené dva nové jedince *D. pulcherrimus*, ktoré predstavujú doposiaľ najlepšie zachovaných jedincov tohto druhu a poskytujú jedinečnú možnosť jeho podrobného anatomického štúdia.

Materiál a metódy

Opisované jedince druhu *Discosauriscus pulcherrimus* sú zo zbierok Muzea Východných Čech v Hradci Králové v Českej republike, evidované pod číslom MHK 61803 (lebka) a MHK 61804 (lebka a takmer kompletný postkranialny skelet). V oboch prípadoch je stredná dĺžka lebky, meraná v mediánnej rovine, približne 31 mm.

Študovaný materiál bol nájdený v Boskovickej panve, ktorá leží vo V časti Českej republiky na Morave. Jedná sa o vrchnopaleozoickú limnickú panvu so sedimentárnou náplňou veku stephan C – autun a saxón [7]. Všetky študované jedince boli nájdené v S časti Boskovickej panvy na lokalite Kochov-Horka, neďaleko od mesta Letovice. Fosiliférne vrstvy sú súčasťou bačovských vrstiev, patriacich do stredného horizontu letovického súvrstvia spodnopermského veku, v biozóne *Xenacanthus decheni* [7].

Všetky skúmané jedince sú fosilizované apatitom, čo umožňuje ich kompletnú chemickú preparáciu [1]. Okolité hornina bola rozpúšťaná v 10 % roztoku kyseliny octovej. Po krátkom pôsobení kyseliny (3-7 dní) a po následnej neutralizácii kyseliny pomocou sódy bikarbóny bola vzorka voľne vysušená a odhalené kosti saturované roztokom lepidla a acetónu (pomer približne 1:10). Celý postup bolo nutné niekoľko krát opakovať, pokiaľ na kranialnom a postkranialnom skelete nezostali len malé zvyšky horniny. Tie boli následne odstránené mechanicky.

Anatomické detaily boli pozorované pomocou binokulárnej lupy Carl Zeiss. Na rekonštrukciu pôvodného tvaru lebky bol zhotovený jej 7-násobne zväčšený trojrozmerný model. Väčšina modelu je odvodená z najlepšie zachovaného jedinca (MHK 61803), anteriórna časť lebkovej strechy a podnebia (premaxila, septomaxila, nazále, vomer) bola doplnená na základe jedinca rovnakej veľkosti (MHK 61804).

Ďalšie jedince druhu *D. pulcherrimus* a *D. austriacus*, použité na porovnanie, sú uložené v Slovenskom národnom múzeu a na Katedre ekológie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave.

Výsledky a diskusia

Lebka

Zaradenie jedincov MHK 61803 a MHK 61804 k druhu *Discosauriscus pulcherrimus* je podložené: (1) tvarom postorbitále a jugále; (2) charakterom vzájomného spojenia jugále a postorbitále; (3) tvarom prefrontále a postfrontále; (4) pozíciou ich vzájomného kontaktu; (5) morfológiou ventrálneho povrchu podnebných kostí a usporiadaním prítomných zúbkov; (6) zúženou oblasťou medzi posteriorným okrajom orbity a otickým zárezom [3], čo je podporené aj zhotoveným modelom lebky.

Napriek veľmi dobrému zachovaniu jedincov MHK 61803 a MHK 61804 sa nepodarilo nájsť ďalšie rozlišovacie znaky medzi druhmi *D. pulcherrimus* a *D. austriacus*.

Na dorzálnom povrchu koreňa parasfenoidu jedinca MHK 61804 sú v anteriórnej časti vyvinuté výrazné hrebene, podobne ako u *D. austriacus*. Tento znak je u druhu *D. pulcherrimus* pozorovaný po prvý krát. Na mediálnom a laterálnom okraji palatálneho rámsu pterygoïdu sú viditeľné plytké ryhy oddeľujúce jednotlivé rady malých zúbkov (MHK 61803, menej výrazné MHK 61804).

Dorzálny povrch dermálnych kraniálnych kostí je ornamentovaný, pričom jeho intenzita a charakter sú medzi obidvoma jedincami odlišné. To poukazuje na pomerne výraznú individuálnu variabilitu medzi jedincami, podobne ako u *D. austriacus* [8].

Stopy po senzorickej systéme sú dobre vyvinuté na exokraniálnych kostiach MHK 61804, no u MHK 61803 sú viditeľné len v anteriórnej časti lebky. Nazolakrimálny kanál MHK 61804 je z dorzálnej strany otvorený až po anteriórnu tretinu dĺžky lakrimále, jedinec MHK 61803 má nazolakrimálny kanál takmer úplne uzavretý. Squamózum a quadrátjugále u jedinca MHK 61803 sú anteroposteriórne dlhšie ako u MHK 61804. Zuby ľavej maxily MHK 61803 sú na báze jemne ryhované a ich dentín sa v týchto miestach začína mierne zahýbať. U obidvoch jedincov sú osifikované len niektoré kosti endokránia (bazisfenoidná časť ethmosfenoidu, baziokcipitále, exokcipitále), palatoquadráta (epipterygoid) a stapes. Ani u jedného jedinca neboli nájdené quadrátum a articuláre. Na základe týchto znakov je možné povedať, že jedinec MHK 61804 predstavuje larválne ontogenetické štádium a jedinec MHK 61803 už bol v štádiu metamorfózy, čo tiež potvrdzujú znaky opísané pre druh *D. austriacus* [8, 3, 9] a pre niektoré temnospondyly [10].

Postkraniálny skelet

Takmer kompletný, trojrozmerné zachovaný postkraniálny skelet je zachovaný len u jedinca MHK 61804. Je slabo osifikovaný, karpálne a tarzálne elementy nie sú osifikované

vôbec. Hoci je postkraniálny skelet jedinca MHK 61804 doposiaľ najlepšie zachovaným pre druh *D. pulcherrimus*, žiadne výrazné odlišnosti od postkraniálneho skeletu druhu *D. austriacus* neboli nájdené.

Porovnaním postkraniálneho skeletu MHK 61804 so znakmi súvisiacimi s ontogenetickými zmenami, ktoré boli opísané na postkraniálnom skelete druhu *D. austriacus* [4], predstavuje jedinec MHK 61804 larválne vývojové štádium. To podporujú aj znaky na lebke, opísané vyššie. No na spresnenie ontogenetických zmien postkraniálneho skeletu druhu *D. pulcherrimus* je potrebný ďalší materiál.

Záver

Dva nové jedince druhu *Discosauriscus pulcherrimus*, nájdené v Boskovickej panve na lokalite Kochov-Horka (Česká republika), predstavujú doposiaľ najlepšie zachované jedince tohto druhu. Avšak, na detailné porovnanie morfológie a ontogenetických zmien skeletu druhu *D. pulcherrimus* s ostatnými diskosauriscidmi, je potrebné väčšie množstvo dobre zachovaného materiálu.

Pod'akovanie

Touto cestou sa chcem poďakovať Doc. Jozefovi Klembarovi (Katedra ekológie, UK Bratislava) za poskytnutie materiálu na štúdium a Dr. Andrejovi Čerňanskému (Senckenberg Research Institute, Frankfurt) za cenné rady a pripomienky.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Klembara J., Meszároš Š. (1992) Geol. Carp. 43(5), p. 305
- [2] Makowsky A. (1876) Über einen neuen Labyrinthodonten *Archegosaurus austriacus* nov. spec. Sitzungsber. d.k. Akad. d. Wissenschaft. 73, p. 155
- [3] Klembara, J. (1997) The cranial anatomy of *Discosauriscus* Kuhn, a seymouriamorph tetrapod from the Lower Permian of the Boskovice Furrow (Czech Republic). Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B. 352, p. 257
- [4] Klembara J., Bartík I. (2000) The postcranial skeleton of *Discosauriscus* Kuhn, a seymouriamorph tetrapod from the Lower Permian of the Boskovice Furrow (Czech Republic). Trans. R. Soc. Edinburgh: Earth Sci. 90, p. 287
- [5] Klembara J. (2005) Acta Palaeontol. Polonica. 50(1), p. 25
- [6] Klembara J. (2009) Annals of Carnegie museum. 77(4), p. 451

- [7] Štamberg S., Zajíc J. (2008) Carboniferous and Permian faunas and their occurrence in the limnic basins of the Czech Republic. Museum of Eastern Bohemia at Hradec Králové, H.R.G. Litomyšl, p. 9
- [8] Klembara J. (1995) The external gills and ornamentation of skull roof bones of the Lower Permian tetrapod *Discosauriscus* (Kuhn 1933) with remarks to its ontogeny. *Paläont. Z.* 69, p. 265
- [9] Klembara J. (2009) New cranial and dental features of *Discosauriscus austriacus* (Seymouriamorpha, Discosauriscidae) and the ontogenetic conditions of *Discosauriscus*. *Special Papers in Paleontology.* 81, p. 61
- [10] Boy J. A., Sues H. D. (2000) Branchiosaurs, larvae, metamorphosis and heterochrony in temnospondyls and seymouriamorphs. In: Heatwole H., Carroll R. L. (eds.) *Amphibian biology*, 4, palaeontology. Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton, p. 1150

Geophysical survey of Rossnaree Enclosure, Bru na Boine, Ireland

Igor Murin

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra aplikovanej
a environmentálnej geofyziky, Mlynská dolina, 842 15, Bratislava 4, Slovensko
murini@fns.uniba.sk*

Abstract

The site Rossnaree is part of Bru na Boine World Heritage Site (WHS). It was first identified through field walking as a dense lithics scatter on the surface of tillage field, which suggested intense activity, possible even settlement, broadly dating to the Neolithic period. Subsequently a number of phases of follow-up survey work were undertaken. However a little light was shed on the nature of prehistoric activity at the site. It was proposed to carry out further more complex and detailed geophysical survey. These surveys were carried out at significantly higher resolution than the initial geophysical surveys and revealed additional details and further anomalies not previously identified.

***Key words:** World Heritage Site (WHS); lithics scatter; Neolithic; geophysical survey*

Introduction and purpose

Rossnaree is part of Bru na Boine World Heritage Site WHS known for its many Neolithic passage tombs and other archaeological monuments. Given the importance of questions relating to the nature of Neolithic settlement in the Brú na Bóinne area Lithics scatter project was established. As a component of the project the assessment of remote sensing techniques and geophysical survey was included [1,2].

The site itself is located in the western corner of the bend of the Boyne, on the southern side of the river, a highly significant location within the Brú na Bóinne complex. It marks the point at which the river begins to delineate the ‘bend’ of Brú na Bóinne and is located directly to the SW and across the River Boyne from the Knowth passage tomb. It is located on a low knoll on the first gravel terrace above the river. The Brue Boyne landscape today is mainly composed of flood plain and terraces of River Boyne [1].

The site was first discovered during a systematic surface collection survey as a large, dense scatter of worked lithics „**Fig. 1**“ focused on a low knoll in the NE corner of a tillage field. The lithics suggested intensive activity, possibly involving residential settlement, broadly dating to the Neolithic period [2].

Follow up to the discovery of the lithics scatter in 2004 was used a combined topographic and reconnaissance topsoil magnetic susceptibility survey, which shows anomaly

appeared to be related to a small topographic rise in NE corner of the field. Subsequently in 2008 magnetic gradiometer and as well earth resistance revealed the presence of an enclosure. In 2009 Earth Resistivity Tomography (ERT) and Ground penetrating Radar (GPR) survey was used on the site before a test excavation was conducted at the edge of the core area. The ERT results confirmed outer ditches but the GPR results were disappointing with weakened response and little correlation with ERT [2].

The aim of the geophysical survey in 2010 and 2011 was to obtain more information about the site and help identify archaeological features of Neolithic origin.

Materials and Methods

Archaeological geophysics may be defined as the investigation and interpretation of subsurface archaeological remains, as part of non-invasive survey techniques, instrumentation and software, developed to measure, record and display graphically or otherwise the localised physical properties of the Earth. The detection of subsurface archaeological features, however, is dependent on a number of variables, and each geophysical technique will have its own strengths and limitations in this regard. Geophysical images are not maps but graphical representations of the differential physical properties in our studied area and require interpretation to identify anomalies of potential archaeological significance. Each geophysical survey technique relies on the existence of contrasts between the physical properties of the buried archaeological features and those of its surrounding soil or background medium. For this reason, a survey strategy that includes the use of a number of differing or complementary geophysical methods, each measuring a different property of the soil, is clearly desirable and offers greater scope for a more meaningful archaeological interpretation. Topographical maps serve as a base map for geophysical survey and Topographical work proves to be an important interpretational tool on its own. In some instances detailed survey provides an interpretational line map of surface features in addition [3].

In this project of geophysical survey were used Magnetic survey methods as Magnetic susceptibility: which measure the ability of and degree to which the soil and objects buried within become magnetised in the presence of an external magnetic field, it is normally expressed in SI units (International System of Units). And the Magnetic Gradiometer: which registers the variation in the vertical component of the Earth magnetic field over the surveyed area, measured in nanoTesla. Electrical methods as electrical resistance: measured in Ohms (Ω), as the ratio of the potential difference (volts) to the electrical current (amps) $R=V/I$ of measured material, in this case the soil and objects buried within. And electrical resistivity: p

(rho) as the resistance of a 1m^2 of the material given a potential difference of 1 volt applied between opposite faces of the cube. The unit of resistivity is the $\Omega\text{-m}$ (ohm-metre). The method of this procedure measuring vertical apparent resistivity variations along the traverse line is known as electrical resistance tomography (ERT).

At the geophysical survey in 2010 and 2011 on the Rossnaree site, approximately $120 \times 100\text{m}$ in size, were used methods: Magnetic Susceptibility combined with detailed topographical survey on a grid of approximately $5\text{m} \times 5\text{m}$, Magnetic gradient in parallel lines with $0,5\text{m}$ separation, earth resistance with $0,5\text{m}$ step of recorded measurements in parallel lines with $0,5\text{m}$ separation and earth resistivity tomography profile across the identified circular ditches.

Results and discussion

These surveys were carried out at significantly higher resolution than the initial surveys and revealed additional detail and further anomalies not previously identified. Magnetic susceptibility data „**Fig. 2**“ show a systematic zonation of enhancement over the core area.

Magnetic gradiometry data „**Fig. 4**“ further define the enhancement and reveal features including a ditched oval enclosure some $30\text{m} \times 26\text{m}$ in size in the core area, located at the top of the knoll or topographic high. Earth resistance data confirm the ditch and in the south west show it to lie in the presumed sediment field natural channel, which correspond with the course of topography „**Fig. 3**“.

From the magnetic gradiometry survey results seems that the potentially early feature - enclosure appears to be quite different in character, it shows to be narrower and less defined than the other enclosures and is almost undetected by earth resistance. The plot also shows that it is clearly cut by the oval enclosure „**Fig. 4**“ (marked with a red circle) suggesting a relative chronological relationship between the features. The circular cut feature has higher positive magnetic gradient, and possible a centrally placed posthole and there are other possible pits or postholes immediately outside it. The magnetic susceptibility plot also shows area of enhanced magnetic susceptibility to the north of the main area of enhancement.

Excavation largely confirmed the geophysical interpretation and by dating of artefacts, results seem to indicate that the excavated archaeological features are not Neolithic in date and question of the nature, activity and location of the population in Neolithic times remains unclear. While the major features on the site are likely to date to the early medieval period,

the archaeological potential of some geophysical anomalies identified in detailed geophysical survey may be potentially prehistoric in date. Prehistoric activity on the site has been established by the presence of a large dense surface lithic scatter.

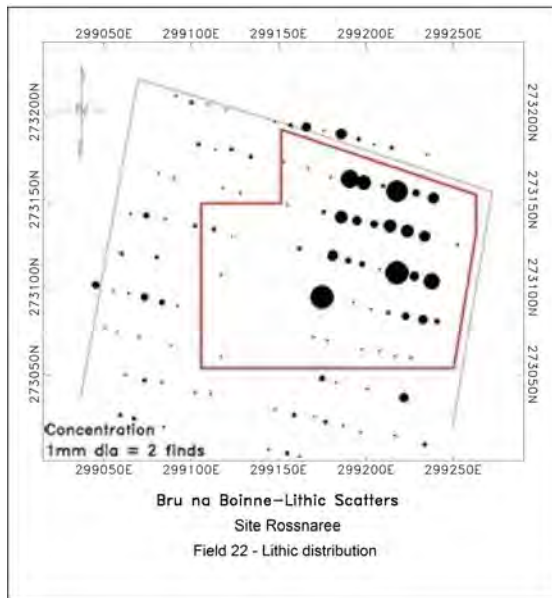


Fig.1 Lithic distribution [1]

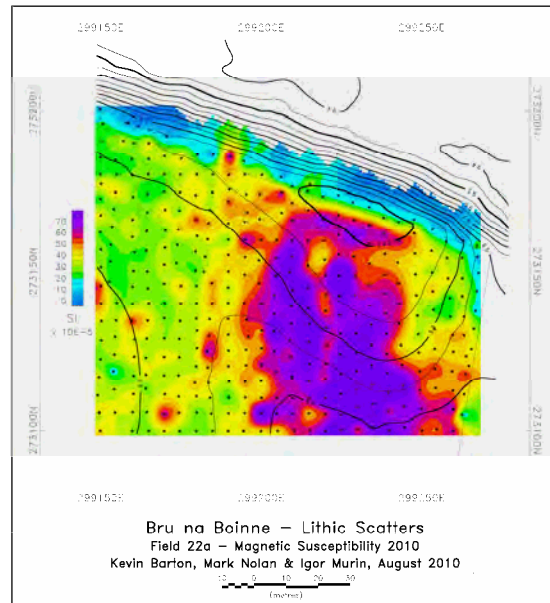


Fig.2 Magnetic susceptibility [1]

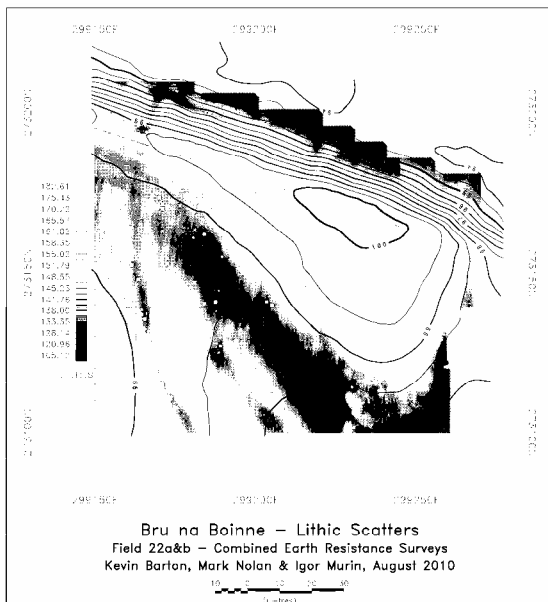


Fig.3 Earth resistance [1]

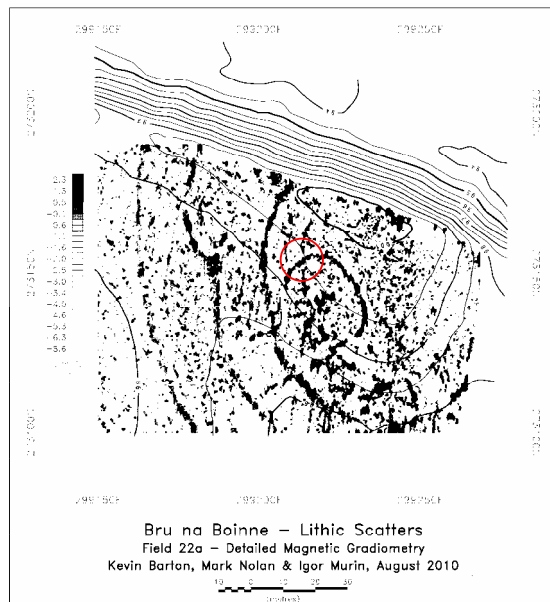


Fig.4 Magnetic gradiometry [1]

Conclusion

This geophysical survey helped to add and improve the knowledge of this site and target the most potential locations for excavation. During this long period of investigation it also showed needs of developing new, refined methodologies in searching for new sites.

Acknowledgements

I would like to thank to Kevin Barton and Conor Brady for supervision and organisation of this project. As well thank for financial support by grant (VEGA: V-12-124-00 Paleoprostredie neandertálcov na území Slovenska v kontexte klimatických zmien počas vrchného pleistocénu).

Reference

- [1] The Rossnaree Archaeological Project Blog [Citation: 7. March 2013]
<<http://rossnareedig.wordpress.com/>>
- [2] Barton, K. and Brady, C. (2010) Towards an Integrated, Multi-method Remote Sensing Strategy for Archaeological Landscape Analysis: the Discovery of the Rosnaree Enclosure, Brú na Bóinne World Heritage Site, Co Meath, Ireland, Poster presented at International Aerial Archaeology Conference, Aerial Archaeology Research Group, Bucharest, Romania
- [3] Barton K., Waddell J, Fenwick J (2009) Rathcroghan Archaeological and geophysical survey in a ritual landscape. Wordwell, Ireland, p. 18

Geoelektrické merania v strednej časti dunajskej panvy

Mariana Pašiaková¹, Helena Tkáčová¹, Miroslav Bielik¹

¹*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra aplikovanej a environmentálnej geofyziky, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko;
pasiakova@centrum.sk*

Abstrakt

The central depression of the Danube Basin is filled with water-bearing beds that consist of gravels and sands. These beds form one of the most important water-bearing complexes in Central Europe. The main source of water supply in these beds is represented by water infiltration from the Danube River. The goal of this thesis is to construct a quantitative geoelectric model of gravelly and sandy beds in the central part of the Danube basin, using reinterpreted data from a database with geophysical measurements VES.

Kľúčové slová: VES; kvantitatívna interpretácia; kvartér; dunajská panva

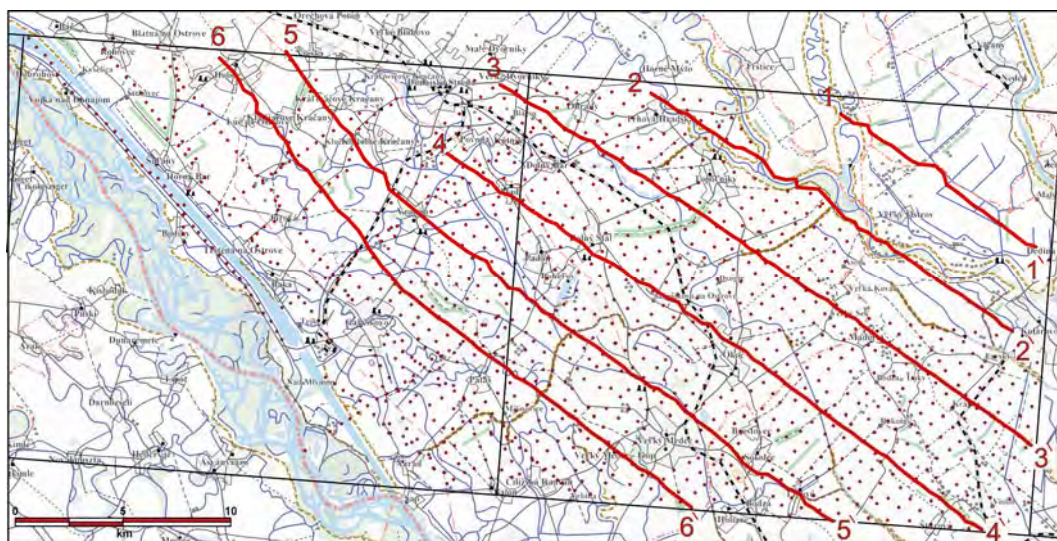
Úvod a formulácia cieľa

Našou úlohou je vytvoriť čo najpresnejší model štrkopiesčitého súvrstvia v strednej časti dunajskej panvy, na mapových listoch 1:50 000 číslo 45-31 a 45-32. V priebehu riešenia tejto úlohy máme k dispozícii rozsiahle množstvo geoelektrických údajov špecifického charakteru prebraté z archívu Geofondu. Dáta sú vo forme geoelektrických meraní VES (vertikálne elektrické sondovanie), z ktorých sme vytvorili 9 vodiacich geoelektrických kvantitatívnych rezov. Tieto prvotné geoelektrické rezy nám poslúžia na lepšiu orientáciu v sedimentárnom priestore panvy a neskôr poslúžia na upresnenie modelu štrkopiesčitého súvrstvia.

Materiál a metódy

V praxi existuje množstvo interpretačných postupov na interpretáciu VES. Rozdeľujeme ich na 3 hlavné smery, na kvalitatívnu interpretáciu, na kvantitatívnu interpretáciu a využívanie štatisticko-empirických metód [1]. V našej úlohe sa vykonala prvotná kvantitatívna interpretácia na vybratých geoelektrických rezoch. Na mapových listoch 45-31 a 45-32 sa zvolilo 9 hlavných vodiacich geoelektrických horizontov „Obr.1“. Z týchto 9 geoelektrických rezov bolo kvantitatívne zinterpretovaných 6, rez 1-1' až 6-6'. Rezy 7-7' až 9-9', situované v juhozápadnej časti skúmaného územia budú zinterpretované v blízkej budúcnosti. Vybrané geoelektrické horizonty sú vzdialené od seba 2,5 km a sondážne body na profile sú vzdialené od seba približne 500 m. Na kvalitatívnu

interpretáciu sme použili softvér Ves Interpretation (VesInt). VesInt je geofyzikálny softvér vyvinutý na oddelení geofyziky Prif UK v roku 2001. Program sa špecializuje na 1D interaktívnu interpretáciu sondážnych kriviek VES. Keďže kvantitatívna interpretácia je nejednoznačná úloha, na upresnenie výsledkov sme použili vrty zo skúmanej oblasti, ktoré sa prevzali z archívu vrtnej preskúmanosti oddelenia Geofondu Štátneho geologického ústavu Dionýza Štúra v Bratislave.



Obr. 1 Orientácia geoelektrických profilov na sledovanom území

Výsledky a diskusia

Pomocou programu VesInt sa vyčlenili odporové rozhrania na profiloch a rozčlenili sa profily na jednotlivé odporové horizonty. V sledovanej oblasti sa vyskytujú tri hlavné odporové horizonty A, B a C, charakteristické svojimi odporovými vlastnosťami. Geoelektrický horizont A sa nachádza vo vrchnej časti rezov, tesne pod pripovrchovým horizontom. Pripovrchový horizont, ktorý leží nad horizontom A a jedná sa o sedimenty do cca. 2m, sa do rezov kvôli prehľadnosti nekreslil. Táto vrstva sa vyznačuje veľmi veľkou variabilitou odporov, ktorá je ovplyvnená nielen samotným zložením sedimentov, ale aj vlhkosťou horninového prostredia.

Horizont A sa vyznačujemerným odporom od 180 - 600 ohmm. Celý tento komplex hornín, podľa parametrických meraní na vrtoch a podľa doterajších geologických poznatkov, prisudzujeme hrubozrnným štrkopieskom. Hrúbka týchto sedimentov narastá od severu na juh, pričom najväčšie hrúbky (250 až 900 m) dosahuje na profile 6-6' v oblasti južne od obce Holice a na profile 5-5' v oblasti obce Kráľovičove Kračany. Hrubozrnné štrkopiesčité

sedimenty sa nachádzajú iba na profiloch 6-6' až 3-3'. Na profiloch 1-1' a 2-2' sa horizont hrubozrnných štrkopieskov nenachádza, nachádzajú sa tam iba sedimenty horizontu B a C.

Horizont B sa nachádza priamo pod horizontom A. Je charakterizovaný o niečo nižšími mernými odporami ako horizont A. Merné odpory horizontu B sa menia v rozmedzí 70 až 280 ohmm. Tieto sedimenty sú vyvinuté vo forme štrkopieskov s menšími valúnkami štrkov a vyšším obsahom piesčitej prímеси ako v geoelektrickom horizonte A. Maximálne hrúbky týchto sedimentov sú registrované v rezoch 6-6' a 5-5', v oblasti medzi obcami Holice a Vrakúňom. Sedimenty horizontu B sa nachádzajú na všetkých vodiacich profiloch.

Horizont C je charakterizovaný najnižšími odporami od 10 do 70 ohmm. Horizont sa nachádza v celej sledovanej oblasti pod horizontom B. Sedimenty horizontu C sú zastúpené ílmi až piesčitými ílmi.

Variabilita odporov v jednotlivých geoelektrických odporoch nám hovorí o priestorovej variabilite sedimentov, so zvyšovaním merných odporov nám pribúda hrubozrnejšia frakcia a jemnozrnné íly ustupujú a so znižovaním merných odporov nám pribúda jemnozrnejšia ílovitá frakcia.

Záver

V oblasti strenej časti dunajskej panvy na mapových listoch s číslom 45-31 a 45-32 sa zvolilo 9 hlavných vodiacich geoelektrických rezov. 6 geoelektrických rezov sa pomocou kvantitatívnej interpretácie rozčlenilo na 3 hlavne geoelektrické horizonty A, B a C. Horizont A je zastúpený hrubozrnnými štrkopieskami, horizont B je zastúpený jemnozrnejšími štrkopieskami až pieskami a horizont C je zastúpený ílmi až piesčitými ílmi. Geoelektrické rezy nám poslúžia na lepšiu orientáciu v sedimentárnom priestore panvy a použijú sa na upresnenie modelu štrkopiesčitého súvrstvia.

Pod'akovanie

Príspevok bol vypracovaný za podpory projektu VEGA 1/0095/12 - Interpretácia anomálnych zdrojov geofyzikálnych polí s cieľom skvalitniť poznatky o stavbe a dynamike karpatského karpatského orogénu. Ďakujeme.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Karous M. (1989) Geoelektrické metódy průzkumu. SNTL Praha, ISBN 80-03-0035-1, p. 16

Predbežné výsledky analýzy krehkých štruktúr v severnej časti Považského Inovca a príľahlých oblastiach

Ondrej Pelech

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra geológie
a paleontológie, Mlynská dolina, 84215, Bratislava, pelech@fns.uniba.sk*

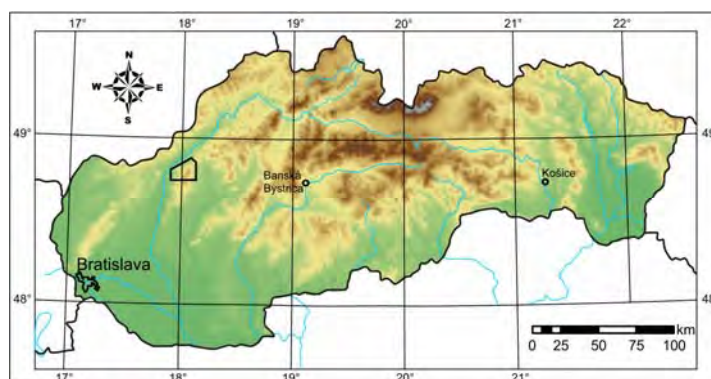
Abstrakt

Northern portion of the Považský Inovec Mts. (Selec block) and adjacent portion of the Strážovské vrchy Mts. carry long record of several paleostress configurations. Preliminary results of paleostress analysis in the investigated area of the Selec block show general trend of rotation of compressive stress from the W-E direction after the Early Cretaceous up to the N-S orientation in the Middle Miocene. The Late Miocene and younger neotectonic faults were reactivated or neoformed dominantly in the mode of orogen-parallel extension. Analysis of faults from the area of Mnichova Lehota quarry does not provide such simple picture and will require further investigation. However this locality provides more information about extension in the Bánovská kotlina depression and uplift of Považský Inovec Mts.

Kľúčové slová: Považský Inovec; selecký blok, štruktúrna geológia; paleonapäťová analýza

Úvod a ciele

Považský Inovec vystupuje vo forme hrastovej štruktúry v severnej časti Dunajskej panvy, oddeľujúc od seba miocénne depocentrá Trenčianskej a Bánovskej kotliny a blatnianskej a rišňovskej depresie (**obr. 1**). Hrať obnažuje pomerne hlboko exhumované komplexy, ktorých vnútorná stavba je dôsledkom viacerých fáz alpínskej deformácie, výrazne postihujúcej nielen sedimentárne obalové jednotky a príkrovy fatrika a hronika ale aj horniny fundamentu [1].



Obr. 1 Poloha skúmanej oblasti na rozhraní severnej časti Považského Inovca a Strážovských vrchov.

Severná časť Považského Inovca je považovaná za najspodnejší obnažený element stavby Centrálnych Západných Karpát. Vzhľadom na prevažujúce postihnutie duktilnou deformáciou, prítomnosť starších hercýnskych deformačných štruktúr, masu hercýnskych

diaftoritov a celkovo slabú odkrytosť je skúmaná oblasť chudobná na krehké mezoskopické štruktúry. Táto práca podáva predbežné výsledky kinematickej a paleonapät'ovej analýzy krehkých mezoskopických štruktúr získaných v severnej časti Považského Inovca a v kameňolome Mníchova Lehota na okaji Strážovských vrchov. Cieľom tejto práce je určenie smeru a kinematického charakteru zlomov, vyjadrenie orientácie napätia, ktoré ich generovalo a pokus o ich predbežné časové zaradenie.

Materiál a metódy

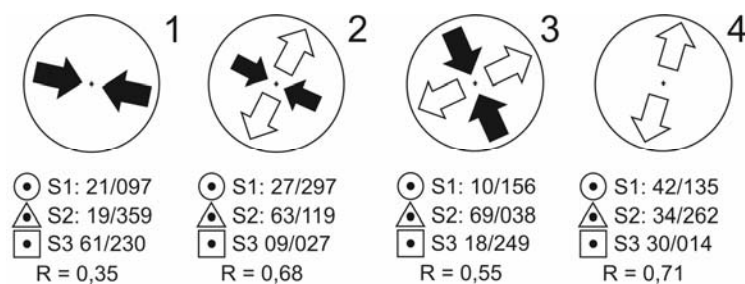
Študovaná oblasť zahŕňala predovšetkým výskyt hornín mezozoického a vrchnopaleozoického veku a horniny fundamentu inkorporované do imbrikovanej stavby na severozápade pohoria (tzv. hôrčanské šupinové pásmo). Krehké štruktúry zaznamenané v kameňolome Mníchova Lehota boli situované vo vrchnotriasových wettersteinských vápencoch hronika.

Zlomy sú prejavom deformácie vrchnej kôry v hĺbkach do 10 – 15 km. Vznikajú spájaním mikroskopických a neskôr makroskopických puklín pri progresívnej deformácii. Interpretácia ich kinematického charakteru je založená na pozorovaní mezoskopických zlomov – tektonických zrkadiel, ktoré podľa princípu veľkostnej invariantnosti odrážajú aktivitu megaskopických zlomov, ktoré pre zakrytosť terénu nemožno pozorovať. Kinematické indikátory pohybu blokov predstavujú striácie a asymetrické štruktúry na povrchu zrkadiel, predovšetkým minerálne akrečné stupne, ktoré možno považovať za najspoľahlivejšie indikátory [2, 3]. Paleonapät'ová analýza bola interpretovaná z 31 tektonických zrkadiel zo severu Považského Inovca a 29 zrkadiel z kameňolomu v Mníchovej Lehote. Zrkadlá z oboch lokalít boli analyzované priamou inverznou metódou [4] pomocou programu Tectonics FP [5]. Najprv boli touto metódou analyzované zrkadlá vyseparované a rozdelené do homogénnych populácií. Následne boli jednotlivé populácie samostatne interpretované.

Výsledky a diskusia

Napriek absencii výskumov paleonapätí pre túto oblasť možno usudzovať o aktivite pozorovaných zlomov na základe širších regionálnych súvislostí [6] a výskumu z Brezovských Karpát [7] a Strážovských vrchov [8]. Tektonické zrkadlá získané na území Považského Inovca reprezentujú 4 populácie zlomov (**obr. 2**). Prvú, relatívne najstaršiu deformačnú udalosť predstavuje kompresia ZSZ-VJV smeru zaznamenaná populáciou

prešmykov a sinistrálnych smerných posunov hlavne v horninách kryštalinika aj v celkoch meozoického veku, vrátane olistolitu vo vrchnokriedových sedimentoch belickej jednotky. Druhá udalosť zaznamenaná hlavne v horninách kryštalinika predstavuje populáciu sinistrálnych bočných posunov a poklesov, zodpovedá kompresnej fáze SZ-JV smeru, relaxovanej SV-JZ extenziou. Tretia udalosť zaznamenaná v kryštalinických aj mezozoických komplexoch je tvorená hlavne dextrálnymi smernými posunmi, zodpovedá kompresnej fáze SSZ-JJV smeru relaxovanej ZJZ-VSV extenziou. Posledná zaznamenaná udalosť zodpovedá SSV-JJZ extenzii generujúcej hlavne poklesové zlomy.

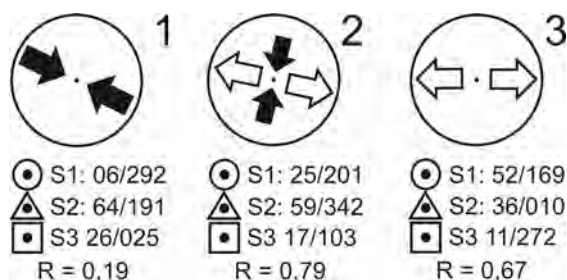


Obr. 2 Paleonapät'ové udalosti zaznamenané v seleckom bloku Považského Inovca.

Predbežné časové zaradenie jednotlivých paleonapät'ových udalostí v priestore Považského Inovca sa opiera hlavne o koreláciu s okolitými oblasťami, čiastočne aj o koreláciu s mapovými štruktúrami a smermi duktilných štruktúr známych z Považského Inovca. Prvú paleonapät'ovú udalosť možno považovať za po-vrchnokriedovú, zodpovedajúcu uzatváraniu belického bazénu, čo možno korelovať aj s orientáciou B-osí vrás vo vrchnokriedových horninách. Druhú paleonapät'ovú udalosť možno korelovať s vrchno-paleogénno-spodnoegenburskou kompresnou udalosťou známou z oblasti Vaďovskej depresie. Vek tretej paleonapät'ovej udalosti možno na základe analógie z okolitých oblastí označiť za egenburský až karpatský. V dôsledku možnej rotácie blokov, tento istý smer štruktúr mohol byť reaktivovaný aj v pliocénno-kvartérnej orogén-paralelnej extenzii, ktorú predstavuje aj posledná známa paleonapät'ová udalosť.

Tektonické zrkadlá získané z kameňolomu v Mníchovej Lehote a bezprostrednom okolí reprezentujú 3 populácie zlomov (**obr. 3**). Najstaršiu paleonapät'ovú udalosť predstavuje ZSZ-VJV kompresia v smerne posuvnom režime generujúca prešmyky a smerné posuny. Zaradenie nasledujúcich udalostí je komplikovanejšie. Za druhú paleonapät'ovú udalosť možno považovať transtenziu so ZSZ-VJV orientovanou extenziou a SSV-JJZ kompresiou. Tejto udalosti však mohla predchádzať aj Z-V orientovaná extenzia, zrejme zodpovedajúca výzdvihu Považského Inovca.

Predošlé výskumy [8] považujú prvú z udalostí za spodnomiocénnu. Vek transtenzie a extenzie možno na základe orientácie regionálnych paleonapätí [6] považovať strednomiocénnu, ich postupnosť však nie je jasná a bude vyžadovať ďalšie prešetrenie.



Obr. 3 Paleonapät'ové udalosti zaznamenané v kameňolome Mníchova Lehota.

Záver

Predkladaná analýza zlomových porúch v severnej časti Považského Inovca predbežne vykresľuje paleonapät'ové udalosti súvisiace s konvergenciou bloku Centrálnych Západných Karpát s ich predpolím. Možno konštatovať všeobecný pohyb smeru konvergencie zo západu na východ a generálnu zmenu smeru z kompresie orientovanej Z-V smerom po vrchnej kriede až do pozície S-J v strednom miocéne. Analýza zlomových porúch v oblasti Mníchovej Lehoty zatiaľ tento predpoklad nepotvrďuje, poskytuje však viac informácií o extenzii Bánovskej kotliny a výzdvihu Považského Inovca.

Zber štruktúr v oblasti Považského Inovca aj kameňolomu v Mníchovej Lehote bude v budúcnosti pokračovať. Štatisticky väčší počet meraní umožní spresniť doteraz existujúce poznatky. Väčšie množstvo pozorovaní umožní tiež lepšie časovo zaradiť jednotlivé paleonapät'ové udalosti.

Pod'akovanie

Táto práca vznikla za podpory grantov VEGA 1/0712/11 a VEGA 1/0587/11. Autor je taktiež zaviazaný zamestnancom spoločnosti Kameňolomy, s. r. o. za umožnenie vstupu do kameňolomu Mníchova Lehota a T. Kľučiarovi za pomoc pri terénnom výskume.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Ivanička J., Havrila M., Kohút M. (2007) Geologická mapa Považského Inovca a JV časti Trenčianskej kotliny, 1:50 000. Regionálne geologické mapy Slovenska. Štátny geologický ústav Dionýza Štúra, Bratislava.
- [2] Marko F. (1993) Miner. Slov. 25 (4), p. 285

- [3] Doblas M. (1998) *Tectonophys.* 295 (1-2), p. 187
- [4] Angelier J. (1994) Fault slip analysis and paleostress reconstruction. In: Hancock P. L. (ed.) *Continental deformation*. Pergamon Press, Londýn, Spojené královstvo, p. 53
- [5] Reiter F., Acs P. (2002) *Tectonics FP 1.6.4 for Windows-TM*. Software for Structural Geology.
- [6] Jiříček R. (1979) Tektogenetický vývoj Karpatského oblouku během oligocénu a neogénu. In: Maheľ M. (ed.) *Tektonické profily Západných Karpát*. GÚDŠ, Bratislava, p. 203
- [7] Marko F., Kováč M. (1996) *Mineralia Slovaca*. 28 (3), p. 81
- [8] Marko F. (2012) *Mineralia Slovaca*. 44 (3), p. 213

Mikrogravimetrické merania vertikálneho gradientu na lokalite Dómu sv. Mikuláša v Trnave

Barbara Porubčanová¹, Roman Pašteka², Jaroslava Pánisová¹

¹*Slovenská akadémia vied, Geofyzikálny ústav, Dúbravská cesta 9, 845 28 Bratislava,
Slovenská republika, e-mail geofbapo@savba.sk*

²*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra aplikovanej
a environmentálnej geofyziky, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika*

Abstrakt

Cathedral of St. Nicolas in Trnava is one of localities with the most typical expression of cavities (crypts) in the measured anomalous gravitational field in Slovakia. This was the reason why experimental measuring of vertical gradient of gravity acceleration were carried out right here. Standard microgravimetry survey does not bring required results in some instances primarily when crypts are situated close to the wall. For measurements was chosen crypt which was not recorded in the previous microgravimetry surveys but one was captured by georadar measurements and videoinspection. Microgravimetry measurements of vertical gradient were realized with the assumption that the detection of crypts is possible right this method.

KLúčové slová: mikrogravimetria; vertikálny gradient; neúplná Bouguerová anomália

Úvod a formulácia cieľa

Mikrogravimetria je jednou z geofyzikálnych metód využívajúcich sa nielen v geologických sférach, ale je dôležitou súčasťou archeologického prieskumu, ktorého predmetom záujmu je aj detekcia podzemných priestorov – dutín a krýpt. Mikrogravimetrický prieskum sa stretáva s terénom, v ktorom je detekcia dutín často komplikovaná a neprináša dostačujúce výsledky. Sú to predovšetkým merania realizované v tesnej blízkosti múrov, ktorých gravitačný účinok merané tiažové zrýchlenie znižuje a oprava o ich účinok je značne komplikovaná. Práve tento fakt bol podnetom pre realizáciu pokusných meraní vertikálneho gradientu tiažového zrýchlenia za účelom detekcie krýpt práve v oblasti múrov. Pre pokusné merania bola zámerne vybraná lokalita Dóm sv. Mikuláša v Trnave, ktorá sa vyznačuje svojím typickým až „učebnicovým” prejavom podzemných priestorov.

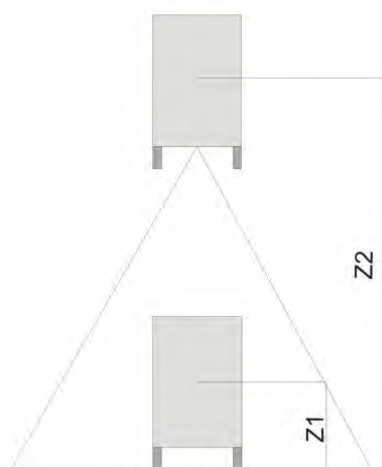
Materiál a metódy

Pre merania bola vybraná krypta, nachádzajúca sa pod podlahou štvrtej kaplnky, konkrétne na vnútornej strane ľavého obvodového múru kostola, ktorú sa predchádzajúcim mikrogravimetrickým prieskumom nepodarilo zachytiť. Pokusné merania vertikálneho gradientu tiažového zrýchlenia boli realizované s predpokladom, že podzemné priestory tohto typu sme schopní zachytiť práve spomínanou metódou.

Aproximácia gradientu tiažového zrýchlenia sa určuje (pre špeciálne účely) pomocou relatívnych gravimetrov, a to meraním rozdielu Δg medzi dvoma vertikálnymi bodmi s polohami , čo znázorňuje nižšie uvedený vzťah

$$\Delta g = \frac{2g}{R} \Delta z, \text{ kde} \quad [1.],$$

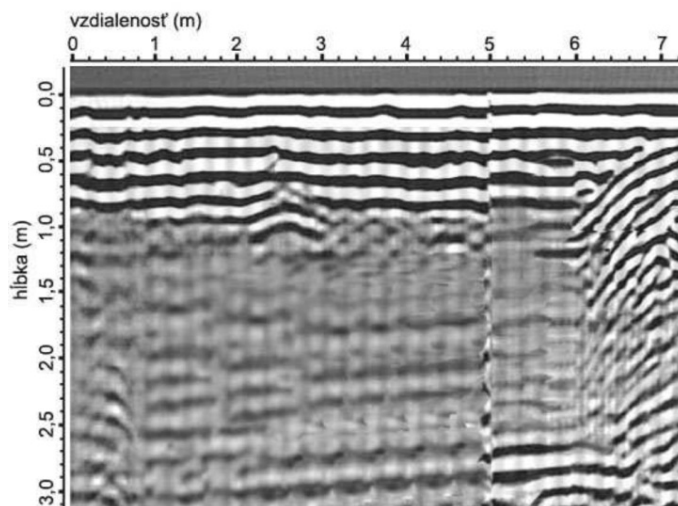
Na plošné meranie bola použitá aparátúra Scintrex CG-5, s krokom merania 1m x 1 m. Vytýčené body boli merané na podlahe a následne na statíve (s priemernou výškou 1,6m) „**Obr. 1**“. Získané dáta boli spracované osobitne pre polohy dole a zvlášť pre polohy na statíve. Oprave neúplných Bouguerových anomálií o gravitačný účinok múrov, predchádzala analýza, kde boli porovnávané rôzne hustoty modelu múru. Ako najvhodnejšia bola zvolená hustota múrov 1.4 gcm^{-3} , s ktorou boli zrátané účinky okolitých múrov. Pri výpočte Bouguerovej korekcie bola použitá korekčná hustota 1.8 gcm^{-3} . Následne sa získané hodnoty pripočítali k hodnotám neúplnej Bouguerovej anomálií. Z ich hodnôt bol zrátaný a potom formou máp zobrazený priebeh vertikálneho gradientu (ktorý bol zobrazený z interpretačných dôvodov s opačným znamienkom).



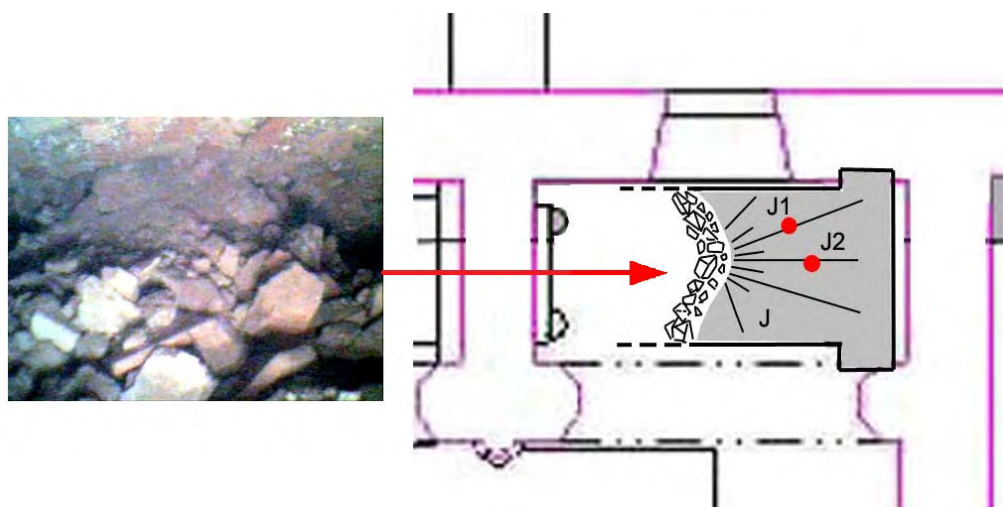
Obr. 1 Schéma usporiadania používaná pri mikrogravimetrických meraniach vertikálneho gradientu

Výsledky a diskusia

Študovanú kryptu sa podarilo zachytiť iba predchádzajúcim georadarovým prieskumom „**Obr. 2**“ a videoinšpekciou „**Obr. 3**“, ktorá okrem samotného potvrdenia existencie krypty, preukázala aj jej čiastočne zavalenie suťou.

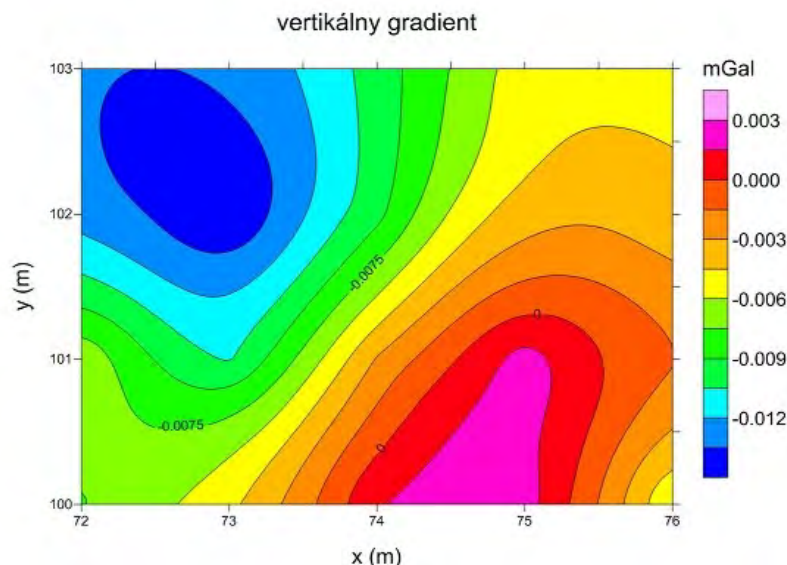


Obr. 2 Georadarový profil krypty



Obr. 3 Pôdorys krypty (ľavá časť krypty- zavalená suťou, pravá časť- dutý priestor) a pohľad na zavalenú časť krypty získaný videoinšpekciou

Predchádzajúce mikrogravimetrické merania nepreukázali existenciu študovanej krypty. Opätovnými meraniami bolo zistených niekoľko skutočností, a to zobrazením meraní na podlahe sa krypta podobne ako v predchádzajúcom prieskume jednoznačne nepotvrdila. Podobne je to možné vidieť aj na výsledkoch realizovaných z merní na státi. Výrazná zmena nastala až zrátaním a zobrazením vertikálneho gradientu, kde je možné hľadanú dutinu pozorovať, a to ako výrazné minimum študovaného poľa „**Obr. 4**“.



Obr. 4 Priebeh vertikálneho gradientu nad študovanou kryptou

Mikrogravimetrickými meraniami vertikálneho gradientu v tesnej blízkosti múrov pri detekcii podzemných priestorov, sa potvrdil predpoklad, že sme schopný oveľa presnejšie a preukázateľnejšie zachytávať dutiny (krypty) tohto typu. Nevýhoda uvádzanej metodiky tkvie v jej väčšej časovej náročnosti (zber dát v priemere zaberá 4 až 5krát viac času) v porovnaní so štandardným plošným mikrogravimetrickým prieskumom.

Záver

Ako bolo uvedené, štandardná mikrogravimetria sa pri svojom prieskum často stretáva s priestormi, v ktorých je detekcia podzemných objektov značne komplikovaná. Ide teda najmä o merania realizované v tesnej blízkosti múrov, ktoré svojim značným gravitačným účinkom (a jeho častokrát náročným odstránením z nameraných dát) narušajú celkový obraz študovanej oblasti.

Realizovaním pokusných mikrogravimetrických meraní vertikálneho gradientu na krypte v Dóme sv. Mikuláša v Trnave (ktorá nebola zaznamenaná štandardným prieskumom) sa ukázalo, že i napriek časovej náročnosti metódy, je možné krypty v kritických priestoroch preukázateľne detekovať.

PodĎakovanie

Práca bola podporená v rámci projektov VEGA č. 1/0095/12 a 2/0067/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Torge W. (1989) Gravimetry, WalterdeGruyter, Berlin- New York, p. 465
- [2] Terray M. (2006a) Správa z georadarového prieskumu Dómu sv. Mikuláša v Trnave, Manuscript, Archív mestského úradu v Trnave
- [3] Terray M. (2006b) Správa z 2. Etapy georadarového prieskumu Dómu sv. Mikuláša v – Trnave, Manuscript, Archív mestského úradu v Trnave

Hodnotenie sucha v hladinovom režime podzemnej vody vo Vyšnom Slavkove

Dagmar Stojkovová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra hydrogeológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; stojkovovad@fns.uniba.sk

Abstrakt

The main goal of the study was testing threshold values (80, 90, 97 %), which were estimated from groundwater level duration curve in object No. 5397 Vyšný Slavkov as the average value of certain percentile of groundwater level duration curves for each hydrological year of the whole evaluated period (master curve) 1982 – 2010. It will be showing the differences in numbers of dry periods and in drought intensity as well as in percentual share of the dry periods duration during each hydrological year. Hydrogeological drought was estimated using the TLM 2.1 module from the HydroOffice 2010 software package. Meteorological drought was classified using the year wetness classification, where dry years were those, with the annual precipitation amount under the 90 % of the average long-term annual precipitation value. Adjusted classification of hydrogeological drought proposed by Slivová was applied on identification of drought in altitude of groundwater level.

KLúčové slová: *meteorologické sucho; prahová hodnota; hydrogeologické sucho*

Úvod a formulácia cieľa

Sucho sa začína prejavovať najprv v atmosfére, a to nedostatkom zrážok [1], čo spolu so zvýšenou evapotranspiráciou spôsobuje znížené dopĺňanie podzemných vôd. Veľkosť dopĺňania je ovplyvnená i vlastnosťami pôdy, vegetačným pokryvom a hĺbkou hladiny podzemnej vody, ktorá môže byť ovplyvnená ešte evapotranspiráciou. Následkom spomínaných vplyvov dochádza k poklesu hladín podzemných vôd, ktoré odrážajú stav zásob podzemných vôd na určitom mieste a v určitom čase.

Wilhite a Glantz [2] rozčlenili súbor definícií sucha do štyroch kategórií, a to na sucho meteorologické, hydrologické, poľnohospodárske a socio-ekonomické. Sucho v podzemnej zložke hydrosféry sa zaraďuje k hydrologickému suchu. Ak sa berie do úvahy aj vplyv hydrogeologických vlastností horninového prostredia, v ktorom sa formuje napr. podzemný odtok, kolísanie hladiny podzemnej vody alebo výdatnosť prameňa hovoríme o hydrogeologickom suchu [3].

Hodnotené územie vo Vyšnom Slavkove leží v povodí Torysy a patrí do stredohorskej oblasti so snehovo-dažd'ovým režimom odtoku [4]. Z hľadiska geomorfologického členenia je pozorovaný objekt č. 5397 situovaný v Podhôrno-magurskej oblasti v kvartérnych (hlina

piesčité, dolomitická sut') a mezozoických (trias – dolomit sivý až tmavosivý, tektonicky porušený) sedimentoch [5].

Cieľom práce bolo identifikovať hydrogeologické sucho v hladinovom režime podzemnej vody v pozorovacom objekte Vyšný Slavkov, a to testovaním viacerých prahových hodnôt.

Materiál a metódy

Predkladaný článok bol vypracovaný na základe údajov poskytnutých Slovenským hydrometeorologickým ústavom (SHMÚ) o úrovni hladiny podzemnej vody a úhrnoch zrážok v predmetnom území za obdobie hydrologických rokov 1982 – 2010. Tieto boli využité pri hodnotení sucha.

Na hodnotenie meteorologického sucha bola použitá klasifikácia podľa Majerčákovej et al. [6], ktorá hodnotí vodnosť rokov na základe pomeru zrážkového úhrnu konkrétneho roka a dlhodobého zrážkového normálu. Bol použitý zrážkový normál za obdobie 1961 – 1990. Klasifikácia roka z hľadiska vlhkosti je uvedená v **Tab. 1**.

Tab.1 Klasifikácia roka z hľadiska vlhkosti

< 70 %	mimoriadne suchý rok (MS)
70 – 80 %	veľmi suchý rok (VS)
80 – 90 %	suchý rok (S)
90 – 110 %	normálny rok (N)
110 – 120 %	vlhký rok (V)
120 – 130 %	veľmi vlhký rok (VV)
> 130 %	mimoriadne vlhký rok (MV)

Pre charakterizovanie hydrogeologického sucha boli stanovené prahové hodnoty zodpovedajúce 80, 90 a 97 percentilu čiary prekročenia hladiny podzemnej vody priamo z nameraných hodnôt v týždennom kroku, pretože podľa STN 75 1510 [7] v oblasti podzemných vôd je vhodné používať len reálne rady, čo má i praktickejší význam. Hodnoty uvedených percentilov boli vypočítané ako priemerná dlhodobá hodnota vypočítaná z percentilov čiar prekročenia jednotlivých rokov.

Sucho v úrovni hladiny podzemnej vody bolo hodnotené metódou prahovej hodnoty, ktorá je ako modul TLM 2.1 zahrnutá v programe HydroOffice 2010 vytvorenom Gregorom [8]. Program umožňuje spracovať celý časový rad údajov a podľa zadanej prahovej hodnoty určí začiatok a koniec trvania sucha. Zadefinuje pritom aj dĺžku trvania v dňoch. Keďže úrovne hladín sú merané v spomínanom týždennom kroku, pre dosiahnutie reálnejšieho

trvania sucha v dňoch boli v tomto prípade v programe použité interpolované hodnoty. Na základe výsledkov bolo nepretržité trvanie hydrogeologického sucha klasifikované stupnicou, ktorá je upravená podľa pôvodnej stupnice podľa Slivovej [3] ako extrémne sucho (>98 dní), veľmi sucho (50 – 98 dní) a mierne sucho (7 – 49 dní).

Výsledky a diskusia

V **Tab. 2** sú uvedené výsledky hodnotenia meteorologického sucha v zrážkomernej stanici Vyšný Slavkov. Vo Vyšnom Slavkove bol podľa vlhkosti roka klasifikovaný rok 1982, 1986, 1993, 2003 ako veľmi suchý a rok 1984 ako suchý.

Tab. 2 Hodnotenie meteorologického sucha klasifikáciou podľa vlhkosti roka

Obdobie	Vlhkosť roka	Obdobie	Vlhkosť roka
1982	VS	1997	N
1983	N	1998	N
1984	S	1999	N
1985	VV	2000	N
1986	VS	2001	MV
1987	N	2002	MV
1988	N	2003	VS
1989	MV	2004	V
1990	N	2005	V
1991	N	2006	N
1992	N	2007	N
1993	VS	2008	VV
1994	N	2009	VV
1995	V	2010	MV
1996	N		

V **Tab.3** je klasifikované hydrogeologické sucho v úrovni hladiny podzemnej vody vo Vyšnom Slavkove za hodnotené obdobie 1982 – 2010, kde je uvedený celkový počet výskytov suchých období (CPV), celková dĺžka trvania (CDT) sucha a priemerná dĺžka trvania (PDT) sucha pri daných percentiloch v rámci jednotlivých intervalov dĺžky trvania sucha v dňoch. V tomto prípade je 7 – 49 dní klasifikovaných ako mierne sucho, 50 – 98 dní ako veľmi sucho a viac ako 98 dní je klasifikované ako extrémne sucho.

Tab.3 Klasifikácia sucha podľa dĺžky trvania sucha v dňoch za obdobie 1982 – 2010

	7 – 49 dní			50 – 98 dní			> 98 dní		
	CPV	CDT	PDT	CPV	CDT	PDT	CPV	CDT	PDT
H ₈₀	10	320	32	2	142	71	12	2380	198
H ₉₀	10	212	21	3	208	69	10	1793	179
H ₉₇	10	188	19	3	222	74	7	1274	182

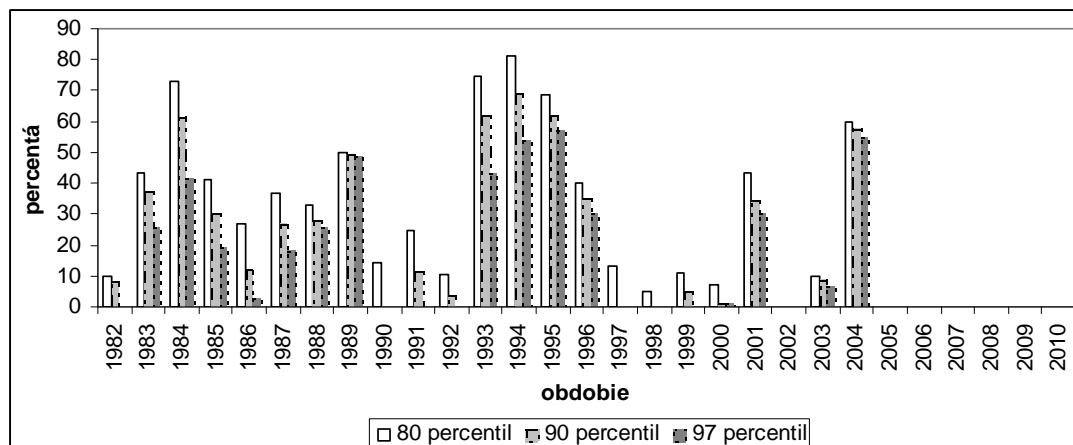
Z hľadiska percentuálneho zhodnotenia dĺžky trvania celého sledovaného obdobia 1982 – 2010, kde do úvahy neberieme výskyty súch, ktorých nepretržité trvanie nie je väčšie ako 7 dní, bolo dosiahnuté pri jednotlivých percentiloch nasledovné: pri 80 percentile bolo dosiahnutých 27 % suchých dní, pri 90 percentile bolo dosiahnutých 21 % suchých dní a pri 97 percentile to bolo 16 % suchých dní.

V **Tab. 4** sú zhodnotené hydrologické roky z hľadiska trvania sucha dosiahnutého pri jednotlivých percentiloch, a to v počte dní a v percentách trvania z hľadiska roka. Pre jednotlivé roky je tu uvedený počet všetkých suchých dní s nepretržitým trvaním sucha rovným alebo dlhším ako 7 dní.

Tab. 4 Hodnotenie hydrologických rokov z hľadiska trvania sucha

	H ₈₀		H ₉₀		H ₉₇	
	počet dní	%	počet dní	%	počet dní	%
1982	37	10	30	8	0	0
1983	159	44	137	38	94	26
1984	268	73	224	61	152	42
1985	150	41	111	30	71	19
1986	99	27	45	12	11	3
1987	134	37	99	27	66	18
1988	121	33	103	28	95	26
1989	182	50	180	49	179	49
1990	52	14	0	0	0	0
1991	90	25	43	12	0	0
1992	39	11	15	4	0	0
1993	273	75	227	62	159	44
1994	296	81	252	69	197	54
1995	250	68	226	62	208	57
1996	147	40	129	35	111	30
1997	48	13	0	0	0	0
1998	18	5	0	0	0	0
1999	40	11	18	5	0	0
2000	27	7	5	1	4	1
2001	158	43	126	35	111	30
2002	0	0	0	0	0	0
2003	36	10	33	9	25	7
2004	218	60	210	57	201	55
2005	0	0	0	0	0	0
2006	0	0	0	0	0	0
2007	0	0	0	0	0	0
2008	0	0	0	0	0	0
2009	0	0	0	0	0	0
2010	0	0	0	0	0	0

Na **Obr.1** je graficky zobrazené percentuálne trvanie sucha pri použitých percentiloch za jednotlivé roky.



Obr. 1 Percentuálne trvanie sucha v objekte Vyšný Slavkov

Z hľadiska zhodnotenia sucha dosiahnutého pri 80 percentile, bolo v úrovni hladiny podzemnej vody vo Vyšnom Slavkove dosiahnuté viac ako 50 %-né trvanie sucha v rokoch 1984, 1993 – 1995, 2004. Pri 90 percentile, používanom bežne na Slovensku, bolo dosiahnuté viac ako 50 %-né trvanie sucha v rovnakom období ako pri 80 percentile. Pri 97 percentile, považovanom v tomto prípade za najkritickejšiu hraničnú úroveň, bolo dosiahnuté viac ako 50 %-né trvanie sucha v rokoch 1994 – 1995 a v roku 2004.

Záver

Testovaním prahových hodnôt sa zistilo, že čím je zvolený vyšší percentil z čiar prekročenia, tým je nižší počet vyčlenených suchých období. Použitie priemernej dlhodobej prahovej hodnoty stanovenej za každý rok je vhodné z toho hľadiska, že sucho vyčlenené týmto spôsobom je reprezentatívnejšie z hľadiska trvania sucha v jednotlivých rokoch, čo môže odrážať i sezónny vplyv. Je to využiteľné i v prípade, že chceme získať lepšiu predstavu o trvaní sucha v hladine podzemnej vody, ktorá predstavuje okamžitú zásobu podzemnej vody.

Vo Vyšnom Slavkove bol z hľadiska hodnotenia meteorologického sucha podľa vlhkosti roka klasifikovaný rok 1982, 1986, 1993, 2003 ako veľmi suchý a rok 1984 ako suchý. Z hľadiska hodnotenia sucha v hladine podzemnej vode pri 90 percentile, používanom bežne na Slovensku, bolo dosiahnuté viac ako 50 %-né trvanie sucha v rokoch 1984, 1993 – 1995, 2004. Zhoda medzi meteorologickým suchom a suchom v podzemnej vode bola teda dosiahnutá len v roku 1984, meteorologické sucho v rokoch 1982 a 1986 sa v hladinovom

režime vôbec neprejavilo. Meteorologické sucho v roku 1993 v hladinách podzemnej vody pretrvalo až do roku 1995 a sucho v roku 2003 sa prejavilo s časovým posunom až v roku 2004. Svoju úlohu pri časovom posune, resp. predĺženej dobe trvania sucha v podzemnej vode zohráva predchádzajúci stav zásob podzemnej vody. Veľmi suchému roku 1993 predchádzali tri zrážkovo normálne roky 1990 – 1992, roku 2003 predchádzal mimoriadne vlhký rok 2002.

PodĎakovanie

PodĎakovanie patrí Slovenskému hydrometeorologickému ústavu za poskytnutie potrebných údajov pre spracovanie riešenej témy v oblasti identifikácie a klasifikácie sucha v hladinovom režime podzemných vôd. Tento príspevok bol vypracovaný aj za podpory grantu VEGA č.1/1327/12 (zodpovedný riešiteľ M. Fendeková).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Tallaksen L. M., Van Lanen H. A. J. (2004) Hydrological drought. Processes and Estimation Methods for Streamflow and Groundwater. Elsevier, The Netherlands, p. 5
- [2] Wilhite D. A., Glantz M. H. (1985) Water Int. 10(3), p. 111
- [3] Fendeková M., Ženišová Z., Demeterová B., Fendek M., Fláková R., Gavurník J., Krčmář D., Macura V., Némethy P., Slivová V. (2010) Hydrogeologické sucho. Slovenská asociácia hydrogeológov, Katedra hydrogeológie Prif UK, Bratislava, s. 1
- [4] Atlas krajiny Slovenskej republiky (2002) Ministerstvo životného prostredia SR, Bratislava, Slovenská agentúra životného prostredia, Banská Bystrica
- [5] Frankovič J., Tkáčik P., Gazda S., Szabová A., Vrábľová, M. (1974) Branisko – vyhl'adávací HGP, záverečná správa s ocenením zásob podzemných vôd k 30.10.1974. ŠGÚDŠ, Bratislava, Slovenská republika, s. 131
- [6] Majerčáková O., Škoda P., Danáčová Z. (2007) Meteorol. Mag. 10(4), p. 205
- [7] STN 75 1510 (2009) Hydrológia. Hydrologické údaje podzemných vôd. Kvantifikácia hydrologického režimu hladín podzemných vôd.
- [8] HydroOffice [Citované: 15. november 2010]
<<http://www.hydrooffice.org/Downloads/List.aspx?section=Manuals>>

Hydraulické a hydrogeochemické parametre v okolí vrtu HGŠ-1 na lokalite Šúr

Marek Tomasch, Barbora Šutarová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra hydrogeológie, Mlynská dolina, 841 04 Bratislava, Slovenská republika; marek.tomasch@gmail.com

Abstrakt

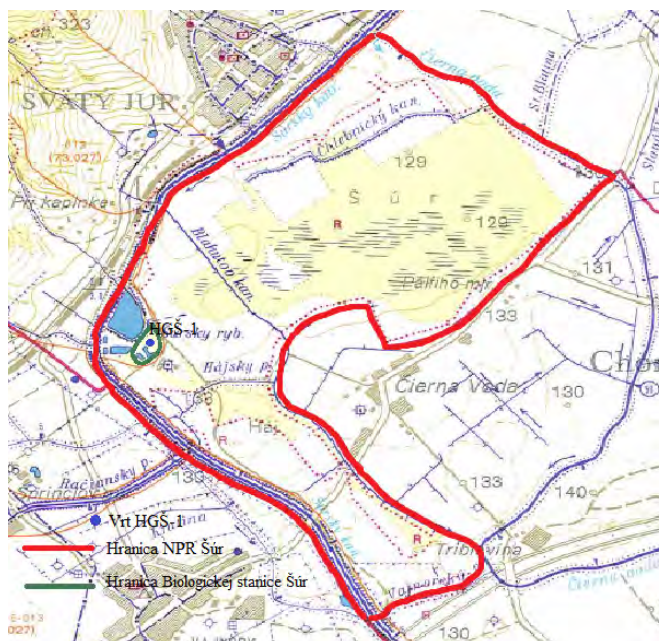
The National Nature Reserve Šúr is located at the foot of the Malé Karpaty Mts. between the villages of Svätý Jur and Čierna Voda. Šúr belongs to the list of the Ramsar sites due to the wetlands present within its territory. A borehole HGŠ-1 is used as a source of drinking water here. This borehole was sampled and put through a pumping test. The hydraulic conductivity in the pumping test achieved $7,72 \cdot 10^{-6} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ and $8,17 \cdot 10^{-6} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ in the build-up test. We also sampled the ground water during the pumping test. The values of the total dissolved solids were around $961 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Groundwater is Na-Cl type. Type of the water, total dissolved solids, high concentration of chloride and sodium in groundwater show marinogene mineralization. Low to zero nitrate concentrations, higher concentrations of ammonium, iron and hydrogen sulfide suggest a reducing environment, typical for the formation of the chemical composition of water in the Neogene basins.

KLúčové slová: Šúr; vrt HGŠ-1; podzemná voda; koeficient filtrácie; chemické zloženie vody

Úvod a formulácia cieľa

Národná prírodná rezervácia Šúr sa nachádza na úpätí Malých Karpát medzi obcami Svätý Jur a Čierna Voda. Význam rezervácie spočíva v ochrane komplexu jelšového lesa a močaristých lúk so vzácnym rastlinstvom a bohatým živočíštvom. Taktiež sa tu nachádzajú mokrade, vďaka ktorým Národná prírodná rezervácia Šúr patri do zoznamu Ramsarských lokalít. Národná prírodná rezervácia Šúr sa pokladá za najväčší pôvodný slatino-barinatý jelšový les v strednej Európe. Vyhlásená za chránené územie bola v roku 1952. Národná prírodná rezervácia spadá pod § 22 zákona o ochrane prírody a krajiny č. 543/2002 Z. z. Na území národnej prírodnej rezervácie platí štvrtý alebo piaty stupeň ochrany. V Národnej prírodnej rezervácii sa nachádza Biologická stanica Šúr, ktorá je vysunutým pracoviskom Katedry ekológie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave „**Obr. 1**“.

Základná hydrogeologická a hydrogeochemická charakteristika lokality Šúr bola spracovaná v bakalárskej práci [1], na ktorú nadväzuje tento príspevok. Cieľom príspevku je charakterizovať hydraulické a hydrogeochemické parametre vrtu HGŠ-1, ktorý je využívaný v Biologickej stanici Šúr ako zdroj pitnej vody. Tento cieľ je možné dosiahnuť na základe hodnotenia výsledkov čerpacej skúšky na vrte HGŠ-1 a chemických analýz podzemnej vody z vrtu.



Obr. 1 Mapa územia NPR Šúr a Biologickej stanice Šúr (upravené podľa vodohospodárskej mapy 44-22)

Materiál a metódy

Vrt HGŠ-1 bol zabudovaný v roku 1985. Hĺbka vrtu dosahuje 150 m. Úvodný priemer vrtania bol 780 mm, konečný 495 mm. Pre definitívne vystrojenie vrtu boli použité oceľové rúry \varnothing 324 mm s prechodom v hĺbke 59 m na \varnothing 219 mm. Dvojité filtre \varnothing 324/219 mm plnené filtračným obsypom o priemere zŕn 3 – 6 mm a obalené silonovou sieťovinou o priemere ôk 1 x 1 mm boli osadené v hĺbke 59 – 64 m, 71 – 81 m a 124 – 134 m. Sedimentačný priestor sa nachádza v hĺbke 134 – 150 m. Priestor medzi stenou vrtu a budovacou kolónou je vyplnený do hĺbky 1 m cementovou zmesou, od 1 do 56 m ílovým tesnením a od 56 do 150 m kremenným filtračným obsypom VP-2 (vodárenský piesok 2 mm). Po dokončení vrtných prác bol vrt odpieskovaný a vyčistený[2].

Na základe vrtných prác bolo zistené, že z pohľadu geologickej stavby územie tvoria sedimentárne horniny neogénu a kvartéru. Kvartér je tvorený piesčitými hlinami, hlinami a štrkami. Hrúbka kvartéru je 5 m. Od 5 metrov až po koniec vrtu je neogén, ktorý je zastúpený ílmi s častými polohami pieskov. V súčasnosti je vrt využívaný ako zdroj pitnej vody pre Biologickú stanicu Šúr. Hladina podzemnej vody sa nachádza hneď pod terénom a v čase zrážok je územie podmáčané. Kvartérne súvrstvie je kolektorom podzemnej vody s voľnou hladinou. Na neogénne súvrstvie sú viazané kolektory podzemnej vody artézskeho charakteru [2].

Dňa 19.10.2012 boli vykonané čerpacia a stúpacia skúška v Biologickej stanici Šúr na vrte HGŠ-1. Vrt je zapažený, hlboký 150 m. Pri čerpaní bolo použité čerpadlo Umbra Pompe

230 V – 250, 900 Watt, s výtlačnou výškou $H_{\max} = 60$ m a výdatnosťou $Q_{\max} = 550$ l·min⁻¹. Čerpadlo bolo ponorené do hĺbky 7 m od okraja pažnice. Hĺbka hladiny podzemnej vody vo vrte bola meraná Rangovou píšťalou od okraja pažnice. Vykonaná bola čerpacia skúška pri konštantnej výdatnosti. Čerpacia skúška začala o 11,55 hod., čerpané množstvo bolo 0,58 l·s⁻¹. Na začiatku bol čas meraný po dosiahnutí poklesu hladiny podzemnej vody o každých 20 cm. Po 2,43 minútach bolo čerpané množstvo 0,69 l·s⁻¹. Po 5 minúte od začiatku čerpacej skúšky bol pokles hladiny vody vo vrte meraný každé 2 minúty a po 15 minútach každých 5 minút. Po 25 minútach od začiatku čerpacej skúšky bol pokles hladiny vody vo vrte meraný každých 10 minút pri výdatnosti vrtu 0,67 l·s⁻¹ a od 55 minúty každých 20 minút. Po 100 minútach bolo čerpané množstvo 0,66 l·s⁻¹. Čerpacia skúška bola ukončená po 120 minútach, teda o 13,55 hod. Za tento čas klesla hladina vody vo vrte o 0,67 m. Po čerpacej skúške začala stúpacia skúška. Na začiatku bol meraný čas, kedy stúpila hladina vody vo vrte o 20 cm, na konci skúšky čas stúpnutia hladiny o každých 5 cm. Stúpacia skúška bola ukončená o 15,29 hod., čiže po 1 hodine a 31 minútach. Hladina podzemnej vody vo vrte počas stúpajúcej skúšky stúpila o 0,62 m. Stúpacia skúška nedosiahla pôvodnú úroveň, pretože trvala kratšie ako čerpacia skúška. Hrúbka zvodnenej vrstvy b bola určená z litologického profilu vrtu súčtom hrúbky priepustných vrstiev, v ktorých boli zabudované perforované časti vrtu ($b = 25$ m).

Rekognoskácia terénu s pracovníkmi CHKO Malé Karpaty a Biologickej stanice Šúr bola vykonaná 24.4.2012, pričom boli odobrané vzorky vody aj z vrtu v areáli Biologickej stanice Šúr „**Obr. 1**“. Druhý odber vzoriek vody bol vykonaný počas čerpacej skúšky 19.10.2012. Pri odbere vzoriek boli vykonané terénne merania základných fyzikálno-chemických ukazovateľov: teplota vzduchu, teplota vody, elektrická vodivosť, oxidačno-redukčný potenciál, rozpustený kyslík a kyslíkové nasýtenie. Pri odbere boli titračne stanovené ukazovatele $ZNK_{8,3}$ a $KNK_{4,5}$ (voľný CO_2 a HCO_3^-).

Chemické analýzy vody z vrtu HGŠ-1 boli urobené v hydrogeochemickom laboratóriu Katedry hydrogeológie PriF UK v Bratislave a v akreditovanom laboratóriu spoločnosti INGENIO-ENVILAB, s.r.o. v Žiline. Chemická analýza vody z apríla 2012 bola vykonaná v Geoanalytických laboratóriách ŠGÚDŠ v Spišskej Novej Vsi. Vzorky vody na stanovenie stopových prvkov boli filtrované cez membránové filtre 0,45 μ m a konzervované.

Chemické analýzy podzemných vôd boli komplexne vyhodnotené (výpočet látkových koncentrácií, aktivít ap.) a boli urobené hydrogeochemické klasifikácie [3].

Výsledky a diskusia

Na vrte HGŠ-1 bola uskutočnená 22 dňová čerpacia skúška od 19.2.1985 do 13.3.1985. Počas čerpania bola volená metóda konštantnej výdatnosti $1,31 \text{ l}\cdot\text{s}^{-1}$ a zníženie hladiny bolo 2,3 m v posledný deň čerpania. Hladina vody vo vrte bola meraná od horného okraja pažnice výstroja vrtu, pred čerpacou skúškou bola 5 m od okraja pažnice [2]. Pomocou Jacobovej metódy bol zistený koeficient filtrácie bol $2,81\cdot 10^{-5} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ a koeficient prietochnosti bol $4,01\cdot 10^{-3} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1}$.

Dňa 19.10.2012 bola vykonaná overovacia čerpacia skúška [4], ktorá trvala 2 hodiny.. Čerpacia a stúpacia skúška bola vyhodnotená podľa Jacobovej metódy [5]. Výdatnosť vrtu (Q) bola $0,69 \text{ l}\cdot\text{s}^{-1}$ a hrúbka zvodnenej vrstvy (b) bola 25 m.

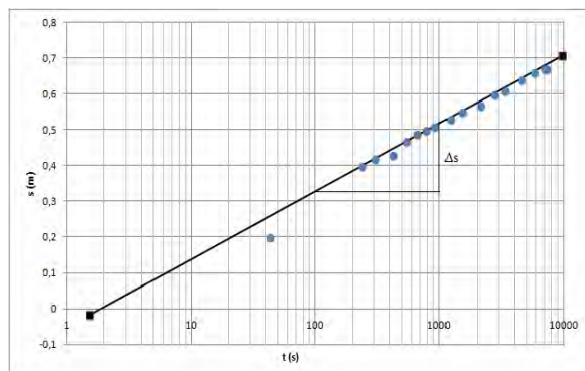
Koeficient prietochnosti T ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) je zadefinovaný ako:

$$T = 0,1832 \cdot Q / i \quad [1.]$$

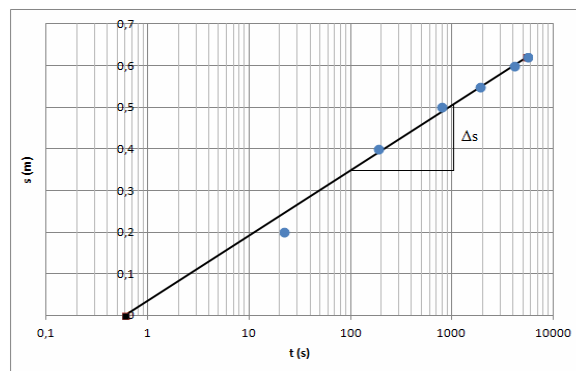
kde Q je výdatnosť vrtu ($\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$) a i je sklon priamky „**Obr. 2**“.

$$i = \Delta s / \Delta \log(t_2 - t_1) \quad [2.]$$

kde Δs je rozdiel zníženia hladiny vo vrte (m) v čase $\log(t_2 - t_1)$, čas $t_2 = 10^3 \text{ s}$, $t_1 = 10^2 \text{ s}$.



Obr. 2 Priebek čerpacej skúšky na vrte HGŠ-1 z dňa 19.10.2012



Obr. 3 Priebek stúpajúcej skúšky na vrte HGŠ-1 z dňa 19.10.2012

Pre koeficient filtrácie k_f ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) platí:

$$k_f = T / b \quad [3.]$$

Koeficient prietochnosti (T) bol vypočítaný pomocou rozdielu prírastku zníženia Δs a rozdielov časov $\log(t_2 - t_1)$. Z vyhodnotenia čerpacej skúšky boli stanovené $T = 0,70\cdot 10^{-4} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ a $k_f = 7,71\cdot 10^{-6} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Rovnakým postupom bola vyhodnotená stúpacia skúška „**Obr. 3**“, pričom $T = 0,74\cdot 10^{-4} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ a $k_f = 8,17\cdot 10^{-6} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Po zabudovaní boli v roku 2005 z vrtu odobrané 3 vzorky na chemickú analýzu „**Tab. 1**“. V podzemnej vode prevládajú ióny Na^+ , HCO_3^- , menej Cl^- . Teplota vody bola ustálená na 11 °C, hodnoty pH dosahovali 8,3 až 8,4. Podľa pachu voda obsahovala sulfán.

Dňa 20.4.2012 bola odobraná vzorka podzemnej vody z vrtu HGŠ-1 „**Tab. 1**“. Teplota vody bola 12,2 °C, hodnota pH vody bola 8,78, vodivosť bola 149 $\text{mS}\cdot\text{m}^{-1}$. Podľa celkovej mineralizácie ($959 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) patrí k vodám so zvýšenou mineralizáciou. Podľa Palmer-Gazdovej klasifikácie je to voda základného výrazného Na-Cl typu. Zaujímavé sú vysoké koncentrácie Na^+ ($333 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a Cl^- ($352 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Obsah organických látok je nízky.

Tab. 1 Chemické zloženie podzemnej vody z vrtu HGŠ-1

Dátum odberu	15.4.1985	17.4.1985	22.4.1985	20.4.2012	19.10.2012*
Teplota vody (°C)	11	-	-	12,2	14,2
pH	8,40	8,35	8,30	8,78	8,65
EC ($\text{mS}\cdot\text{m}^{-1}$)	60	59	56	149	114,9
Celková mineralizácia ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	680	468	613	959	942
Palmer-Gazdova klasifikácia	-	-	-	zv Na-Cl	zv Na-Cl
Klasifikácia podľa prevládajúcich iónov (> 20 c-z %)	-	-	-	Na-Cl-HCO ₃	Na-Cl-HCO ₃
H_4SiO_4 ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	11,8	9,77	8,55	15,1	30
Na^+ ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	159,5	-	135	333	294
K^+ ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	3,5	-	2,6	1,94	1,75
NH_4^+ ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	1,67	0,85	0,73	-	1,54
Ca^{2+} ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	11,46	12,89	10,62	8,02	9,16
Mg^{2+} ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	14,32	4,34	5,20	1,95	3,09
Fe^{2+} ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,14	0,13	0,15	0,363	0,224
Mn^{2+} ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,08	0,03	0	0,024	0,028
Cl^- ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	64,7	64,7	64,7	352	342
SO_4^{2-} ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	7,7	9,3	13,6	2	5,76
NO_3^- ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	40	0	0	1	0,19
HCO_3^- ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	366,1	366	372,2	221	262

Vysvetlivky: *vzorka odobraná pred ukončením čerpacej skúšky, zv – základný výrazný typ, EC – vodivosť

Počas čerpacej skúšky 19.10.2012 boli odobrané 3 vzorky podzemnej vody z vrtu HGŠ-1, a to o 11,55 hod, o 12,55 hod a o 13,55 hod. Rozdiely v chemickom zložení vody z týchto vzoriek sú minimálne, bol zaznamenaný mierny nárast teploty vody (12,6 – 14,2 °C), koncentrácie H_4SiO_4 (15,5 – 30 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), a mierny pokles koncentrácie Fe (0,531 – 0,224 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Koncentrácia dominantných iónov Na a Cl^- bola stabilná „**Tab. 1**“.

Chemické zloženie podzemnej vody vo vrte HGŠ-1 poukazuje na jej pôvod v neogéne. Podľa Palmer-Gazdovej klasifikácie voda patrí k základnému výraznému Na-Cl typu. Typ vody, celková mineralizácia, vysoké koncentrácie chloridov, sodíka a sulfánu vo vode poukazujú na marinogénnu mineralizáciu (Obr. 6). Nízke až nulové koncentrácie dusičnanov,

vyššie koncentrácie amónnych iónov, železa a sulfánu poukazujú na redukčné prostredie, ktoré je typické pre formovanie chemického zloženia vôd v neogénnych panvách.

Záver

Vrt HGŠ-1 je situovaný v areáli Biologickej stanice Šúr a je využívaný od roku 1985 ako zdroj pitnej vody. Z porovnania čerpacích skúšok z roku 2012 a 1985 vyplýva, že vrt HGŠ-1 nie je zakolmatovaný a jeho hydraulické parametre sa od roku 1985 nezmenili. Neogénnym zvodneným pieskom zodpovedajú zistené hydraulické parametre.

Dlhodobé čerpanie vody z vrtu sa prejavilo zmenou chemického zloženia vody a takmer dvojnásobným nárastom koncentrácií sodíka a chloridov v podzemnej vode. Do vrtu priteká podzemná voda z väčších hĺbok. Z hľadiska vysokých koncentrácií Na, Cl⁻, Fe a NH₄⁺, kvalita vody z vrtu HGŠ-1 v súčasnosti nevyhovuje kritériám pre vodu určenú na ľudskú spotrebu [6].

Pod'akovanie

Autori ďakujú RNDr. Bystríkovi Ambrušovi, PhD., RNDr. Viliamovi Kleschtovi a Mgr. Viliamovi Vongrejovi za poskytnutie informácií a odbornú pomoc.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Tomasch M. (2012) Hydrogeologické pomery lokality Šúr. (Diplomová práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p. 46
- [2] Bukvová J., Machmerová E., Ďuungelová H., Bímová J. (1985) Šúr pri Bratislave – hydrogeologický prieskum, HGP, účel: overenie možnosti získať zdroj pitnej podzemnej vody v areáli výskumnej biologickej stanice. (Manuskript) Archív Geofondu, ŠGÚDŠ, Bratislava, p. 9
- [3] Gazda S. (1974) Chemizmus podzemných vôd Západných Karpát a jeho genetická klasifikácia 1974, Materiály z III. celoslovenskej geologickej konferencie, II. časť, Bratislava, p. 43
- [4] STN 73 6614 (1984) Skúšky zdrojov podzemnej vody. Rozdelenie čerpacích skúšok podľa účelu a doby trvania.
- [5] Melioris L., Mucha I., Pospíšil P. (1986) Podzemná voda – metódy výskumu a prieskumu. Alfa – vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry, Bratislava, p. 429
- [6] Nariadenie vlády SR č. 496/2010 Z. z., ktorým sa mení a dopĺňa nariadenie vlády SR č. 354/2006 Z. z., ktorým sa ustanovujú požiadavky na vodu určenú na ľudskú spotrebu a kontrolu kvality vody určenej na ľudskú spotrebu.

Au-porfýrová mineralizácia na lokalite Kráľová v stratovulkáne Javorie

Juraj Žitňan¹, Peter Koděra¹, Brigitta Snárska²

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, ¹Katedra ložiskovej geológie, ²Katedra mineralógie a petrológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; jzitnan@gmail.com

Abstract

Kráľová is a new subeconomic Au porphyry deposit located in the Neogene Javorie stratovolcano (Western Carpathians). Alteration is dominated by intermediate argillic that variably overprints earlier K-silicate and Ca-Na silicate alteration. Propylitisation forms an outer alteration zone. The porphyry intrusion at Kráľová contain several generations of veinlets. Most of them are closely associated with the alteration patterns presented above. The oldest types of veinlets are rare biotite veinlets with magnetite. Quartz veinlets are the most common type of veinlets at the deposit, forming a distinct stockwork within the porphyry intrusion. TitaniQ geothermometer enabled to calculate crystallisation temperatures for several generations of quartz veinlets. Quartz veinlets are composed of early A - type and later banded type. The first generation of quartz veins originated at temperatures 558-636°C and the youngest quartz veins at 200-412°C. Other types of are chlorite-saponite veinlets. The youngest veinlets present are calcite-zeolite veinlets with zeolite older than calcite.

Kľúčové slová: Au-porfýrová mineralizácia; stratovulkán Javorie; premeny; žilky; termometer

Úvod

Mineralizácie porfýrového typu sú ekonomicky najvýznamnejším zdrojom neželezných rudných surovín. Za porfýrové ložiská považujeme rozsiahlejšie vtúsené mineralizácie, ktoré sú produktom veľkých hydrotermálnych systémov spätých s umiestnením a chladnutím intrúzií porfýrov v relatívne plytkých hĺbkach [1]. Porfýrové ložiská s priemerným obsahom Au nad $\geq 0,4$ g/metrických ton (t) sú definované ako Au bohaté porfýrové ložiská. Priemerný obsah Au je < 1 g/t. Sú umiestnené v plytkých hĺbkach (1-2 km) vo vulkanických horninách andezitového až dacitového alebo trachyandezitového až latitového zloženia. Porfýrové ložiská bohaté na Au sa výlučne viažu na vysoko oxidované, sírou chudobné intrúzie magnetitovej série I typu [2].

Au porfýrový systém Kráľová sa nachádza v západnej časti stratovulkánu Javorie, vo východnej časti stredoslovenských neovulkanitov. Lokalita reprezentuje ložiskový výskyt Au-porfýrovej mineralizácie, overený vrtným prieskumom firmy EMED Slovakia, s.r.o. v rokoch 2006-2007 s odhadom zásob 47,8 Mt s priemernou kovnosťou 0,29 ppm Au [3]. Porfýrový systém je súčasťou rozsiahlejšieho pásma mineralizovaných magmaticko-hydrotermálnych systémov v centrálnej zóne Javoria, ktoré obsahujú Au-porfýrovú mineralizáciu, vrátane ekonomicky využiteľného ložiska na lokalite Biely vrch.

Mineralizácia na lokalite Kráľová je priestorovo viazaná na štokovitú intrúziu andezitového porfýru s granátom, patriacej do subvulkanického intruzívneho komplexu Kráľová [3]. Rudné teleso je doprevádzané kremenným žilníkom a niekoľkými typmi premien. Mineralizovaný porfýr pretínajú mladšie porfýrové dajky, dosahujúce max. hrúbku niekoľko metrov. V intruzívnom komplexe je hojný výskyt viacerých generácií brekcií, pričom najčastejšie sú predmineralizačné a intermineralizačné brekcie [3]. V príspevku opisujeme nové poznatky o minerálnom zložení, premenách, žilkách a o výsledkoch geotermometrie kremenných žíliet.

Materiál a metódy

Vzorky použité na výskum pochádzali z vrtných jadier, ktoré poskytla firma EMED Slovakia, s. r. o. (vrty KVE-1 až 6). Firma tiež poskytla kompletnú databázu celohorninových geochemických analýz (metodika je v publikácii [3]) a popisov vrtného jadra. Laboratórny výskum vzoriek zahŕňal pozorovanie v prechádzajúcom aj odrazenom svetle v polarizačnom mikroskope BX51. Mikrosondové analýzy, SEM a katodoluminiscenčné štúdium sa uskutočnilo na Štátnom geologickom ústave Dionýza Štúra na elektrónovom mikroanalýzátore CAMECA SX 100. RTG analýzy celohorninových vzoriek a ílovej frakcie boli realizované na pracoviskách GÚ SAV a PriF UK. Izotopové analýzy kyslíka monominerálnych separátov boli uskutočnené pomocou laserovej fluorinácie v laboratóriách SUERC (Glasgow, UK). Analýzy použité na geotermometer *TitaniQ* [4] sme získali v laboratóriu elektrónovej mikroanalýzy na ŠGUDŠ v Bratislave. Pre aplikáciu geotermometra sú potrebné presné analýzy stopových obsahov Ti v kremeni, čomu bolo podriadená aj metodika merania. Pre zvýšenie citlivosti a dosiahnutie detekčného limitu 8-9 ppm sa meranie Ti vykonávalo s veľkou plochou LPET počas 300 s (pík a pozadie). Kalibrovali sme na štandarte TiO₂ (Taylor), prúd pre dosiahnutie požadovanej citlivosti bol upravený na 180 nA pri urýchľovacom napätí 15 kV. Na potlačenie vplyvu deštrukcie naparenej vrstvy uhlíka bol elektrónový lúč rozšírený na 10-15 μm. Aby sme zabránili nežiaducim vplyvom kolísania meracieho prúdu počas dlhého času ožarovania vzorky elektrónovým lúčom, bol merací čas rozdelený na päť časových úsekov, počas ktorých bolo merané pozadie aj pík v sekvencií s päťnásobným opakovaním. Pre výpočet kryštalizácie teplôt kremenných žíliet sme aplikovali tlak 0,26 kbar (litostatický tlak v odhadovanej hĺbke uloženia intruzívneho telesa 1 km), a strednú hodnotu aktivity TiO₂ 0,62. Vychádzame pritom

z predpokladu, že rovnaká aktivita TiO_2 ako je na ložisku Biely vrch v Javorí [5] je aj na lokalite Kráľová.

Výsledky a diskusia

Primárne horniny

Mikroskopickým štúdiom materskej porfýrovej intrúzie sme zistili, že vývoj základnej hmoty je s hĺbkou zrnitejšia a hornina sa mení od andezitového k dioritovému porfýru. Andezitový porfýr tvoria najmä fenokrysty zonálneho plagioklasu, menej pyroxén (enstatit, ferosilit), amfibol (aktinolit), v malej miere sú prítomné biotit a granát. Základnú hmotu horniny tvorí draselný živec a kremeň. Dioritový porfýr sa začína objavovať od hĺbky cca 200 m. Vyznačuje sa hrubozrnnejšou základnou hmotou. V niektorých vzorkách sa potvrdila aj prítomnosť fenokrystov granátu (almandin) v porfýre. Porfýr je v rôznej intenzite postihnutý hydrotermálnymi premenami.

Rudné teleso lokálne pretínajú mladšie porfýrové dajky, ktoré sú hrubé maximálne niekoľko metrov. Boli tu identifikované najmenej tri generácie brekcií (pred-mineralizačná, inter-mineralizačná a po-mineralizačná) [3].

Premeny a ich sukcesia

Pôvodné horniny na lokalite Kráľová sú postihnuté rozličnými typmi premien. Asociácie alteračných minerálov odrážajú meniace sa chemické gradienty, čo obvykle súvisí so zmenou pomeru fluidum/hornina (f/h). Znižovanie pomeru f/h v smere prúdenia fluíd má za následok postupnú zmenu od kationovej k izochemickej (H^+) metasomatóze, nárast pH a zmenu oxidačného stavu [1]. Množstvo hydrotermálnych minerálov je stabilných iba po určitú teplotu a/alebo pH [6].

Štúdiom premien bola identifikovaná vysokoteplotná K-silikátová premena, ktorá je zastúpená biotitizáciou a magnetitizáciou tmavých minerálov a základnej hmoty. Typickým minerálom K-silikátovej premeny je biotit. Dominantnými rudnými minerálmi v tomto type premeny sú magnetit a ilmenit. Prítomná je tu aj Ca-Na silikátová premena zastúpená Ca-plagioklasom anortitom, tiež je tu prítomný aktinolit a diopsit. Vo veľkej miere je v tomto type premeny prítomný magnetit. Je ochudobnená o sulfidy. Podobnú minerálnu asociáciu s týmto typom premeny opísal aj [7]. Je to najskoršia a najvyššie teplotná premena na ložiskách porfýrového typu [8]. Asociácia s biotitom a K-živcom poukazuje na zmiešanú Ca-Na/K-silikátovú premenu [1]. Najrozšírenejší typ premeny je stredná argilitizácia, ktorá zatláča produkty K-silikátovej a Ca-Na silikátovej premeny. Postihuje najmä základnú hmotu

v oblasti intenzívnej brekciácie, ale nahrádza tiež pôvodné fenokrysty. Zastúpená je minerálnou asociáciou smektit (montmorillonit, saponit), corrensit, illit?, chlorit a pyrit. Saponit nahrádza pôvodné mafické minerály, býva rozptýlený v základnej hmote, ojedinele robí aj zhluky a tenké krátke žilky. V okolí kremenných žiliek je prítomná silicifikácia [9]. Na rozdiel od ostatných hydrotermálnych centier v Javorí tu nie je prítomná premena typu pokročilej argilitizácie. Konečný et al. [10] opísali na okraji porfýrového systému propylitizáciu.

Žilky a ich sukcesia

V porfýrovej intrúzií bolo identifikovaných viacero typov žiliek. Najstaršie sú biotitové žilky s magnetitom a niekedy aj s kremeňom. Na ich okraji sa občas vyskytuje draselný živec. Prítomné sú tiež samostatné magnetitové žilky, tieto žilky sa nachádzajú najmä vo vrchných častiach vrtu KVE-2. Oba typy žiliek sú krátke, úzke a majú nepravidelný tvar. Pravdepodobne súvisia s K-silikátovou a Ca-Na silikátovou premenou. Najbežnejšími žilkami na lokalite sú kremenné žilky, tvoriace kremenný žilník. Identifikovaných bolo niekoľko generácií kremenných žiliek so zrejším sukcesným vzťahom v niektorých vzorkách. A-typ žiliek tvorí staršiu generáciu kremenných žiliek. Ich priemerná hrúbka dosahuje 0,2 až 0,7 cm, ale najhrubšie dosahujú až 1,5 cm. Mladšie sivé žilky sa vyznačujú páskovaním. Tmavá farba týchto žiliek je spôsobená veľkým množstvom plynných fluidných inklúzií a drobnými zrnami magnetitu a ilmenitu. V menšej miere sa v týchto žilkách vyskytujú aj drobné zrná chalkopyritu, pyritu a sfaleritu, ktoré sú uzavreté v kremeň. Tmavé pásy lokálne vytvárajú ľadvinovitú textúru, ktorá svedčí o rekryštalizácií kremeňa z SiO₂ gelu v dôsledku dekompresie hydrotermálnych fluid [11; 12]. Veľmi často sú v strednej časti kremenných žiliek prítomné minerály neskorších štádií, ktoré na iných miestach tvoria samostatné žilky. Medzi tieto minerály patrí najmä kalcit, v menšej miere zeolit (chabazit), sulfidy (pyrit, chalkopyrit, molybdenit) a vzácné aj corrensit.

Ďalším typom žiliek na ložisku sú chlorit-saponitové žilky. Sú krátke, úzke, nepravidelného tvaru, hrubé asi 1 mm a sú mladšie ako kremenné žilky. Najmladšími žilkami na ložisku sú kalcit-zeolitové (chabazitové) žilky, pričom zeolit je starší ako kalcit. Ich okraje občas lemujú saponit a chlorit [9].

V hornine boli zistené aj akcesorické minerály monazit, apatit a zirkón.

Geotermometer TitaniQ

Na lokalite bol požitý geotermometer TitaniQ, založený na koncentrácií Ti v kremeň, kde Ti vstupuje do mriežky kremeňa v závislosti na teplote, tlaku a aktivite TiO₂.

Geotermometer bol aplikovaný na rôzne typy a generácie kremenných žiliek so zjavným sukcesným vzťahom. Pred realizáciou mikrosondových analýz bola detailná štruktúra žiliek študovaná pomocou katodoluminiscencie, ktorá ukázala veľmi komplexnú zonálnosť výplne žiliek, ale aj jednotlivých kremenných zŕn s výrazne odlišnými emisnými vlastnosťami. V katodoluminiscenčnom obraze najsvetlejšie zrná boli obvykle v rámci žiliek najstaršie, obrastené a tmelené tmavšími varietami kremeňa. Najväčšie zastúpenie svetlých zŕn bolo obvykle v starších generáciách kremenných žiliek. V mladších generáciách kremenných žiliek dominoval katodoluminiscenčne tmavý kremeň. Namerané koncentrácie Ti sa pohybovali v rozpatí 226 až < 8 ppm. V katodoluminiscenčnom obraze najsvetlejšie miesta poskytli teploty v rozsahu 558-636 °C (106 -226 ppm Ti), tmavosivé 490-559 °C (30-107 ppm Ti), najtmavšie mali obvykle teplotu nižšiu ako 386 °C, maximálne 412 °C (>8 až 16 ppm Ti). Aplikácia nižšieho tlaku má len zanedbateľný vplyv na výpočet teploty. Podstatne väčšia neistota pri výpočte súvisí s aktivitou TiO₂. Napríklad odchýlka pri aplikácii aktivít TiO₂ 0,68-0,42, môže pri výpočte teploty pri najvyšších koncentráciách Ti dosiahnuť od -12 do 54 °C a pri najnižších od -5 do +24 °C. Namerané hodnoty sú podobné, ako uvádzajú na klasických čílskych ložiskách Muntean a Einaudi [13]. Autori predpokladajú, že prvé generácie žiliek vznikali už pri teplotách 620-720°C (A-typ žiliek) a najmladšie páskované žilky pri 200-380 °C, pričom predpokladajú postupný pokles teplôt a tlaku. Rovnaká sukcesia kremenných žiliek bola pozorovaná aj na Au-porfýrovom ložisku Biely vrch v stratovulkáne Javorie [5].

Záver

Au-porfýrový systém Kráľová ma typické črty Au porfýrových systémov. Identifikované tu boli vysokoteplotné premeny Ca-Na silikátová a K-silikátová, ktoré vznikajú v ranných štádiách porfýrového systému. Tieto premeny sa navzájom prekrývajú a tvoria hybridnú Ca-Na/K-silikátovú premenu. Najrozšírenejšou premenou vznikajúcou v neskorších štádiách vývoja porfýrového systému je stredná argilitizácia. Táto premena je naložená na staršie typy premien. V porfýrovej intrúzií sa nachádza viacero typov žiliek, ktoré prevažne súvisia s uvedenými premenami. Nové údaje o teplotách vzniku kremenných žiliek sú v súlade s predpokladanými teplotami ich vzniku na klasických Au-porfýrových systémoch.

Na rozdiel od najlepšie preskúmaného porfýrového systému v Javorí ložiska Biely vrch tu nie je prítomná premena typu pokročilej argilitizácie a v intrúzií bol identifikovaný granát. Odlišné vlastnosti systému môžu súvisieť s odlišnými vlastnosťami materskej intrúzie

a asociujúcich fluíd a/alebo výrazne iným, pravdepodobne hlbším, eróznym zrezom lokality.

PodĎakovanie

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0537-10 a firmou EMED Slovakia, s.r.o.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Sillitoe R. H., (2000) *Reviews in Econ. Geol.* 13, p. 315
- [2] Sillitoe R. H., (1979) *Miner. Deposita.* 68, p. 799
- [3] Hanes R., Bakos F., Fuchs P., Žitňan P., Konečný V., (2010) *Miner. Slovaca.* 42, p. 15
- [4] Thomas J. B., Watson E. B., Spear F. S., Shemella P. T., Nayak S. K., Lanzirotti A., (2010) *Contrib. Mineral. Petrol.* 160, p. 743
- [5] Koděra P., Lexa J., Konečný P., (2012) *Geochémia 2012*, Zborník vedeckých príspevkov z konferencie, Bratislava, SR, p. 76
- [6] Hedenquist J. W., Richards J. P., (1998) *Reviews in Econ. Geol.* 10. p. 235
- [7] Clark A. H., Arancibia O. N., (1995) *Giant ore deposits workshop*, 2nd, Kingston, Ontario, 1995, *Proceedings: Kingston, QminEx Associates and Queen's University*, p. 511
- [8] Seedorf E., Dilles J. H., Phoffett Jr, J. M. Einaudi, Zurcher L., Stavast W. J. A., Johnson D. A., Barton M. D., (2005) *Econ. Geol.* 100. p. 251
- [9] Žitňan J., Koděra P., Biroň A., (2012) *Geochémia 2012*, Zborník vedeckých príspevkov z konferencie, Bratislava, SR, p. 173
- [10] Konečný V., Bezák V., Halouzka R., Konečný P., Mihaliková A., Marcin D., Iškárová L., Panáček A., Štohl J., Žáková E., Galko I., Rojkovičová L., Onačila D., (1998) *Explanation to the geological map of Javorie 1 : 50 000*. Geologický ústav Dionýza Štúra, Bratislava, p. 304
- [11] Muntean J. L., Einaudi M. T., (2000) *Econ. Geol.* 95. p. 1445
- [12] Koděra P., Lexa J., Biroň A., Žitňan J., (2010) *Miner. Slovaca.* 42. p. 33
- [13] Muntean J. L., Einaudi M. T., (2001) *Econ. Geol.* 96. p. 743

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA



ŠVK
PriF UK
2013

GEOGRAFIA

ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2013
ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV

Tvorba webovej aplikácie s podporou mapovej služby WFS-T

Dominik Abrahám

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra kartografie,
geoinformatiky a diaľkového prieskumu Zeme, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko;
dominikabraham@gmail.com*

Abstract

This article describes process of creating a web application which supports OGC standards for map services WMS and WFS, including its transactional service (WFS-T). According to the client-server architecture, this application presents client, while the server consists of implementation of several interfaces: database system, map server and web server. All of the used interfaces are freeware.

KLúčové slová: GIS; Web GIS; OGC; WMS; WFS; WFS-T; priestorová databáza; mapový server

Úvod a formulácia cieľa

Voľne šíriteľný softvér, ktorý je bez výraznejších licenčných obmedzení, sa v súčasnosti stáva stále viac a viac konkurencieschopný voči proprietárnemu softvéru. Zároveň ako sa zväčšuje vplyv internetu v spoločnosti, rastú tiež možnosti webového programovania, ktoré prinášajú nové možnosti aj do sveta geografických informačných systémov. Webové mapové aplikácie sú v súčasnosti veľmi populárnym prostriedkom získavania geografických informácií. Zároveň však určité typy týchto aplikácií umožňujú geografické informácie aj editovať. Tento príspevok zakladá práve na vyššie uvedených skutočnostiach.

Hlavným cieľom predloženej práce bolo vytvorenie webovej aplikácie, ktorá má podporovať štandardy konzorcia OGC pre mapové služby WMS a WFS, pričom transakčnú službu (WFS-T) má demonštrovať možnosť pridávať, odoberať a upravovať geometriu. Vytvorenie webovej aplikácie s danou funkcionalitou predstavuje komplexný problém, ktorého dosiahnutie bolo podmienené splnením určitých krokov. Z tohto dôvodu boli vyčlenené nasledovné čiastkové ciele:

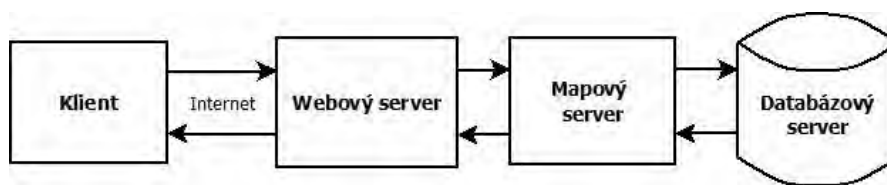
1. implementácia priestorovej databázy;
2. implementácia mapového servera, publikovanie priestorových údajov z databázy;
3. implementácia webového servera;
4. tvorba webovej aplikácie s podporou mapových služieb WMS a WFS-T;
5. tvorba štýlov pre zobrazované mapové vrstvy.

Tvorba štýlov pre mapové vrstvy nepredstavuje nevyhnutný krok pre vznik webovej

aplikácie s požadovanou funkcionalitou. Bez vytvorenia štýlov by však výsledná mapa, utvorená z takýchto vrstiev, nemala pre užívateľa dostatočnú výpovednú hodnotu.

Materiál a metódy

Webové mapové aplikácie zväčša využívajú architektúru klient-server, kde sa na jednej strane nachádza klientsky softvér, ktorý odosiela požiadavky na server, a ten ich následne spracúva a odpoveď zasiela naspäť klientovi. Pri webových mapových aplikáciách sa však jedná špecifikáciu architektúry klient-server, kde webový server po spracovaní klientskej požiadavky zašle požiadavku ďalej na mapový server, ten získa dáta z databázového servera, zašle ich naspäť webovému serveru a ten až potom odpovie klientskej aplikácii. Aplikácia postavená na takejto architektúre je tiež označovaná pojmom Web GIS [1].



Obr. 1 Architektúra klient-server pre Web GIS [1]

Do úlohy webového serveru bol vybraný softvér Apache, ktorý je dlhodobo jednotkou v tejto kategórii. Za mapový server bol zvolený softvér GeoServer, ktorý poskytuje implementáciu nami požadovaných štandardov. Ponúka tiež tvorbu SLD dokumentov, ktoré určujú štýly zobrazenia WMS vrstiev.. Potrebnú priestorovú databázu sme získali implementáciou softvéru PostgreSQL a jeho knižnice PostGIS.

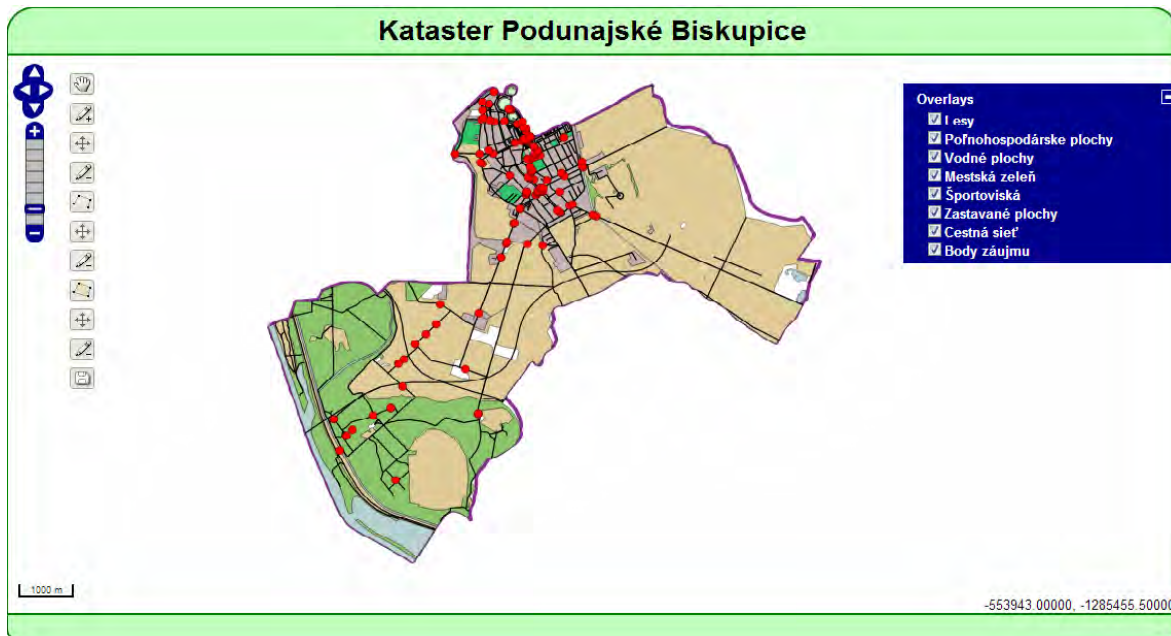
Samotná aplikácia je uložená v HTML dokumente. Zdrojový kód vytvorený v jazyku JavaScript je interpretovaný vo webovom prehliadači a komunikácia s mapovým serverom prebieha vďaka funkciám knižnice OpenLayers. Štýly pre užívateľské rozhranie a pre zobrazované WFS vrstvy boli zapísané do CSS dokumentu.

Vstupné údaje v našom prípade predstavujú vybrané mapové vrstvy, pochádzajúce z projektu OpenStreetMap. Záujmové územie bolo vyhraničené hranicou bratislavského katastra Podunajské Biskupice. Pre účely transakčnej služby sme použili po jednej vrstve pre každý typ geometrie:

- bodová vrstva - body záujmu
- líniová vrstva - cestná sieť)

- polygónová vrstva - zastavané plochy

Pre dotvorenie celkového obrazu výslednej mapy boli použité aj nasledovné vrstvy: vodstvo, zalesnené územie, poľnohospodárska pôda, mestská zeleň, športoviská. Farby, ktorými sú znázornené vyššie uvedené vrstvy, boli určené podľa predlohy z OpenStreetMap.



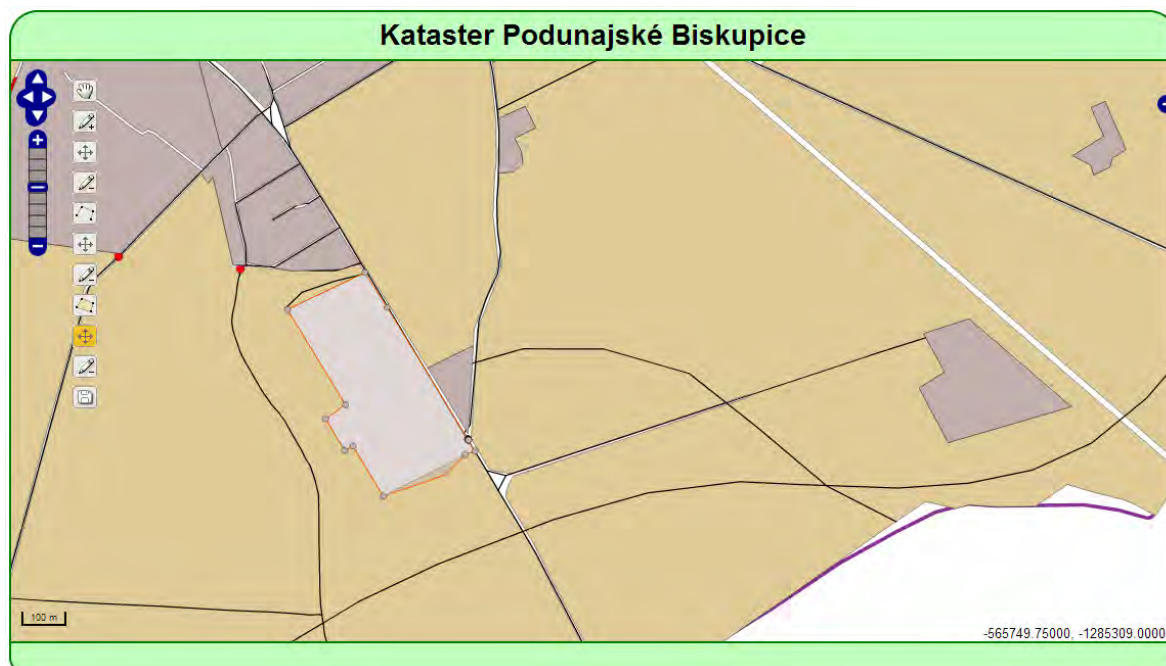
Obr. 2 Výsledná aplikácia: základné zobrazenie s roztvoreným zoznamom vrstiev

Výsledky a diskusia

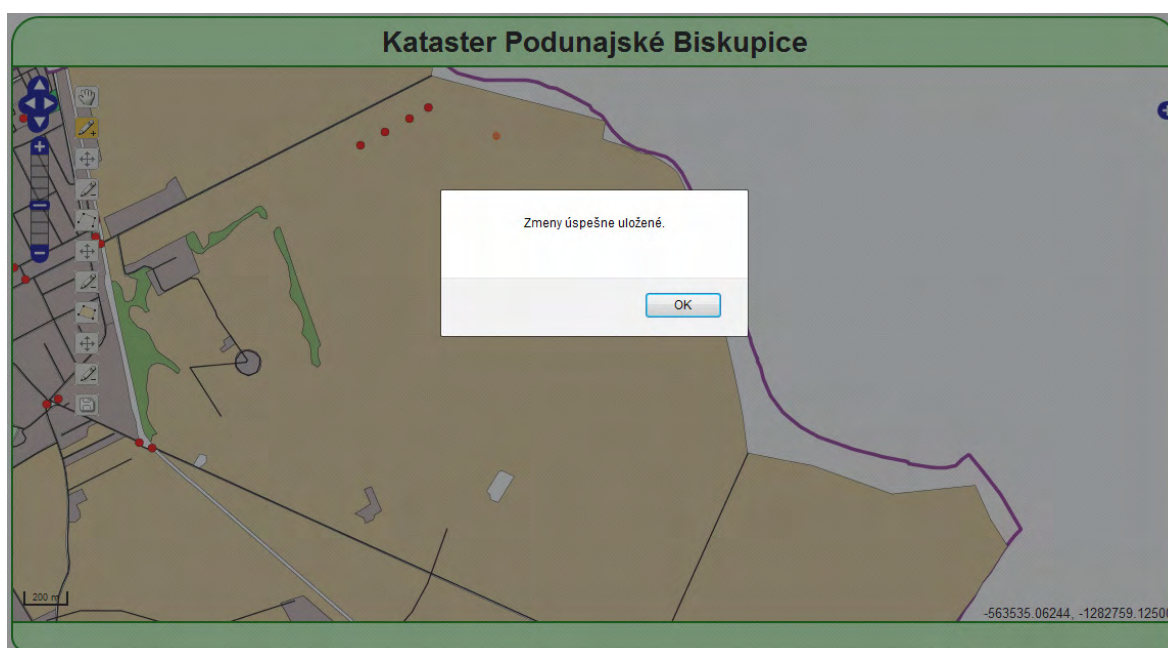
Po ukončení vývoja aplikácie, bola celá architektúra presunutá na školský server, kde je verejne dostupná na adrese http://158.195.43.203/transakcny_klient. Následne prebehlo testovanie v aktuálne najpoužívanejších webových prehliadačoch: Google Chrome, Mozilla Firefox, Opera, Safari, Internet Explorer. Poskytovaná transakčná služba fungovala vo všetkých prípadoch rovnako. Po vizuálnej stránke sa aplikácia v jednotlivých prehliadačoch líšila buď len nepatrne, alebo vôbec.

Vrstvám WMS, a tým pádom aj ich štýlom SLD, bola venovaná pozornosť len do tej miery, do akej bolo nevyhnutné vzhľadom na fungovanie aplikácie. Mapová aplikácia vytvorená s použitím knižnice OpenLayers totiž vyžaduje minimálne jednu WMS vrstvu, ktorú používa ako podkladovú vrstvu. Ako vidíme na obrázku 2, ostatné vrstvy môžeme vidieť v roztváracom zozname ako „overlays“. Na obrázku 3 vidíme, ako prebieha úprava vrstvy zastavanej plochy. Na žltó zvýraznený je aktivovaný nástroj na úpravu polygónovej geometrie. Nasledovný obrázok 4 ukazuje hlásenie o úspešnom prevedení transakcie, ktoré je

odzvou po kliknutí na tlačidlo pre uloženie zmien.



Obr. 3 Výsledná aplikácia: zapnutý nástroj na editáciu vrstvy zastavanej plochy



Obr. 4 Výsledná aplikácia: hlásenie o úspešnom uložení zmien [2]

Záver

Kostru tejto práce tvorila interoperabilita množstva nástrojov. Môžeme teda konštatovať, že bez štandardov konzorcia OGC by realizácia bola otázná. Zároveň sa

preukázalo, že v súčasnosti sú už voľne širiteľné softvéry, využívané na vybudovanie aplikácií typu Web GIS, na veľmi dobrej úrovni. Webové mapové aplikácie majú v spoločnosti pestrú škálu využitia. Navyše funkcionality editácie geometrie, pridáva mapovým aplikáciám možnosť jednoducho aktualizovať informácie. Ak napríklad línia predstavuje cestnú komunikáciu, na ktorej prebehla nejaká polohová zmena, užívateľ ju prostredníctvom takejto aplikácie môže jednoducho zaznamenať a tým pádom udržiavať databázu cestných sietí stále aktuálnu. Rovnako sa touto cestou d

Pod'akovanie

Za cenné rady a pripomienky by som chcel poďakovať Mgr. Gabrielovi Petříčkovi, ktorý bol školiteľom mojej bakalárskej práce. Vďaka patrí tiež Doc. RNDr. Eve Mičietovej PhD., za usmerňovanie počas celého štúdia na Katedre kartografie, geoinformatiky a diaľkového prieskumu Zeme.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Peng Z. R., Tsou M. H. (2003) Internet GIS: distributed geographic information services for the internet and wireless network. John Wiley and Sons, New Jersey, USA
- [2] Abrahám D. (2012) Tvorba webovej aplikácie s podporou mapovej služby WFS-T. (Bakalárska práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p. 62

Hodnotenie softvérov GIS z hľadiska vektorovej tvorby

Michal Beniak

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra kartografie,
geoinformatiky a diaľkového prieskumu Zeme, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko;
michal.beniak@gmail.com*

Abstrakt

There are a lot of softwares, which are dealing with GIS issue on the market now. In our thesis we evaluated the quality of selected programs within creating and editing vector layers according to method: Goal - Question - Metric, which was published in work of V. Basili (1994). Analyzed softwares were Quantum Gis (v.1.7 Wroclaw), Geomedia Professional (v.6.1) and ArcGis (ArcMap) (v.9.3). We applied this method inside of experiment consisting from creating of same thematic maps in every selected software enviroment. Maps show land cover classification on the basis of the orthophotos from Chopok - Jasná area, while the digitization was made within Corine Landcover. Main objectives are functionality of the processes, which were necessary to achieve the desired output (creating, editing, validation vector layers). Each of the objectives defined by a set of questions that lead to its fulfillment. Overall score participates in the final evaluation of a weight (%).

KLúčové slová: *software; GIS; funkcionalita; editation; vector layers*

Úvod a formulácia cieľa

Funkcionalita GIS softvérov je v súčasnosti diskutovanou témou. Trh disponuje mnohými softvérmí zaoberajúcimi sa vytváraním GIS. [1] Do našej práce sme vybrali konkrétne tri : Quantum Gis (v1.7 Wroclaw), Geomedia Professional (v6.1) a ArcGis (ArcMap) (v9.3). V týchto softvéroch sme sa zamerali na časť venovanú tvorbe a editácii vektorov. Vektorová grafika, na rozdiel od rastrovej, je matematicky definovaná a špičkovy presná. Z tohto hľadiska je teda kvalita výstupu závislá od možností tvorby a editácie vektorových vrstiev. Túto kvalitu bolo potrebné zistiť na základe štandardnej metódy. Z ponúkaných metód sme si vybrali metódu uverejnenú v práci V.Basiliho. Ide o metódu GQM (Goal – Question – Metric). V tejto metóde je potrebné zadefinovanie cieľov hodnotenia, ktorým je priradená váha na celkovom hodnotení a sú definované množinou otázok ktoré vedú k jeho naplneniu. [2]

Cieľom príspevku je teda zhodnotenie funkcionality vybraných softvérov z hľadiska vektorovej tvorby a editácie aplikovaním metódy GQM.

Materiál a metódy

Experiment na ktorom sme dokazovali funkcionalitu softvérov pozostával z vytvorenia polygónovej vrstvy krajinej pokrývky na podklade ortofotosnímkov. Ako podklad sme použili ortofotosnímkov z oblasti Jasná, Chopok. Polygónová vrstva krajinej pokrývky bola vytvorená v štandarde Corine LandCover. Tento štandard je vo všeobecnosti rozdelený do troch hierarchických úrovní. Prvá obsahuje iba 5 tried krajinej pokrývky a s ďalšou úrovňou rastie počet tried. V našej práci sme použili piatu hierarchickú úroveň navrhnutú Mgr. Hanou Stankovou, Phd. pre vysokohorský typ krajiny. [3]

Na hodnotenie funkcionality softvérov bola zvolená štandardná metóda Goal - Quest - Metric. V metodike vytvárania hodnotenia nám pomohli diela od Dobešovej a Basiliho. GQM je metóda dlhoročných výsledkov praktických skúseností a akademického výskumu a teda je relevantnou metódou na zisťovanie miery funkcionality. [4] Myšlienka tejto metódy je postavená na základe dosiahnutia stanovených cieľov za pomoci kontrolných otázok. Otázky vychádzajú z cieľa a mali by viesť k jeho realizovaniu. Na otázky sa odpovedá stručne a jasne. Následne sa odpovediam priradujú hodnoty, ktoré nám spolu udávajú výsledné hodnotenie. Metódou GQM a jej aplikovaním na softvéry je možné dosiahnuť výsledného hodnotenia softvéru. [5]

Úrovne metódy GQM :

Model metódy GQM je definovaný v troch úrovniach (Basili et al., 1994) [2]:

1. Konceptuálna úroveň (Goal –Cieľ)

V tejto úrovni je potrebné definovať ciele, ktoré sa určujú na základe rôznych dôvodov a pohľadov. Tieto ciele predstavujú hlavné dôvody hodnotenia.

2. Operačná úroveň (Question – Otázka)

V tejto úrovni je potrebné vytvoriť množinu reprezentatívnych otázok a odpovedí, ktoré vedú k naplneniu cieľa. Otázky musia viesť k naplneniu zvoleného cieľa. Formulujú sa tak aby ich odpoveď mohla nadobúdať iba 2 hodnoty. Väčšinou sa používajú odpovede áno-nie, dá sa- nedá sa a pod.

3. Kvantitatívna úroveň (Metric – Metrika)

V tejto úrovni je dôležité stanovenie váh, a teda celkového podielu pre každý z cieľov (podcieľov,skupinu otázok, každú otázku). Hodnota sa musí stanoviť tak, aby bola merateľná (%) a určuje sa expertným odhadom.

Fázy metódy GQM:

Realizácia hodnotiacej metódy GQM má 4 fázy [5] :

1. **Plánovanie** –navrhuje sa výsledný projekt hodnotenia. Pri tvorbe a editácií vektorových vrstiev boli vybrané 3 GIS softvéry. Hodnotenie sa sústreďuje na tvorbu, editáciu a validáciu vektorových vrstiev.
2. **Definícia** – definuje sa kompletný systém hodnotenia. Definujú sa ciele, otázky a váhy. Zostavuje sa tu celková forma hodnotiacej tabuľky v programe Microsoft Excel (hierarchické skupiny cieľov, otázky, váhy).
3. **Zber dát** – Aplikovanie vytvorenej hodnotiacej metódy a zber odpovedí.
4. **Interpretácia** – Vyhodnotenie zozbieraných dát a zostavenie výsledkov.

Výsledky a diskusia

Goal – Question – Metric (GQM) :

Úrovne GQM :

V prvej, konceptuálnej úrovni sme definovali ciele. Za ciele sme zvolili tvorbu, editáciu a validáciu vektorových vrstiev. Prvé dva sme rozdelili na dva podciele – základný a špeciálny. Tretí na tri podciele – základný, špeciálny a prichytávací. Na druhej, operačnej úrovni sme vytvárali vhodné otázky, ktoré nám viedli k naplneniu cieľov a podcieľov. Formulovali sme ich tak aby na ne bolo možné odpovedať iba „áno“ , „nie“ .

V tretej, kvantitatívnej úrovni sme definovali váhy ktoré sme priradili jednotlivým cieľom a podcieľom. Pri určovaní váh cieľov sme najväčšiu váhu priradili cieľu pre editáciu - 40% . Ostatným dvom sme priradili rovnako, po 30% z celkového hodnotenia. Toto rozhodnutie bolo konzultované viacerými odborníkmi v oblasti GIS.

Fázy GQM :

V plánovacej fáze sme navrhli celkový projekt. Vybrali sme si konkrétne aplikácie (QGIS, Geomedia Professional, ArcGis) a ako objekt sme charakterizovali tvorbu a editáciu vektorových vrstiev. Fáza definície spočívala v určení cieľov, podcieľov a váh a teda predstavuje úroveň GQM. Vo fáze zberu dát sme zozbierali odpovede na vytvorené otázky. Posledná interpretačná fáza predstavovala vyhodnotenie a analýzu dát.

Tvorba vrstvy krajinej pokrývky:**Quantum GIS v.1.7 :**

Vytváranie tejto vrstvy bolo pomerne jednoduché a nestretli sme sa s žiadnymi väčšími problémami. Program aj napriek zapnutému nástroju na prichytávanie vytváral preťahy, nedot'ahy či duplicitné body. Tento program nedokáže prichytávať na momentálne vytváraný objekt. Za najväčšiu nevýhodu programu Quantum Gis však považujeme jeho nestabilitu, program mnohokrát prestal pracovať.

Geomedia Professional v.6.1 :

Tento program je založený na formáte databáz. Všetky prvky spolu tvoria databázu uloženú v tzv. sklade dát (warehouse). [6] Vytváranie databázy o krajinej pokrývke bolo oveľa prijateľnejšie ako v predchádzajúcom programe. Pomocou líniovej siete, ktorá predstavovala hranice medzi jednotlivými triedami Corine Landcover a nástroja na tvorbu polygónov z línií sme spravili bezchybnú topológiu. Program bol stabilný a ani jeden krát za celý čas konania tejto časti experimentu nepadol.

Arc Gis v.9.3 :

Program Arc Gis disponuje množstvom subprogramov v ktorých prebiehala aj tvorba samotnej vrstvy. Databázu sme vytvárali v subprograme Arc Catalog a následnú digitalizáciu v Arc Map. Možných metód bolo viacero. Bezchybnej topológie je v tomto programe možné dosiahnuť dvomi spôsobmi. Prvý je postupnou tvorbou polygónou za pomoci nástroja "Trace Tool" a druhý je tvorbou pomocou líniovej siete, ktorú sme následne exportovali na vrstvu polygónov. Program Arc Gis bol takisto spoľahlivý a stabilný.

Výsledky nášho experimentu sú zhrnuté do prehľadnej tabuľky.

Tab. 1 Hodnotiaca tabuľka

	Tvorba (30%)	Editácia (40%)	Validácia (30%)	SPOLU (100%):
Quantum GIS 1.7 Wroclav	8,57	25,83	7,5	41,90
Geomedia Professional 6.1	24,44	38,89	16,43	79,76
Arc GIS 9.3	24,29	38,89	10	73,18

Pri analýze celkového skóre vidíme približne rovnaké hodnoty pri softvéroch Geomedia Professional a Arc Gis. Tieto softvéry dosiahly nad 70% z celkového hodnotenia zatiaľ čo program Quantum Gis nezískal ani nadpolovičnú hodnotu (41,9%). Z hľadiska tvorby tesne vyhral program Geomedia Professional nad programom Arc Gis. V tomto ciele

dosiahli nad 24% z celkových 30. Tieto programy ponúkajú širokú škálu nástrojov na tvorbu vertexov línií, polygónov ako aj na tvorbu zaoblených hrán viacerými spôsobmi. Program Quantum GIS v tomto ciele získal iba 8,5% a teda ponúka najmenšie možnosti tvorby. Neponúka tvorbu základných geometrických útvarov ani tvorbu oblúkových hrán.

Pri analýze cieľa pre editáciu vidíme, že programy Geomedia Professional a Arc Gis tu dosahujú skoro plný počet percent pridelených tomuto cieľu (39%). Z nástrojov spomenieme napríklad predĺženie línie po prienik, zjednotenie objektov, tvorba polygónov z línií alebo naopak atď. Program Quantum Gis tu získal opäť najmenej počet percent avšak z hľadiska základnej editácie sa dokáže rovnať ostatným dvom programom.

Ako posledný bol cieľ týkajúci sa validácii vektorových vrstiev. V tomto ciele už dominoval hlavne program Geomedia Professional, ktorý dosiahol 16,5% z 30-tich možných. Toto skóre dosiahol najmä vďaka premysleným a dobre pracujúcim nástrojom na prichytávanie, ktorý má v tomto programe najširšie možnosti. Ako jediný zo softvérov ponúkal program Geomedia možnosť prichytávania na podkladový raster.

Záver

V našej práci sme sa snažili pomôcť užívateľom GIS programov k výberu toho navhodnejšieho z hľadiska tvorby a editácie vektorových vrstiev. Snažili sme sa priblížiť im všetky možnosti, ktoré dané programy ponúkajú. Z práce vyplýva, že z daného hľadiska sú najvhodnejšie programy Geomedia Professional a Arc Gis. Je to z dôvodu širších možností pri tvorbe a editácii vektorových vrstiev. Voľne šíriteľný Quantum GIS síce nedosiahol v celkovom skóre dostatok bodov, avšak jeho funkcionality sa dá výrazne vylepšiť pomocou pluginov, ktoré sú dostupné na internete. V našej práci sme však porovnávali iba základné inštalácie bez prídavných subprogramov. V neposlednom rade však pri výbere vhodného programu vplývajú aj finančné možnosti užívateľa. Program Quantum Gis je voľne šíriteľný narozdiel od ostatných dvoch, ktoré sú licenčne chránené a platené. Samotný výber je teda podmienený možnosťami užívateľa.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Hlásny T. (2007) Geografické informačné systémy Priestorové analýzy. 1.vydanie. Čižmárová – Partner, Poniky, Banská bystrica, Slovenská republika
- [2] Basili V., Caldiera G., Rombach H. D. (1994) Encyclopedia of Software Engineering. New York: John Wiley & Sons, New York, USA
- [3] Stanková H. (2008) Mapovanie krajinnej pokrývky vysokých pohorí využitím digitálnych ortofotomáp. (Dizertačná práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava,
- [4] The Goal/Question/Metric Method [Citované: 10. Február 2013]
<<http://www.gqm.nl/>>
- [5] Dobešová Z. (2009) Hodnocení kartografické funkcionality geografických informačních systému. 1.vydanie. Papírtisk s.r.o., Olomouc, Česká republika
- [6] Intergraph [Citované: 2. Február 2013]
< <http://geospatial.intergraph.com/products/GeoMedia/Details.aspx> >

Trasovanie s využitím frikčných povrchov

Adriána Chovancová

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta,
Katedra kartografie, geoinformatiky a diaľkového prieskumu zeme,
Mlynská dolina, 842 15, Bratislava, Slovenská Republika;
adri220989@gmail.com*

Abstrakt

The presented work Routing by utilization of friction surfaces deals with the construction of the motorway section between the city of Žilina and the Ivachnová village using geographic information systems and simple spatial analysis. The main objective of this work is to find the optimal route of motorway, which is a compromise between the length and cost. Individual factors and their influence, which determine the overall course of the resulting routes such as elevation, land cover type and slope gradient in the direction of georelief flowlines, are also evaluated in the thesis. Analysis has been performed in Idrisi Taiga 16.1. software environment. Obtained results are visualized by map outputs. In conclusion, the results are evaluated and compared with the currently existing road network in the investigated area.

Keywords: *friction surface; land cover; the optimal route; DTM; surface slope*

Úvod a formulácia cieľa

Komplexné pochopenie procesov, ktoré nás obklopujú nám umožňuje iba plnohodnotná integrácia priestoru, času a atribútov. Práve štúdiom času a priestoru sa zaoberajú geografické informačné systémy. Jednou z najvýznamnejších analýz, ktorú nám poskytuje GIS prostredie je analýza vzdialeností. Vzdialenostné operáty sú skupinou nástrojov, ktoré poskytuje GIS pre geografické analýzy, pri ktorých zohráva hlavnú úlohu vzdialenosť. [1]

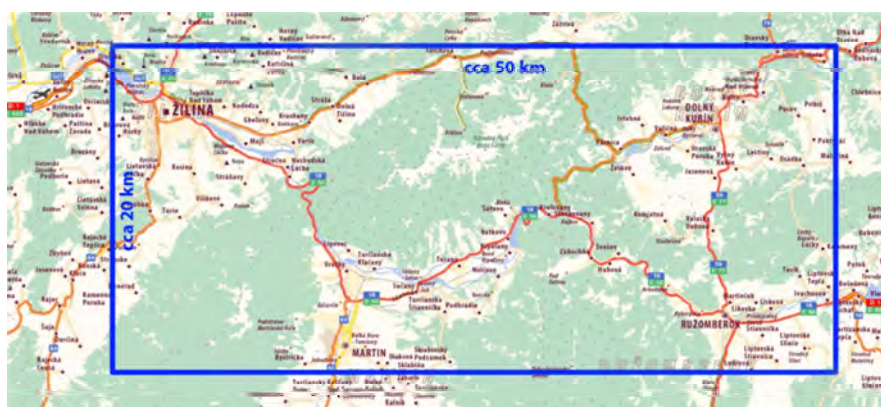
V trojrozmernom priestore je dôležité zohľadniť odpor pôsobiaci proti pohybu v závislosti od smeru alebo charakteru povrchu či veľkosti sklonu.

Rozhodujúcim faktorom pre výber danej témy bola jej aktuálnosť, pričom jej hlavným cieľom je nájsť optimálnu trasu pre výstavbu diaľničného úseku medzi mestom Žilina (začiatkový bod) a obcou Ivachnová (koncový bod). Modelovaná trasa predstavuje kompromis medzi nákladmi a vzdialenosťou, kde sa počíta s vplyvom viacerých faktorov, ktoré určujú celkový priebeh výslednej trasy. V experimente sme zohľadňovali faktory ako typ krajinej pokrývky a sklon georeliéfu. Práca uplatňuje využitie jednoduchej priestorovej analýzy, ktorá využíva tzv. vzdialenostné operácie na vyhľadávanie trás s minimálnymi nákladmi, ktoré vypočítame z tzv. vrstvy oceneného povrchu (frikčný povrch). Zámerom práce je taktiež zistiť možnosť využitia danej analýzy v praxi a porovnanie výsledkov s existujúcou dopravnou situáciou sledovanej lokality.

Materiál a metódy

Pri modelovaní pohybu cez skutočný terén je potrebné zohľadňovať viaceré faktory, ktoré vplyvajú na celkový výsledok. Prvým krokom pri riešení experimentu bolo získanie vstupných údajov o krajinnej pokrývke a sklone georeliéfu. Spracovanie vstupných údajov, analýza a vyhodnocovanie výsledkov prebiehalo v prostredí programu Idrisi Taiga 16.1.

Študované územie (Obr.1) siaha od mesta Žilina po obec Ivachnová. Zaberá asi 1 000 km² a spadá pod Žilinský kraj, ktorý sa nachádza na severozápade stredného Slovenska.



Obr.1 Výrez sledovaného územia lokality Liptov.

Definícia frikčného povrchu: „Trecí povrch napr. prezentuje rastrový súbor, v ktorom hodnota bunky vyjadruje úroveň ťažkosti alebo nákladovosti potrebnej na pohyb cez ňu, pričom hodnoty vo výslednom vzdialenostnom povrchu budú vyjadrovať vzdialenosť každej bunky od zdroja v jednotkách "nákladov"“.[2]

Hodnoty frikčného povrchu sú vyjadrené v jednotkách nákladov. Podľa potreby je možné aby tieto hodnoty určovali cenu, ktorú je nutné zaplatiť pri pohybe naprieč krajinou. Ďalej môžeme vyjadriť čas, ktorý je potrebný na cestovanie, alebo môžeme vyjadriť spálené kalórie či palivo spotrebované pri presune z počiatočného pixla k cieľovému objektu. [3]

Pre vykonanie analýzy a dosiahnutie hlavného cieľa práce sme museli postupne plniť čiastkové ciele, pod ktoré spadá aj získanie vstupných údajov. Našimi vstupnými údajmi boli voľne dostupné rastrové vrstvy krajinnej pokrývky a vrstva výšok.

Vrstva krajinnej pokrývky bola získaná z webovej stránky Európskej agentúry životného prostredia (<http://www.eea.europa.eu>). Táto vrstva obsahovala údaje v rastrovom formáte GeoTIFF s priestorovým rozlíšením 100m. Vrstvy sú polohovo priradené v rovinnom súradnicovom systéme ETRS89 a zobrazené boli pomocou Lambertovho azimutálneho

ekvivalentného zobrazenia. Pixle určujú kategóriu krajinej pokrývky v klasifikačnom systéme CORINE Land Cover, 3 úroveň podrobnosti. Popis jednotlivých kódov krajinej pokrývky je poskytovaný Slovenskou agentúrou životného prostredia. Údaje o krajinej pokrývke boli získané za rok 2000.

Ďalšia vrstva, ktorá bola použitá pri riešení experimentu bola vrstva výšok, ktorá bola získaná z výsledkov topografickej radarovej misie SRTM a jej stiahnutie je možné na webstránke (<http://srtm.csi.cgiar.org/SELECTION/inputCoord.asp>). Stiahnuté údaje boli v rastrovom formáte GeoTIFF a poskytujú informácie o nadmorskej výške s rozlíšením 90m, pričom jednotlivé pixle určujú nadmorskú výšku v metroch. Práve z digitálneho výškového modelu bola za pomoci softvéru sekundárne odvodená vrstva sklonu georeliéfu.

V iniciálnej fáze riešenia boli navrhnuté tri trasové varianty, reprezentujúce plánovaný priebeh diaľnice v sledovanom úseku, pričom každý z nich zohľadňuje vplyv iných faktorov, ktoré ovplyvňujú priebeh výslednej ideálnej trasy. Každá modelovaná situácia vychádzala z iných vstupných údajov:

- Trasovanie na základe krajinej pokrývky
- Trasovanie na základe sklonov georeliéfu
- Trasovanie na základe krajinej pokrývky a sklonov georeliéfu

Výsledkom uvedeného trasovania sú tri rôzne trasy, pričom každá bola vypočítaná ako ideálna (najlacnejšia, najrýchlejšia) z danej vstupnej vrstvy. Pri vrstve krajinej pokrývky sme zohľadňovali rôzne náročnosti prechodu terénom cez jednotlivé typy krajinej pokrývky. Trasovanie s využitím vrstvy sklonov georeliéfu reprezentuje trasa, kopírujúca najmenšie sklony georeliéfu. Trasovanie na základe krajinej pokrývky a sklonov georeliéfu vychádza z tzv. dvojitého povrchu (dvojitá vrstva) a predstavuje kompromis medzi veľkosťou sklonu a typom krajinej pokrývky.

Riešenie experimentu sme vykonali v prostredí programu Idrisi Taiga 16.1, kde sme na analýzu využili ponúkané moduly:

COST - ako vstupné údaje potrebuje vrstvu s frikčným povrchom a vrstvu, ktorá udáva odkiaľ sa majú počítať náklady (začiatková bod). Výsledkom je spojitá rastrová vrstva, ktorú nazývame aj ako „povrch nákladov vzdialeností“. Tento modul ponúka na vypočítanie frikčného povrchu dva rôzne algoritmy. Algoritmus **COSTPUSH**, ktorý je rýchlejší a pracuje veľmi dobre, keď frikčný povrch nie je zložitý alebo nemá tvar siete. Algoritmus **COSTGROW** dokáže pracovať so zložitými povrchmi, ktoré môžu prípadne obsahovať aj bariéry znemožňujúce pohyb. V experimente bol využitý práve algoritmus **COSTGROW**.

PATHWAY- doplnkový modul k modulu **COST**, ktorý vie z povrchu nákladov vypočítať najvýhodnejšiu trasu zo štartového do cieľového bodu.

Výsledky a diskusia

Diaľnica D1 je v rámci Slovenska najdôležitejším dopravným ťahom v smere západ - východ. Dobudovaním diaľničného úseku Žilina – Martin - Ružomberok – Ivachnová sa predpokladá zlepšenie dopravných podmienok na celom tomto ťahu.

Trasovanie, kde bola vstupnou vrstvou vrstva krajinej pokrývky, sme hodnoty frikcií zadefinovali podľa toho, cez aký typ krajinej pokrývky by mala trasa vzhľadom na náročnosť prechodu viesť (oblasti s najmenším odporom). Vytvorili sme frikčný povrch s hodnotami z intervalu $<1,100>$ podľa potreby nasledovne:

Polia, lúky, pasienky, poľnohospodárska krajina, areály s riedkou vegetáciou a podobné menej náročné povrchy na prechod a možnú výstavbu, majú nízke hodnoty frikcií. Naopak miesta, ktorým by bolo ideálne vyhnúť sa pri výstavbe, majú hodnoty vysoké (súvislá zástavba, priemysel, areály letísk, mestská zeleň, vodné plochy, skaly). Výsledná modelovaná trasa (Obr.2) prechádza najčastejšie cez krajinnú pokrývku, ktorá predstavuje poľnohospodársku pôdu (72%), ďalej plochy reprezentujúce lesy (28%) a minimálne percento tvorí trasa prechádzajúca cez umelé povrchy (0,2%). Keďže sme nebrali do úvahy fakt, že v skúmanom území sa nachádzajú dva národné parky, nastala situácia, že trasa prechádza priamo cez jeden z nich, konkrétne cez Národný park Malá Fatra. V tomto prípade sa trasovanie nepreukázalo ako efektívne v praxi, svojím priebehom sa nezhoduje so žiadnou skutočnou trasou. Dĺžka trasy by predstavovala asi 78km. Napriek tomu sa dosiahol oveľa uspokojivejší výsledok pri využití kompromisu, ktorý sme dosiahli sčítaním ocenennej vrstvy krajinej pokrývky a sklonu (vytvorenie tzv. dvojitého povrchu).

Vrstva sklonov georeliéfu bola použitá ako ďalšia vstupná vrstva pri modelovaní, kde sme preferovali prechod trasy cez oblasti s najnižšími hodnotami sklonu a vyhýbali sa oblastiam, kde sú jeho hodnoty vysoké. Najväčší podiel z celkovej trasy predstavujú úseky, ktoré prechádzajú cez oblasti s veľkosťou sklonu v intervale od $1 - 5^\circ$ (46%) a $5 - 10^\circ$ (31%). So zvyšujúcim sklonom klesá výskyt plánovanej trasy a preto sú dosahované hodnoty v intervale $10 - 15^\circ$ nižšie (16%) a najnižšie v intervale $15 - 20^\circ$ (6%). Týmto sme dosiahli trasu diaľnice (dĺžka 67km), ktorá sa vyhýba pohoriam a prechádza kotlinami ako sú žilinská, turčianska či liptovská. V skutočnom teréne sa vo viacerých úsekoch zhoduje s priebehom cesty E50, ktorá spája Žilinu – Ružomberok. Tento variant sa javí ako efektívny pre výstavbu, čo potvrdzuje aj veľká zhoda našej simulovanej trasy s plánovanou trasou podľa Národnej

diaľničnej spoločnosti (NDS), hlavne v diaľničných úsekoch Turany – Hubová a Hubová – Ivachnová. NDS plánuje na úseku Turany – Hubová výstavbu tunelov Havran a Rojkov. Ďalší tunel (Čebrať) sa plánuje v úseku Hubová – Ivachnová.

Trasovanie na základe krajinej pokrývky a sklonov georeliéfu umožnilo vytvoriť kompromis medzi veľkosťou sklonu a typom krajinej pokrývky vytvorením tzv. dvojitého povrchu, ktorý sme dosiahli sčítaním práve spomínaných vrstiev krajinej pokrývky a sklonov. Modelovaná trasa sa javí ako najdlhšia trasa v porovnaní s ostatnými (83km), no zároveň prechádza cez relatívne ľahko zjazdový a pre výstavbu diaľnice ideálny terén. Vyhýba sa vysokým sklonom a prechádza cez oblasti s relatívne nízkymi výškami. Väčšinou prechádza cez polia, lúky, pasienky a podobne nenáročný typ krajinej pokrývky. Zo Žiliny smeruje južne na obec Lietavská Lúčka, kde sa stáča na severovýchod a pokračuje až do obce Varín. Tu prechádza cez rieku Váh a napája sa na existujúcu cestu druhej triedy. Ďalej kopíruje os Terchovskej doliny a severnú hranicu Národného Parku Malá Fatra a pri obci Valaská Dubová sa napája na cestu I/59. Ružomberok obchádza zo SV strany a smeruje do cieľového bodu (obec Ivachnová).



Obr.2 Výsledné trasy, ktoré boli vygenerované ako ideálne vzhľadom na konkrétny faktor

Záver

Hlavným cieľom práce bolo nájsť optimálnu trasu, ktorá predstavuje kompromis medzi dĺžkou a nákladmi na výstavbu diaľničného úseku Žilina – Ivachnová. Pri riešení experimentu boli využité viaceré faktory na základe ktorých bol priebeh ideálnej trasy modelovaný. Každá trasa vychádzala z iných vstupných údajov a tak sme vytvorili tri rôzne situácie trasovania na základe: krajinej pokrývky, sklonov georeliéfu, krajinej pokrývky a sklonov georeliéfu.

Výsledky, ktoré boli po uskutočnení počítačového experimentu dosiahnuté predstavovali tri trasy, pričom každá je vypočítaná ako ideálna vzhľadom na použitú vstupnú vrstvu a faktor, ktorý sa zohľadňoval. Krajinná pokrývka bola vrstva, kde sme brali do úvahy rôzne náročnosti prechodu terénom cez každý typ krajinej pokrývky. Trasa, ktorá vychádzala z podkladovej vrstvy sklonu georeliéfu, kopíruje najmenšie hodnoty sklonu. Posledná modelovaná situácia vychádza z vrstiev krajinej pokrývky a sklonov georeliéfu, čo je prípad tzv. dvojitého povrchu a predstavuje kompromis medzi veľkosťou sklonu a typom krajinej pokrývky.

Pod'akovanie

Úprimné poďakovanie patrí Mgr. Jurajovi Strakovi, ktorý mi počas spracovávania a písania práce vždy ochotne poskytol pomoc a usmerňoval ma svojimi odbornými radami. Tiež sa chcem poďakovať všetkým, ktorí mi akýmkoľvek spôsobom pomohli pri riešení tejto práce.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Tuček J. (1998) Geografické informačné systémy. Technická univerzita, Zvolen, p.186
- [2] Kusendová D., Szabová M. (1998) *Vzdialenostné a sieťové analýzy – Analytické nástroje GIS*. Dostupné na: <http://gis.fns.uniba.sk/kartografickelisty/archiv/KL6/11.pdf>
- [3] Eastman J. R. (2008). *IDRISI Taiga Tutorial: Tutorial Version 16.02, 2009*, Clark Labs

Komplexná geografická analýza fotovoltaického priemyslu na Slovensku so zameraním na pozemné systémy

Marek Chovanec

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra regionálnej geografie, ochrany a plánovania krajiny, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko;
chovanec89@gmail.com*

Abstrakt

Terrestrial photovoltaic power plants were built in Slovakia, only 1 and a half years, until legislative action this rapidly growing industry stopped. The largest concentration of these plants were built in districts that are along the border with Hungary. Terrestrial photovoltaic systems are evaluated in this work for spatial level by various indicators, as well as from the pedogeographic view, in which climatic regions and soil types, these plants are located.

KLúčové slová: *fotovoltaika; solárna energia; pozemné systémy; pôdne typy*

Úvod a formulácia cieľa

Prvé pozemné fotovoltaické systémy boli spustené do prevádzky už v januári 2010 vďaka prijatím zákona č. 309/2009 Z. z. o podpore obnoviteľných zdrojov energie, ktorý nadobudol účinnosť 1.9.2009 [1]. V roku 2020 malo Slovensko podľa národného akčného plánu vydané MH SR, malo dosiahnuť inštalovaný výkon solárnych zariadení 300 MW [2]. Kým do konca roka 2010 bolo na Slovensku nainštalovaných približne 182 MW pozemných elektrární, v júni 2011 ich bolo približne už 476 MW [3]. Keďže strešné fotovoltaické systémy neustále pribúdajú a nedajú sa všetky lokalizovať, rozhodol som sa pre analýzu iba pozemných systémov, ktoré vplyvom legislatívnych opatrení sa mohli budovať iba do júla 2011. Cieľom predkladanej práce je zhodnotiť vývoj pozemných fotovoltaických systémov z hľadiska priestorového rozmiestnenia na rôznych úrovniach Slovenska so zameraním na pedogeografické podmienky s využitím koeficientu lokalizácie na úrovni okresov.

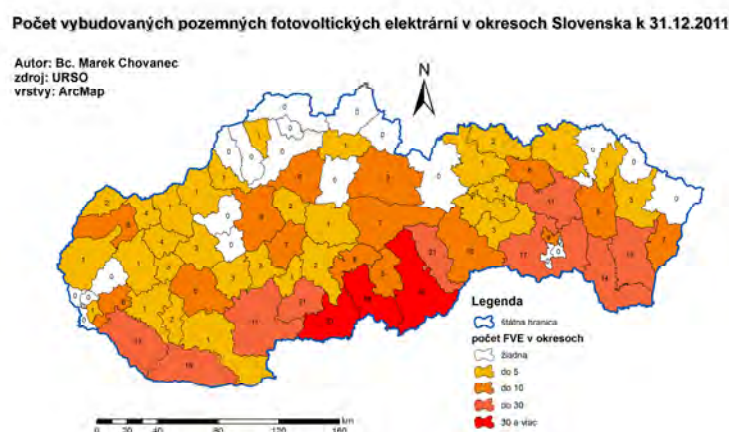
Materiál a metódy

Základným dokumentom pre lokalizáciu pozemných fotovoltaických elektrární bol Zoznam výrobcov elektrickej energie z obnoviteľných zdrojov za rok 2011, ktorý vydal ÚRSO [3]. Ďalšími dokumentmi prispievajúcimi hlavne k doplneniu tohto zoznamu poslúžili právoplatné rozhodnutia úradu pre reguláciu sieťových odvetví o výrobe elektrickej energie z OZE pre rok 2012 [4]. V neposlednom rade mi uľahčilo prácu aj nahliadnutie do energetických auditov fotovoltaických elektrární vykonané firmou Energia-Jarás, s.r.o. [5].

Ako základné metódy pre posúdenie finálnej lokalizácie pozemných fotovoltaických systémov som využil mapové servery maps.google.sk a bing.com/maps, vďaka ktorým bolo možné presne lokalizovať približne štvrtinu pozemných systémov pomocou niektorých aktuálnejších satelitných snímok častí Slovenska. Ďalšími užitočnými spôsobmi presnej lokalizácie bola nová služba Streetview a digitálna mapa katastrálneho portálu, kde sa vo väčšine prípadov dala presne lokalizovať parcely na ktorých sú tieto elektrárne vybudované. Finálne sa mi podarilo presne lokalizovať 91% zo všetkých pozemných elektrární. Pre detailnejší pohľad zastúpenia pozemnej fotovoltaiky v jednotlivých okresoch Slovenska som zohľadňoval aj výkon fotovoltaických panelov pripadajúci na 1 obyvateľa okresu a koeficient lokalizácie pozemných elektrární v porovnaní so zastúpením priemyselných podnikov v danom okrese. Poslednými výstupmi sú grafy, ktoré znázorňujú zistenia z kódov bonitovaných pôdno-ekologických jednotiek (BPEJ) [6]. Pre tento grafický výstup mi poslúžila mapová služba registra pôdy na stránke podnemapy.sk. Zo 7 miestneho kódu som hodnotil iba klimatický región a pôdny typ, čo vyjadrujú prvé 4 číslice kódu.

Výsledky a diskusia

Na Slovensku je vybudovaných celkovo 437 pozemných solárnych elektrární s výkonom celkovo približne 476 MW. 50% z nich je pripojených do Stredoslovenskej distribučnej spoločnosti, 27% vo Východoslovenskej a 23% je ich v Západoslovenskej distribučnej spoločnosti. Iba 21% inštalovaných elektrární (100 MW) má výkon väčší ako 1 MW. Až v 22 okresoch Slovenska sa nenachádza žiadna pozemná fotovoltaická elektrárňa.

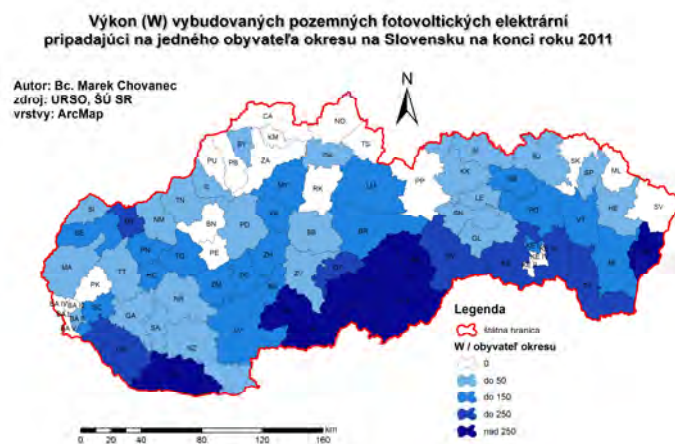


Obr. 1 Počet vybudovaných pozemných fotovoltaických elektrární v okresoch Slovenska k 31.12.2011
Zdroj: URSO

Okresy, ktoré majú viac ako 30 elektrární sú Veľký Krtíš (33), Rimavská Sobota (32)

a najviac elektrární je v okrese Lučenec (68). Z mapových výstupov je možné konštatovať že väčšie zastúpenie elektrární pozorujeme hlavne v okresoch pozdĺž našej hranici s Maďarskom kde sú namerané aj naše najvyššie úhrny globálneho slnečného žiarenia [7], s výnimkou okresov Nové Zámky (iba 1 elektrárňa) a Rožňava (10 elektrární).

Ďalším sledovaným ukazovateľom je pomer výkonu elektrární (vo Wattoch) k 1 obyvateľovi daného okresu. Nad 250 W na jedného obyvateľa dosiahlo 8 okresov: Komárno (261 W/obyv.), Sobrance (305 W/obyv.), Poltár (319 W/obyv.), Rimavská Sobota (357 W/obyv.), Revúca (730 W/obyv.), Veľký Krtíš (788 W/obyv.), Krupina (883 W/obyv.) a najviac okres Lučenec (až 1059 W/obyv.).



Obr. 2 Výkon vybudovaných pozemných fotovoltaických elektrární pripadajúci na jedného obyvateľa okresu na Slovensku na konci roku 2011
Zdroj: URSO, ŠÚ SR

Posledným ukazovateľom na úrovni okresov mi poslužil koeficient lokalizácie pozemných fotovoltaických systémov v pomere s počtom priemyselných podnikov na Slovensku. Tu sa znova ukázali najvyššie hodnoty v okresoch pri južnej slovenskej hranici. Najvyššie koeficienty dosiahli okresy Komárno (0,021), Trebišov (0,023), Košice-okolie (0,029), Krupina (0,044), Revúca (0,044), Rimavská Sobota (0,064), Veľký Krtíš (0,069) a Lučenec (0,143). Koeficient lokalizácie pre celé Slovensko má hodnotu 0,561.

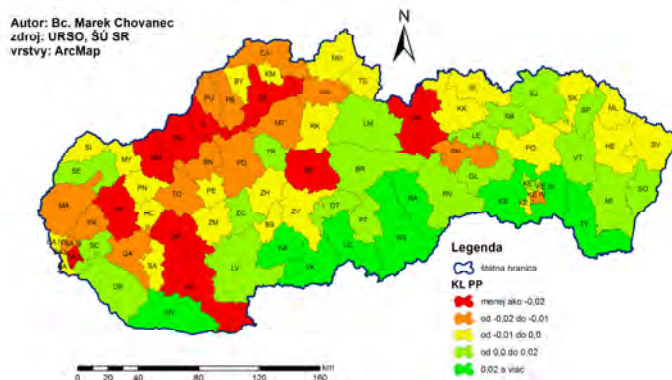
Koeficient lokalizácie pre okresy som využil podľa vzorca:

$$KL_{FEPP} = (FE_i / \sum FE_i) - (PP_i / \sum PP_i) \quad [I.]$$

Koeficient lokalizácie pre celé Slovensko som využil podľa vzorca:

$$KL_{FEPP} = 1/2 \sum | (FE_i / \sum FE_i) - (PP_i / \sum PP_i) | \quad [II.]$$

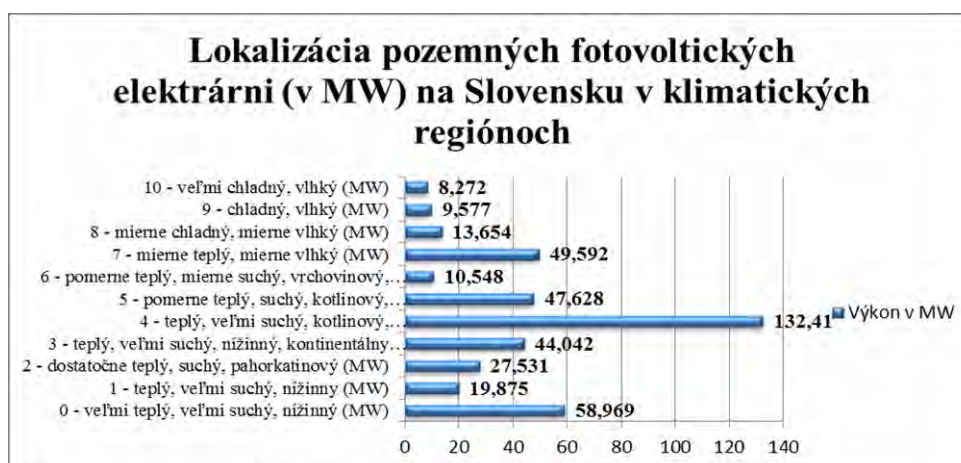
Koeficient lokalizácie vybudovaných pozemných fotovoltaických elektrární v pomere ku počtu priemyselných podnikov v okresoch Slovenska v roku 2011



Obr. 3 Koeficient lokalizácie vybudovaných pozemných fotovoltaických elektrární v pomere ku počtu priemyselných podnikov v okresoch Slovenska v roku 2011

Zdroj: URSO, ŠÚ SR

Pri identifikácii BPEJ som využil presné lokality približne 91% všetkých elektrární, ktoré som spätne vyhľadal v mapovej službe registra pôd a identifikoval pre každú sledovanú elektrárňu kód BPEJ. Prvé dve číslice kódu BPEJ vyjadrujú klimatický región. Najviac elektrární (až 132 MW) sa nachádza v 4. klimatickom regióne, ktorý je teplý, veľmi suchý, kotlinový a kontinentálny. Približne 58 MW elektrární sa nachádza v našom najteplejšom klimatickom regióne, ktorý je veľmi teplý, veľmi suchý a nížinný.



Obr. 4 Lokalizácia pozemných fotovoltaických elektrární (v MW) na Slovensku v klimatických regiónoch

Zdroj: BPEJ podnemapy.sk

V poradí ďalšie dve číslice kódu BPEJ vyjadrujú bližšie určenie pôdneho typu. Nakoľko ich môže byť až 99 rôznych podtypov, rozhodol som sa ich začleniť do ôsmich zlúčených kategórií. Najviac pozemných fotovoltaických elektrární je vybudovaných na

luzizemiach a pseudoglejoch (až 29% teda 123 MW), nasledujú černozeme a čiernice (so zastúpením 20%, teda 84 MW) a ďalej na kambizemiach (19%, 81 MW). Na našich najúrodnejších pôdach (černozeme, čiernice a hnedozeme) sa nachádza 35% fotovoltaických elektrární. Otázkou však ostáva či sa tieto pozemky poľnohospodársky dlhodobo využívali pred výstavbou elektrárne. 1 MW elektrárne zaberá plochu priemerne 2 až 2,5 ha v závislosti od použitej technológie, terénu a iných koncepčných riešení projektu [5]. Faktom ostáva, že pred výstavbou elektrárne investor je povinný si vybaviť niekoľko povolení, ktoré zahŕňa aj posudzovanie vplyvov na životné prostredie.



Obr. 5 Lokalizácia pozemných fotovoltaických elektrární na Slovensku na pôdných typoch
Zdroj: BPEJ podnikmapy.sk

Záver

Príspevok analyzuje pedogeografické podmienky ako aj vyhodnotenie finálneho rozloženia fotovoltaických systémov na Slovensku so zameraním na väčšie koncentrácie. Možno konštatovať, že lokalizácia veľkých koncentrácií pozemnej fotovoltaiky vysoko koreluje s najvyššími hodnotami globálneho horizontálneho žiarenia hlavne v okresoch, ktoré sú pri hraniciach s Maďarskom. Najväčšia koncentrácia fotovoltaických elektrární v tesnej blízkosti veľa seba sa nachádza na území mesta Lučenec, v časti Ľadovo (34 elektrární s výkonom 34 MW). Legislatívne opatrenia ukončili toto sľubne vyvíjajúce odvetvie energetického priemyslu za obdobie roka a pol, ale aj vplyvom rýchlo klesajúcej a nepravidelnej zmeny výkúpnej ceny elektriny.

V úvahe do akej miery nám tieto elektrárne zaberajú úrodnú pôdu je veľmi zložitá. Zo sledovaných elektrární je síce približne 35% lokalizovaných práve na našich najúrodnejších pôdach, no podstatnejší je fakt či daná lokalita bola pred výstavbou poľnohospodársky

využívaná alebo na to bol dostatočne opodstatnený dôvod pre výstavbu týchto elektrární.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Zákon č. 309/2009 Z. z. o podpore obnoviteľných zdrojov energie a vysoko účinnej kombinovanej výroby a o zmene a doplnení niektorých zákonov
- [2] Národný akčný plán pre energiu z obnoviteľných zdrojov. Ministerstvo hospodárstva a výstavby SR (Slovenská republika) 6. 10. 2010
- [3] Úrad pre reguláciu sieťových odvetví – zoznam výrobcov s doplatkom za rok 2011 [Citované: 8. marec 2013]
http://www.urso.gov.sk/doc/dokumenty/OZE_Zoznam%20Vyrobcom%20s%20doplatkom%20za%20rok%202011.pdf
- [4] Úrad pre reguláciu sieťových odvetví [Citované: 8. marec 2013]
<http://www.urso.gov.sk/sk/regulacia/elektroenergetika/cr/oze>
- [5] Energetické audity fotovoltický elektrární od firmy Energia-Jarás, s.r.o. [Citované: 8. marec 2013]
<http://www.energia-jaras.sk/index.php/sk/referencie/solaren/audityreferencie.html>
- [6] Mapová služba pôdneho portálu pre identifikáciu BPEJ [Citované: 8. marec 2013]
<http://www.podnemapy.sk/bpej/viewer.htm>
- [7] Mapy globálneho horizontálneho žiarenia od firmy Geomodel Solar [Citované: 8. marec 2013]
http://solargis.info/doc/_pics/freemaps/1000px/ghi/SolarGIS-Solar-map-Slovakia-sk.png

Ballová metóda využitá na hierarchizáciu regiónov cestovného ruchu na Islande

Juraj Dobšovič, Tomáš Charvát

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra regionálnej geografie, ochrany a plánovania krajiny, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko; dobso@watching.sk

Abstrakt

This paper highlights challenges of Ball method and its use in practice. It also seeks to highlight the possibility of adding another indicator (option of visit of area by travel agencies), which is trying to use the entire spectrum of preconditions of tourism. Then it points out the advantages and disadvantages of this indicator and excludes the possibility of exchange for the Ball method it self. The whole work is based on previous work : The Geographic Characteristics and Impact of UNESCO sites on Tourism of Island. The paper focuses and confronts with the specifics of the country.

Kľúčové slová: *ballová metóda; Island; cestovný ruch*

Úvod a formulácia cieľa

Ballová metóda patrí k často kritizovaným metódam pre svoju častú (možnú) neobjektívnosť a preto, že nedokáže správne zhodnotiť hierarchizáciu dôležitosti jednotlivých komponentov, ktoré do nej vstupujú. Preto je najsprávnejšie, hľadať také komponenty, ktoré prechádzajú celým radom indikátorov, ktoré do tejto hierarchizácie vstupujú. Pri tvorbe práce zameranej na hierarchizáciu území Islandu sa tieto problémy zdali ešte vypuklejšie. Preto je v tejto práci predstavená jedna metóda, resp. čiastková metóda, ktorá lepšie vypovedá o hierarchizácii zvoleného územia, ktoré je charakteristické hlavne prílevom zahraničných turistov na aktívny cestovný ruch.

Materiál a metódy

Pri práci som vychádzal z mojej bakalárskej práce s názvom Geografická charakteristika a vplyv pamiatok UNESCO na cestovný ruch Islandu [1]. V tejto práci sa nachádzalo niekoľko analýz a bolo použitých viacero metód. Z nich dominovala ballová metóda. Tá bola vypracovaná na základe 4 základných indikátorov (dostupnosť, luxusnosti hotelov, národných parkov a možnosť návštevy týchto regiónov pomocou cestovných kancelárií). Ako regióny som sa stotožnil s administratívnym členením Islandu. Túto prácu a jej výsledky som podrobil dôkladnej analýze a následne som spravil syntézu zistených tvrdení. Tieto tvrdenia som následne porovnal a sformoval do tohoto príspevku.

Výsledky a diskusia

Pri tvorbe hierarchizácie území podľa atraktivity územia pre cestovný ruch sa musia zohľadňovať viaceré činitele. Ide o lokalizačné, realizačné a selektívne predpoklady [2].

V ballovej metóde sa vyskytujú problémy pri každom predpoklade, ktorý do nej vstupuje. Začnime selektívnymi predpokladmi. Samotné hľadanie činiteľa, ktorý môže vstúpiť do ballovej metódy je dosť problematické. Ako vyjadriť predpoklad možnosti obyvateľstva vycestovať do tejto lokality? Ako vyjadriť reklamu? Aké hodnoty jej pripísať? Selektívne predpoklady nám predsa vyjadrujú potenciálny charakter cestovného ruchu, do ktorého patria hlavne sídelné, politické, sociologické a demografické činitele [2]. Toto vyjadriť číselne a spraviť hierarchizáciu je veľmi problematické a nejasné. Napríklad pri Islande, ako krajine, ktorá je zameraná na prílev zahraničných turistov, sú tieto činitele veľmi podobné a hodnoty na všetky administratívne celky by mali byť približne (ak nie úplne) rovnaké. Jediný rozdiel je v špecifickom postavení hlavného mesta, odkiaľ je najviac obyvateľov napojených sociálnymi väzbami na ostatné oblasti, a kde žijú takmer 2/3 obyvateľstva Islandu [1].

V realizačných predpokladoch sa nachádza menej problémov a rozdiely medzi jednotlivými územiami sa zdajú o poznanie väčšie. Medzi základné realizačné činitele patria ubytovacie a stravovacie kapacity a dopravná dostupnosť územia. Zohnať údaje o stravovacích kapacitách je ale veľmi komplikované a neisté. Zohľadniť ich v ballovej metóde môže byť zmaťočné, keďže tieto zariadenia využívajú aj miestni obyvatelia. Pri ubytovacích kapacitách už tieto čísla čosi o možnostiach a realizácii cestovného ruchu napovedajú. Samotné ubytovacie kapacity sa dajú rozdeliť do viacerých úrovní. Na spomínanom Islande dominujú kempy, ale nájdeme tu aj ubytovanie v chatách, privátoch, penziónoch a hoteloch. Úroveň týchto zariadení sa značne líši. Keďže sa nedá dostať k presným štatistikám ubytovacích kapacít a ich využití a mnohé kempy sú zadarmo, resp. za dobrovoľný príspevok, tak viesť tieto štatistiky ani nie je možné. Jediné k čomu sa človek vie dostať sú hotelové kapacity. Aj tu sa ale vyskytujú problémy. Hotely sa na Islande využívajú minimálne. Pre klasický (aktívny) cestovný ruch skoro vôbec. Preto sú tieto štatistiky tiež neúplné a môžu nám viac napovedať len o služobnom cestovnom ruchu. Na služobný cestovný ruch sa využívajú hlavne luxusnejšie hotely (4* a 5*). Tieto sa sústreďujú do veľkých miest, alebo sú využívané na konferencie a školenia aj v iných častiach Islandu.

Dopravná dostupnosť územia sa dá vyjadriť viacerými číslami. Základom pre dopravnú dostupnosť územia, ktoré je orientované na zahraničných turistov, a ktoré je tak vzdialené od okolitého sveta, je prvoradá samotná možnosť dostať sa do krajiny. Nasleduje spojenie tejto možnosti s ostatnými časťami krajiny. Preto sa javí vytvorenie hierarchizácie územia pomocou dostupnosti pre turistu, ako prvá naozaj účinná hierarchizácia pre toto územie.

Lokalizačné činitele bývajú najviac subjektívne a najťažšie sa hodnotia. Každému človeku sa páči v krajine niečo iné. Kvantitatívne hodnotenie územia by mohlo vyzeráť tak, že koľko atraktivít sa nachádza na danom území, toľko bodov získa dané územie, a potom sa spraví hierarchizácia týchto území podľa získaných bodov. Vyvstáva tu iná otázka. Dajú sa dať na rovnakú úroveň dva vodopády, z ktorých jeden je o 50 metrov vyšší ako druhý? Alebo ak na jednom území bude viacero atraktivít, ako na druhom, ale druhé územie bude mať tieto atraktivity krajšie, väčšie, významnejšie, môže byť prvé územie radené pred druhým? Na druhej strane, keby sme to chceli hodnotiť kvalitatívne, museli by sme subjektívne alebo pomocou inej metódy (napr. formou ankety) určiť najprv hierarchizáciu atraktivít, a potom pomocou "mini" ballovej metódy zoradiť územia. Tiež sa tu ale vyskytuje množstvo problémov a neurčitostí. V práci o Islande boli zvolené národné parky, pretože turisti sa na Islande zameriavajú hlavne na prírodné atraktivity, ale toto kritérium má tiež veľa sporných bodov a samotná ballová metóda v nej môže byť terčom kritiky.

Práve preto by do ballovej metódy mal vstúpiť ďalší komponent, ktorý by nám mal o území viac vypovedať. Mal by zohľadňovať ekonomické záležitosti, časové možnosti turistu, atraktivitu územia a mnoho ďalších bodov. Mohla by sa ňou stať napr. možnosť navštívenia územia cestovnými kancelárkami (CK). V práci o Islande bolo zvolených prvých 25 ponúkaných zájazdov vyhládaných na internete. Tento komponent má hneď niekoľko výhod. Hlavnou výhodou je to, že cestovné kancelárie musia zohľadniť vo svojich ponukách ekonomické možnosti klientov, ich ubytovacie nároky, časové harmonogramy a samozrejme atraktivitu územia. Druhou výhodou je to, že okrem toho najlepšieho, čo sa v krajine nachádza, ponúkajú cestovné kancelárie aj mnoho doplňujúcich aktivít), aby sa líšili od toho, čo ponúkajú iné cestovné kancelárie, a aby ponúkali zájazdy pre čo najširšie spektrum záujemcov. Stručne povedané, riadia sa (alebo by sa aspoň mali riadiť) zákonmi trhu. V práci o Islande je to zohľadnené tým, či cestovná kancelária počíta v danej ponuke zájazdu so zastávkou v danej oblasti, alebo nie.

Dá sa uvažovať o miernej úprave komponentu napr. na počet dní strávených v oblasti, na počet zástavok v regiónoch. Postup a zmysel ale stále zostáva zachovaný. Cestovné kancelárie sa neriadia subjektívnymi názormi, ale zákonmi trhového mechanizmu. Otázne ostáva, či sa toto kritérium dá využívať pri všetkých krajinách. Otázny je taktiež počet, ktorý treba na dosiahnutie regulárneho výsledku. V prípade krajín orientujúcich sa na pasívny cestovný ruch s obrovskou rozlohou, by 25 zájazdov bol skresľujúci počet. Turecko má 81 administratívnych celkov [3]). Preto by sa pri väčších krajinách malo uvažovať najmenej o 100 ponukách. V Turecku by samozrejme dominovali prímorské letoviská, ale objaviť by sa tam mali už aj iné oblasti.

Otázka teda znie: Dala by sa celá ballová metóda nahradiť len hierarchizáciou regiónov podľa ponúk cestovných kancelárií?

Rozdelenie územia podľa potenciálu cestovného ruchu je veľmi zložitý. Cestovný ruch si musíme rozdeliť na všetky jeho zložky a vychádzať z nich.

Cestovný ruch môže byť :

a) organizovaný	b) neorganizovaný	
a) oddychový	b) služobný	c) liečebný

Samozrejme poznáme aj viaceré delenia CR (napr. podľa dĺžky pobytu), ale toto základné rozdelenie nám pomôže lepšie znázorniť daný problém. Je pravda, že neorganizovaný cestovný ruch v niektorých krajinách prevláda, ale často sa riadi podobným zmýšľaním ako organizovaný cestovný ruch. Samozrejme aj v neorganizovanom CR nájdeme výnimky. Klasický neorganizovaný cestovný ruch často zasahuje do vidieckeho turizmu, resp. odľahlých častí štátu, kde turista môže spoznať krajinu aj z iného pohľadu. Tieto časti majú cestovné kancelárie vo svojich ponukách spomínané len minimálne. Tieto časti teda vytvárajú iný typ cestovného ruchu a určite majú slabý potenciál na svoj ďalší rozvoj (bez nejakých väčších zmien územia). Z dôvodu, že samotné cestovné kancelárie mávajú v ponuke aj tieto územia (aj keď minimálne), tak samotná metóda by mala zohľadňovať aj tieto špecifiká. Napríklad na Islande sú takýmto územím Západne fjordy. Z množstva internetových stránok ako aj iných zdrojov je zjavné, že turisti ktorí chodia na Island "na vlastnú päsť", zavítajú do tejto oblasti len výnimočne. Pomer sa nápadne podobal pomeru ponúkaných zájazdov CK 1/25.

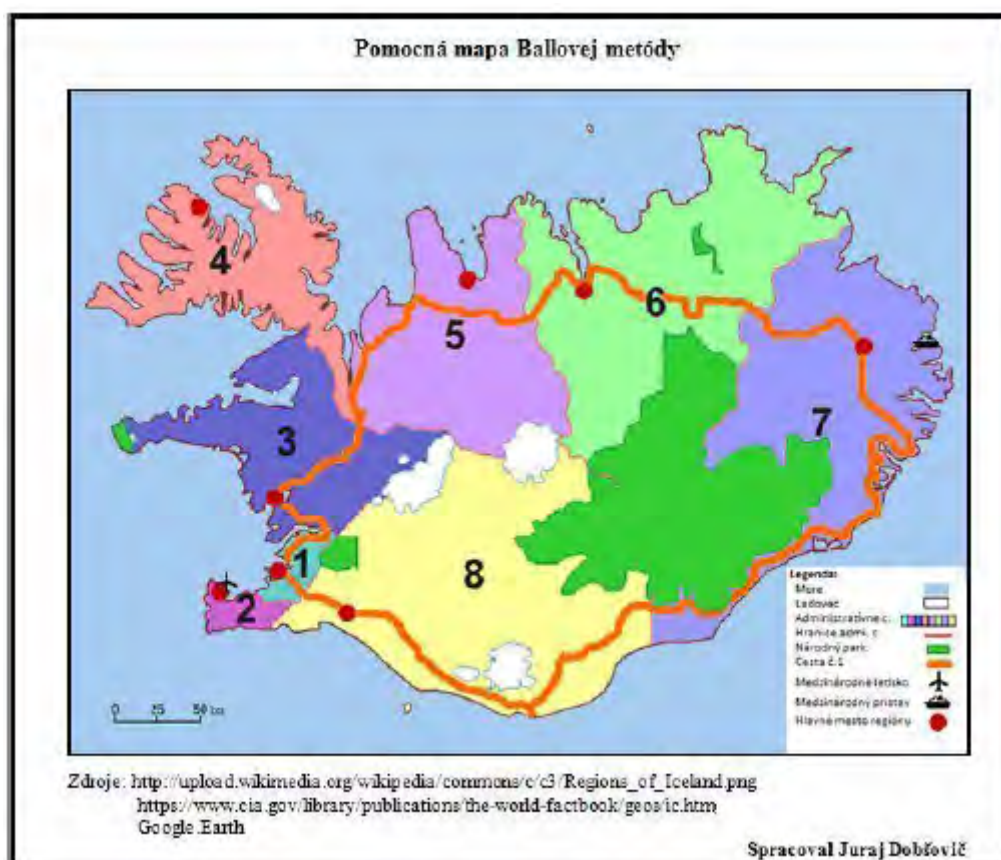
Väčší problém nastáva pri druhom delení. Služobný cestovný ruch býva väčšinou bez priamej organizácie CK. Lepšie povedané CK ho robia klientom na mieru. Výnimky môžu tvoriť nejaké celosvetové konferencie, resp. zájazdy spojené s návštevami výstav. Práve tu je veľká chyba pri spomínanej metóde. Priemyselné mestá a mestá, kde dominuje služobný

cestovný ruch, môžu byť v tejto metóde poddimenzované. V práci o Islande bola odstránená s doplnením hotelovými kapacitami vyšších tried hotelov. Práve do nich sa často orientuje služobný cestovný ruch. Liečebný cestovný ruch býva tiež pomerne málo organizovaný CK. Preto by v prípade použitia tejto metódy mal výstup skôr znieť: Potenciál oddychového cestovného ruchu.

Výsledky ballovej metódy v práci Dobšovič, 2011 sú v tab. 1. V tabuľke môžeme vidieť regióny zoradené podľa ich typu (1 najlepší - 4 najhorší).

Tab. 1 Zhrnutie ballovej metódy [1]

Na mapke	Administratívna oblasť \ kritérium	Dostupnosť územia pre cudzincov	Národné parky	Luxusné hotely	Možnosť navštíviť územie s cestovnou kanceláriou	Spolu
1	Höfuðborgarsvæði	3	4	1	1	9
2	Suðurnes	1	4	3	1	9
3	Vesturland	3	2	2	2	9
4	Vestfirðir	4	4	4	4	16
5	Norðurland vestra	3	4	4	3	14
6	Norðurland eystra	3	1	3	2	9
7	Austurland	2	3	4	2	11
8	Suðurland	3	1	3	1	8



Obr. 1 Pomocná mapa k tab 1. [1]

Ako môžeme vidieť, tak samotné CK slušne odzrkadľujú atraktivitu regiónov, ale vzdialenejšie regióny od letiska sú mierne poddimenzované. Je to spôsobené finančnou aj časovou dostupnosťou týchto regiónov. Táto dostupnosť má v prípade Islandu menší vplyv na neorganizovaný CR. [1]

Záver

Správne používanie ballovej metódy je problematické. V práci sa ukázali CK a ich ponuky, ako dobrý indikátor, ktorý nám môže napomôcť pri hierarchizácii území sledovaného štátu. Ale jeho samotné použitie by bolo nepresné, a preto, ak by sa použil len tento indikátor, tak by bolo vhodnejšie prácu nazvať: Možnosť návštevy územia CK. Do priamej hierarchizácie je potrebné pridať ďalšie špecifiká územia (služobný CR, pomer individuálneho CR a organizovaného a i.).

PodĎakovanie

Ďakujeme za podporu a rady Prof. Tolmáčimu, za pomoc s prekladom Mgr. Romana Mikuša a za pomoc s formálnymi vecami Mgr. Ivane Mečířovej

Zoznam použitej literatúry:

- [1] Dobšovič J. (2011) Geografická charakteristika a vplyv pamiatok UNESCO na cestovný ruch Islandu. (Bakalárska práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p. 10
- [2] Mariot P. (1983) Geografia cestovného ruchu. Veda, Bratislava, p 27
- [3] Zubriczký G. (2009) Geografia štátov sveta. Bratislava: Mapa Slovakia Plus s.r.o., Bratislava, p.27

Zmeny v rodinnom správaní na Slovensku počas druhého demografického prechodu

Lucia Foltýnová

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra humánnej geografie a demogeografie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko;
lucia.foltynova1@gmail.com*

Abstrakt

Slovakia, along with other post-communist countries, has passed the political, socio-economic and ideological changes which have also affected reproductive and family behaviour. It is reflected by many characteristic features such as nuptiality and divorce rates, by the average marriage age, new informal family unions- cohabitations as well as changing structure and size of households. The article deals with issue of changing family behaviour in Slovakia from both, the temporal and the spatial points of view.

Kľúčové slová: 2. demografický prechod; sobášnosť; kohabitácie; rozvodovosť; rodina; domácnosť

Úvod a formulácia cieľa

Slovensko sa v súčasnosti nachádza v období 2. demografického prechodu. V strednej a východnej Európe sa zmeny demografického správania začínajú prejavovať približne od 90. rokov 20. storočia a odrážajú sa najmä v reprodukčnom a rodinnom správaní jednotlivých populácií. [1]

Cieľom príspevku je štúdium a poznanie zmien v rodinnom správaní obyvateľstva na Slovensku za posledných 30 rokov. V tomto príspevku sa budem venovať predovšetkým procesom súvisiacim s formovaním rodiny (sobášnosťou), na základe sčítania obyvateľstva stručne zhodnotím jednotlivé typy rodiny a ich priestorovú diferenciáciu a takisto sa budem venovať aj rozvodovosti, ako jednej z foriem rozpadu a zániku manželstva a rodiny.

Materiál a metódy

Na zhodnotenie demografických procesov v čase a priestore boli v tomto príspevku použité metódy demografickej analýzy, štatistického hodnotenia demografických procesov a takisto aj ich grafická a kartografická interpretácia. V mapách boli jednotlivé výsledky zobrazované na úrovni okresov Slovenskej republiky, a to pomocou kartogramov a kartodiagramov.

Údajovú bázu tvorili prevažne výsledky zo SĽDB 1980 a SODB 2001. Pre doplnenie aktuálnejších informácií o sobášnosti a rozvodovosti na Slovensku som číselné údaje čerpala zo sústavnej evidencie z roku 2011, ktoré sú dostupné na stránke Štatistického úradu SR.

Výsledky a diskusia

Zmeny rodinného správania slovenskej populácie v čase prebiehajúceho 2. demografického prechodu majú svoje charakteristické znaky. Ide najmä o zvýšenie priemerného sobášneho a prvosobášneho veku, celkový pokles mier sobášnosti, rast priemerného veku prvorodičiek, nárast počtu rozvodov a kohabitácií, a takisto mimomanželskej plodnosti. Zároveň sa znižuje podiel úplných a zvyšuje podiel neúplných rodín, prudko sa zvyšuje počet i podiel jednočlenných, tzv. single domácností.

Sobášnosť

Slovenská populácia bola vo svojom dlhodobejšom vývoji charakteristická vysokou intenzitou sobášnosti a nízkym sobášnym vekom. Od začiatku 90. rokov však nastal jej prudký pokles a v súčasnosti sa hrubá miera sobášnosti pohybuje približne na úrovni 4,75‰ a nikdy doposiaľ nebola na takej nízkej úrovni. [2] Zapríčiňuje to viacero faktorov. Jedným z nich je časovanie sobáša a jeho odklad do vyššieho veku. Rastie teda priemerný vek pri sobáši a takisto aj priemerný vek pri 1. sobáši. V roku 2010 bol priemerný sobášny vek u žien približne 29 rokov a u mužov vyše 32 rokov. Priemerný prvosobášny vek sa pohyboval na úrovni necelých 28 rokov u slobodných žien a vyše 30 rokov u slobodných mužov. [2] Postindustriálna spoločnosť so sebou prináša silný individualizmus a dôraz sa kladie na jednotlivca a jeho záujmy. Neustále sa rozširujúce možnosti štúdia, cestovania a mimopracovných aktivít podnecujú k uprednostneniu osobných záujmov, budovaniu kariéry a dostatočnému finančnému zabezpečeniu, pričom záväzok v podobe manželstva a rodiny si ľudia naplánujú až na neskoršie obdobie vo svojom živote.

K znižovaniu intenzity sobášnosti prispieva i rozširovanie a čoraz väčšia akceptácia alternatívnych foriem manželstva- kohabitácií. U mladej a slobodnej zložky populácie kohabitácie predstavujú formu predmanželského spolužitia, avšak s perspektívou uzavrieť manželstvo v budúcnosti. So stúpajúcim vekom sa však táto perspektíva oslabuje a kohabitácie sa tak stávajú dlhodobými účelovými formami spolužitia, ktoré preferujú aj ovdovené a rozvedené osoby.

Rozvodovosť

Jedným z negatívnych dopadov na reprodukčné a rodinné správanie slovenskej populácie je vzrastajúca intenzita rozvodovosti a nárast podielu opakovaných sobášov. [3]

Hoci v minulosti patrilo Slovensko ku krajinám s pomerne nízkou intenzitou rozvodovosti, [4] do roku 2011 sa spoločnosť zmenila do takej miery, že až 43 uskutočnených rozvodov pripadalo na 100 sobášov [2]. Deje sa tak následkom ideových a hodnotových zmien jednotlivcov, rovnako aj sekularizácii spoločnosti, ktoré vedú k všeobecnému oslabeniu významu rodiny. Deti sa mnohokrát považujú za stabilitu manželstva, no ich priemerný počet v rodine klesá.

Typy rodiny

Slovensko od nástupu 2. demografickej revolúcie vykazuje trend postupného zmenšovania veľkosti rodín a znižovania počtu detí v rodinách. V histórii dominujúci model viacadetnej rodiny je v dnešnej dobe postupne nahradzovaný modelom nukleárnej, dvojdetnej rodiny. Jedným z príčin transformujúceho sa modelu rodiny by mohli byť i obavy z následného zníženia životnej úrovne, straty zamestnania, výraznejšieho obmedzenia voľného času, či dokonca zmarenia životných plánov.

Jednotlivé typy rodín a ich zastúpenie v okresoch SR možno analyzovať na základe údajov o cenzových domácnostiach, ktoré majú najvýpovednejšiu hodnotu o rodinách na Slovensku. Takmer na celom našom území je zaznamenaný pokles počtu členov domácnosti, ale aj počtu detí v rodine. V roku 2001 pripadalo vyše 1,7 dieťaťa na 1 rodinnú domácnosť s deťmi. [5]

V súčasnosti je na Slovensku najbežnejším typom domácnosti úplná rodina, ktorá predstavuje vyše 56% všetkých domácností, no za sledované obdobie jej podiel pozvoľne klesal. V rámci úplných rodín stále dominujú rodiny s deťmi (vyše 31 % zo všetkých cenzových domácností), no ich podiel sa takisto znižuje a čoraz častejšie sa vyskytujú úplné rodiny bez detí. V mnohých prípadoch sa jedná o mladý bezdetný pár, ktorý narodenie potomkov odkladá na neskoršie obdobie, ale takisto aj stále pribúda párov, ktoré v budúcnosti výchovu detí vôbec neplánujú.

Negatívny dopad nielen na jednotlivca, ale i celú spoločnosť môže mať aj rastúci výskyt neúplných (jednorodičovských) rodín, najmä s prítomnosťou závislých detí. Je to zapríčinené rastúcim počtom rozvodov, kedy sú deti vychovávané iba jedným z rodičov, zväčša matkou.

Pozornosť však vzbudzujú najmä domácnosti jednotlivcov, ktoré za posledné desaťročia zaznamenali najdynamickejší rozvoj. V roku 1980 tvorili takmer 20 % všetkých domácností na Slovensku [6] a do roku 2001 ich podiel narástol až na vyše 30 %. [5]

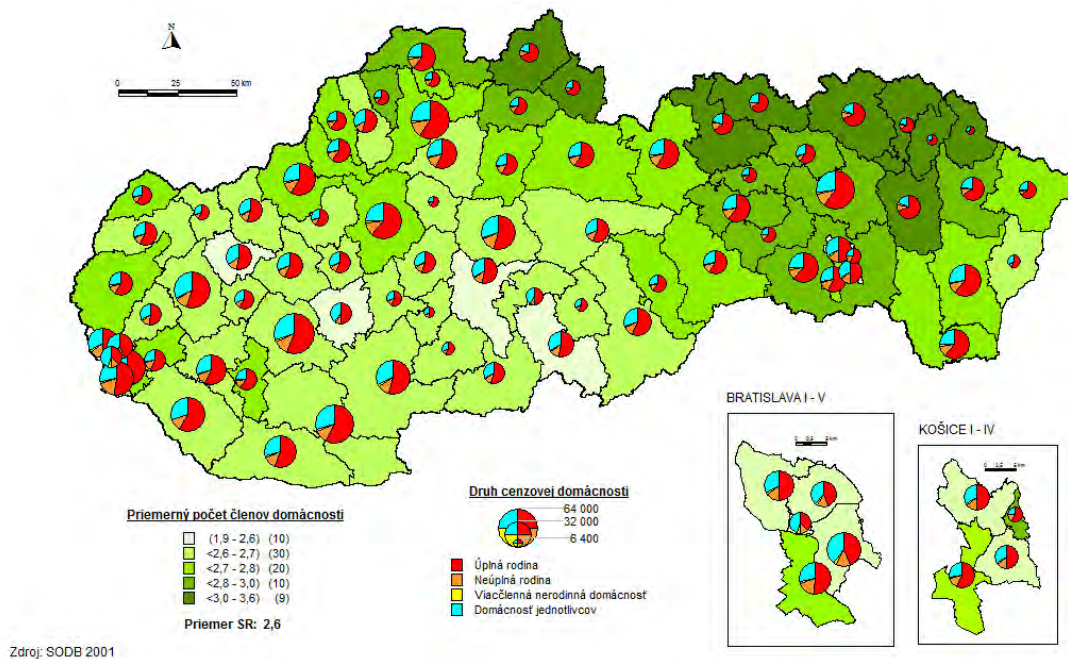
Predpokladá sa, že v súčasnosti približne každý tretí človek býva sám, alebo je vedený ako samostatná domácnosť s vlastným hospodárením.

Úplné rodiny, najmä tie s vyšším počtom detí, prevažujú v severných a severovýchodných okresoch Slovenska, kde je ešte aj v súčasnosti prítomný pomerne silný vplyv tradícií a katolicizmu. Protipólom v priestorovom zastúpení jednotlivých rodín je rozvinutejší juh a juhozápad Slovenska, kde je podiel neúplných rodín, ale najmä single domácností vyšší než vo zvyšných okresoch republiky. Rozvinutejší západ a takisto mestské štruktúry Bratislavy a Košíc poskytujú väčšieho množstva príležitostí, vyššiu anonymitu no ovplyvňuje to i vyššie zastúpenie ateistov.

Tab. 1 Cenzové domácnosti podľa druhu v SR v rokoch 1980 a 2001

	1980		2001	
	počet	podiel (v %)	počet	podiel (v %)
Rodina úplná	1 171 967	70,6	1 168 023	56,4
Bez závislých detí	535 644	32,3	524 020	25,3
So závislými deťmi	636 332	38,3	644 103	31,1
Rodina neúplná	136 360	8,2	246 358	11,9
Bez závislých detí	76 500	4,6	108 029	5,2
So závislými deťmi	59 860	3,6	138 329	6,7
Viacčlenná nerodinná domácnosť	23 953	1,4	35 339	1,7
Domácnosť jednotlivcov	328 188	19,8	622 023	30,0
Úhrn cenzových domácností	1 660 477	100	2 071 743	100
Priemerný počet členov v cenzovej domácnosti	3,01		2,66	

Zdroj: SĽDB 1980, SODB 2001



Obr. 1 Cenzové domácnosti podľa druhu v roku 2001.
Zdroj: SODB 2001

Záver

Obdobie druhého demografického prechodu, ktoré po páde komunistického režimu nastúpilo i v krajinách východného bloku, so sebou prinieslo mnoho zmien nielen politických a kultúrnych, ale takisto aj hodnotové orientácie ľudí sa zmenili a začali preberať vzory zo západu. Silnejúci individualizmu, väčšie možnosti seberealizácie, či sekularizácia spoločnosti sa odrazili v demografickom správaní jednotlivých populácií. Rodinné správanie a s ním súvisiace demografické procesy sa začali postupne meniť. Oslabuje sa význam rodiny ako inštitúcie, čo možno dokázať i klesajúcou sobášnosťou a rastúcou rozvodovosťou. Rovnako aj počet detí v rodinách klesá. Klasický dvojdetný model rodiny je nahradzovaný jednodetným, no vzrastá aj výskyt dobrovoľne bezdetných manželských párov. Objavuje sa nový fenomén kohabitácií, ktoré si slobodný pár alebo rozvedení, či ovdovení partneri volia ako alternatívu manželstva. Dôsledkom všetkých týchto zmien sa mení aj zloženie domácností na Slovensku. V severných a severovýchodných okresoch sú domácnosti zväčša početnejšie, s vyšším počtom detí v rodinách. Výskyt neúplných, jednorodičovských rodín je tu zriedkavejší. Naopak, v južných a juhovýchodných okresoch, a takisto aj v dvoch najväčších slovenských mestách – v Bratislave a Košiciach- sa pomerne často objavujú domácnosti s neúplnými rodinami a tzv. jednočlenné domácnosti, ktoré zaznamenali za posledné desaťročia najdynamickejší vzrast počtu i podielu.

V súčasnosti je teda nastolená otázka, či uvedené premeny demografického správania povedú k postupnému zániku rodiny. Štatistiky nám potvrdzujú, že formy rodiny a partnerských zväzkov sa dnes značne pluralizujú. Postupom času sa vytráca obraz rodiny tvorený oboma rodičmi s viacerými deťmi, ktorý na Slovensku dominoval počas dlhého obdobia. Otázku budúceho vývoja nám možno čiastočne načrtnú aj podrobnejšie výsledky z posledného sčítania obyvateľstva z roku 2011.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Marenčáková J. (2006) Geografický časopis, 58, p.197
- [2] Štatistický úrad Slovenskej republiky [2011]
< <http://portal.statistics.sk/showdoc.do?docid=6674> >
- [3] Tydlitátová G. (2011) Sociológia, 43, p.28
- [4] Mládek J., Širočková J. (2004) Geografické informácie, 8, p.17
- [5] Inštitút informatiky a štatistiky [2001]
< <http://sodb.infostat.sk/scitanie/sk/2001/format.htm> >
- [6] Sčítanie ľudu domov a bytov 1980, Bratislava, Slovenský štatistický úrad

Lokalizácia a klasifikácia singulárnych bodov štruktúrnych polí georeliéfu

Barbora Funková

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra kartografie, geoinformatiky a DPZ, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, SR; barbora.funkova@centrum.sk

Abstrakt

The presented work deals with the localization and classification singular points of structural fields of surface (height, $|\text{grad } z|$, slope and aspect). Based on the partial derivatives themselves are expressed in the structural field conditions to determine the singular points. In addition to singular points mutual relationships between individual structural fields are defined. Also the relationship between individual structural fields and their singularities in respect to altitude field. Given findings are visualized on test field using Surfer software.

Kľúčové slová: *singulárne body; parciálne derivácie; štruktúrne polia; testovacia plocha*

Úvod a formulácia cieľa

Georeliéf predstavuje vo svojej podstate dynamický subsystém geografickej sféry, ktorý je výsledkom exogénnych a endogénnych procesov, ako aj priestorových aktivít človeka. Tieto procesy naň vplyvajú a spätne tieto procesy svojimi parametrami priestorovo ovplyvňuje. Preto je z hľadiska erózo-denudačných procesov potrebné poznať jeho geometrickú štruktúru a tým z hľadiska sociosféry predvídať aj potenciálne hrozby [1]. Za týmto účelom považujeme za potrebné zaoberať sa štruktúrnymi poliami pôvodného výškového poľa a ich singulárnymi bodmi uvažovanými v skalárnej báze v tiažovom poli Zeme.

Cieľ predloženého príspevku sa skladá z dvoch na seba nadväzujúcich častí. Prvá, teoretická časť sa zameriava na vyjadrenie podmienok pre lokalizáciu a klasifikáciu singularít štruktúrnych polí georeliéfu. Tie sú v nadväznosti na práce [1, 2] vyjadrené pomocou parciálnych derivácií 1 – 3 rádu.

Druhá, praktická časť je zameraná na overenie platnosti definovaných podmienok z teoretickej časti. Na účely overenia definovaných vzťahov na lokalizáciu a klasifikáciu singulárnych bodov slúži testovacia plocha – etalón.

Materiál a metódy

Nižšie uvedené matematické vzťahy boli odvodené na základe parciálnych derivácií ako vstupných premenných.

Pre účely overenia odvodených pravidiel na lokalizáciu a klasifikáciu boli použité programy Excel – výpočet parametrov a Surfer – vizualizácia vypočítaných parametrov.

V prvom kroku bola pre testovaciu plochu vypočítaná nadmorská výška. Testovacia plocha bola definovaná exponenciálnou funkciou, ktorá mala tvar [I.]. Súradnice x, y sa menili po kroku 0,1 a pohybovali sa v intervale $\langle -10; -3 \rangle$ pre x -ovú os a v intervale $\langle 0; 10 \rangle$ pre os y v smere y .

$$z = \sum_{i=1}^{n=6} K_i (M_i x + N_i y + P_i)^{r_i} e^{(A_i x^2 + B_i y^2 + C_i xy + D_i x + E_i y + F_i)} \quad [I.]$$

Poznámka 1.: Koefficienty funkcie [I.] boli v mierke 1: 1 zvolené tak, že $K_1 = 1$; $M_1 = 0$; $N_1 = 0$; $P_1 = 5,0$; $r_1 = 1$; $A_1 = -0,16$; $B_1 = -0,0144$; $C_1 = 0$; $D_1 = 0$; $E_1 = -0,2592$; $F_1 = -1,1664$; $K_2 = 1$; $M_2 = 0$; $N_2 = 0$; $P_2 = 0$; $r_2 = 1$; $A_2 = -0,118481$; $B_2 = -0,066518$; $C_2 = 0,03$; $D_2 = 1,541769$; $E_2 = -0,712153$; $F_2 = -1,1664$; $K_3 = 1$; $M_3 = 0$; $N_3 = 0$; $P_3 = 3,8$; $r_3 = 1$; $A_3 = -0,1413$; $B_3 = -0,0431$; $C_3 = -0,0357$; $D_3 = -1,6609$; $E_3 = -0,4553$; $F_3 = -5,2504$; $K_4 = 1$; $M_4 = 0$; $N_4 = 0$; $P_4 = 4,5$; $r_4 = 1$; $A_4 = -0,1764$; $B_4 = -0,0484$; $C_4 = 0$; $D_4 = 2,8224$; $E_4 = 0,6292$; $F_4 = -13,335$; $K_5 = 1$; $M_5 = 0$; $N_5 = 0$; $P_5 = 6$; $r_5 = 1$; $A_5 = -0,1681$; $B_5 = -0,0784$; $C_5 = 0$; $D_5 = -2,3534$; $E_5 = 1,176$; $F_5 = -12,647$; $K_6 = 0,0197$; $M_6 = 0,866$; $N_6 = 0,5$; $P_6 = 0,438$; $r_6 = 4$; $A_6 = -0,0975$; $B_6 = -0,0475$; $C_6 = -0,0866$; $D_6 = 0,2392$; $E_6 = -0,6288$; $F_6 = -4,9242$. **Koniec poznámky 1**

Dosadením koeficientov a súradníc v požadovanom rozsahu do funkcie [I.] sme získali hodnoty nadmorskej výšky, ktoré sú zobrazené na obr. 1.

V ďalšom kroku sme určili parciálne derivácie 1 – 3 rádu pre testovaciu plochu a vyjadrili sme 1 – 2 derivácie štruktúrnych polí – gradienta výšok, sklonu a orientácie. Pre všetky derivácie a aj pre samotné morfometrické parametre sme v Excely vypočítali teoreticky presné hodnoty v rovnakom rozsahu ako pre nadmorskú výšku. Získané hodnoty uvedených parametrov sme vizualizovali v programe Surfer.

Výsledky a diskusia

Výskyt singulárnych bodov výškového poľa georeliéfu sme určili na základe prieniku nulových izočiar izočiarových polí prvých parciálnych derivácií:

$$z_x(x,y) = 0 \quad [II.]$$

$$z_y(x,y) = 0 \quad [III.]$$

Charakter týchto bodov sme potom určili pomocou diskriminantu D a druhej parciálnej derivácie nasledovne:

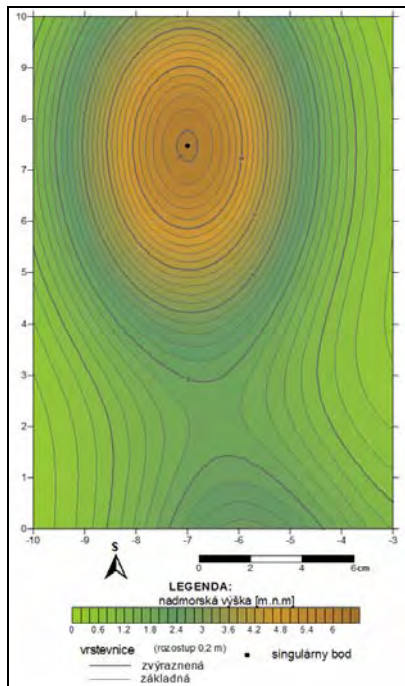
- pre vrcholové body platí, že: $D = z_{xx}z_{yy} - z_{xy}^2 > 0$ a zároveň $z_{xx} < 0$,
- pre depresné body platí, že: $D = z_{xx}z_{yy} - z_{xy}^2 > 0$ a zároveň $z_{xx} > 0$,
- pre sedlové (dvojné) body platí, že: $D = z_{xx}z_{yy} - z_{xy}^2 < 0$; vo výraze $(z_{xx})_z \cos^2 \alpha + 2(z_{xy})_z \cos \alpha \sin \alpha + (z_{yy})_z \sin^2 \alpha$ sa budú pre rôzne hodnoty α meniť znamienka, pričom pre dve hodnoty α_1 a α_2 bude výraz rovný nule. Daný výraz môžeme upraviť na tvar: $z_{xx} + 2z_{xy} \tan \alpha + z_{yy} \tan^2 \alpha = 0$ a z neho následne vyjadriť α_1 a α_2 :

$$\tan \alpha_{z_1, z_2} = \frac{-z_{xy} \pm \sqrt{z_{xy}^2 - z_{xx}z_{yy}}}{z_{yy}}$$

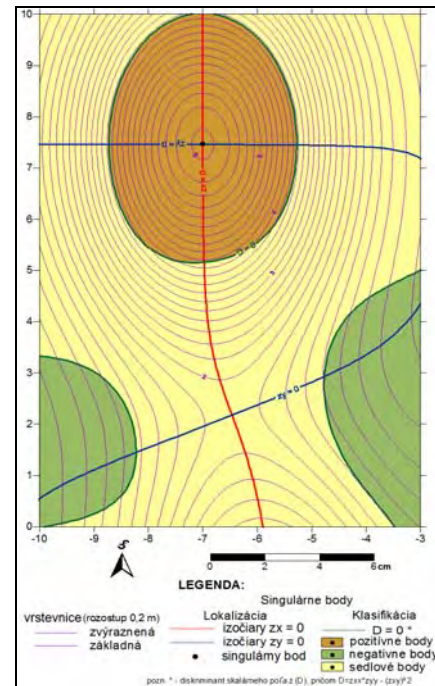
[IV.]

ktoré sú smernicami asymptot, a sú dotyčnicami k vrstevniciam, ktoré sa pretínajú v tomto bode.

Lokalizácia a klasifikácia singulárnych bodov nadmorskej výšky je uvedená na obr. 2.



Obr. 1 Nadmorská výška



Obr. 2 Lokalizácia a klasifikácia singulárnych bodov nadmorskej výšky

Pre štruktúrne polia $|\text{grad } z|$, γ_N a A_N platí, že výskyt singulárnych bodov je určený prienikom prvých parciálnych derivácií rovníc pre výpočet daného parametra. Prvé parciálne derivácie uvedených parametrov majú nasledovný tvar:

- gradient výšok – $|\text{grad } z|$

$$(z_x)_{|\text{grad } z|} \equiv \frac{\delta |\text{grad } z|}{\delta x} = \frac{z_x z_{xx} + z_y z_{yx}}{\sqrt{z_x^2 + z_y^2}} \quad [\text{V.}]$$

$$(z_y)_{|\text{grad } z|} \equiv \frac{\delta |\text{grad } z|}{\delta y} = \frac{z_x z_{xy} + z_y z_{yy}}{\sqrt{z_x^2 + z_y^2}} \quad [\text{VI.}]$$

- sklon georeliéfu v smere spádových kriviek – γ_N

$$(z_x)_{\gamma_N} \equiv \frac{\delta \gamma_N}{\delta x} = \frac{z_x z_{xx} + z_y z_{yx}}{(1 + z_x^2 + z_y^2) \sqrt{z_x^2 + z_y^2}} \quad [\text{VII.}]$$

$$(z_y)_{\gamma_N} = \frac{\partial \gamma_N}{\partial y} = \frac{z_x z_{xy} + z_y z_{yy}}{(1 - z_x^2 - z_y^2) \sqrt{z_x^2 + z_y^2}} \quad [\text{VIII.}]$$

- orientácia georeliéfu voči svetovým stranám – A_N

$$(z_x)_{A_N} = \frac{\partial A_N}{\partial x} = \frac{z_x z_{yx} + z_y z_{xx}}{z_x^2 + z_y^2} \quad [\text{IX.}]$$

$$(z_y)_{A_N} = \frac{\partial A_N}{\partial y} = \frac{z_x z_{yy} + z_y z_{xy}}{z_x^2 + z_y^2} \quad [\text{X.}]$$

Pre takto lokalizované body potom platí, že časť z nich má totožné priestorové rozloženie ako singulárne body pôvodného výškového poľa, avšak ich vlastnosti sú odlišné. Ďalšiu skupinu singulárnych bodov tvoria tie singulárne body, ktoré nie sú totožne s bodmi pôvodného výškového poľa a ležia na nulovej izočiare normálovej krivosti $\omega = 0$ [XI.] v prípade parametrov $|\text{grad } z|$ a γ_N , alebo na nulovej izočiare normálovej krivosti $(K_N)_t = 0$, resp. nulovej horizontálnej krivosti $K_r = 0$ [XII.] v prípade parametra A_N .

$$z_{xx} z_x^2 + 2z_{xy} z_x z_y + z_{yy} z_y^2 = 0 \quad [\text{XI.}]$$

$$z_{xx} z_y^2 + 2z_{xy} z_x z_y + z_{yy} z_x^2 = 0 \quad [\text{XII.}]$$

Okrem týchto dvoch skupín singulárnych bodov majú izočiarové polia $|\text{grad } z|$, γ_N a A_N v skalárnej báze (x, y) ešte iné – vlastné singulárne body so špecifickými vlastnosťami. V týchto bodoch a ich okolí sa prejavujú extrémne zmeny pôvodného výškového poľa. Veľkosti týchto zmien pozorujeme vo veľkosti extrému daného poľa [3].

Klasifikácia singulárnych bodov na vrcholové, sedlové a depresné je teda podmienená znalosťou druhých parciálnych derivácií daného poľa, ktoré vystupujú v diskriminante D , pre ktorý platí:

- pre vrcholové body platí, že: $D = (z_{xx})_z (z_{yy})_z - [(z_{xy})_z]^2 > 0$ a zároveň $(z_{xx})_z < 0$,
- pre depresné body platí, že: $D = (z_{xx})_z (z_{yy})_z - [(z_{xy})_z]^2 > 0$ a zároveň $(z_{xx})_z > 0$,
- pre sedlové (dvojné) body platí, že: $D = (z_{xx})_z (z_{yy})_z - [(z_{xy})_z]^2 < 0$; vo výraze $(z_{xx})_z \cos^2 \alpha + 2(z_{xy})_z \cos \alpha \sin \alpha + (z_{yy})_z \sin^2 \alpha$ sa budú pre rôzne hodnoty α meniť znamienka, pričom pre dve hodnoty α_1 a α_2 bude výraz rovný nule.

V uvedených vzťahoch index z označuje štruktúrne pole – $|\text{grad } z|$, γ_N alebo A_N .

Tvar druhých parciálnych derivácií jednotlivých štruktúrnych polí bude nasledovný:

- gradient výšok – $|\text{grad } z|$

$$(z_{xx})_{|\text{grad } z|} = \frac{\delta^2 |\text{grad } z|}{\delta x^2} = \frac{MK - A^2}{M \sqrt{M}} \quad [\text{XIII.}]$$

$$(z_{xy})_{grad z} = \frac{\partial^2 |grad z|}{\partial x \partial y} = \frac{ML - AB}{M \sqrt{M}} \quad [XIV.]$$

$$(z_{yy})_{grad z} = \frac{\partial^2 |grad z|}{\partial y^2} = \frac{MK - B^2}{M \sqrt{M}} \quad [XV.]$$

- sklon georeliéfu v smere spádových kriviek – γ_N

$$(z_{xx})_{\gamma_N} = \frac{\partial^2 \gamma_N}{\partial x^2} = \frac{KRM - A^2(2M+R)}{R^2 M \sqrt{M}} \quad [XVI.]$$

$$(z_{xy})_{\gamma_N} = \frac{\partial^2 \gamma_N}{\partial x \partial y} = \frac{LRM - AB(2M+R)}{R^2 M \sqrt{M}} \quad [XVII.]$$

$$(z_{yy})_{\gamma_N} = \frac{\partial^2 \gamma_N}{\partial y^2} = \frac{QRM - 2B^2 M(2M+R)}{R^2 M \sqrt{M}} \quad [XVIII.]$$

- orientácia georeliéfu voči svetovým stranám – A_N

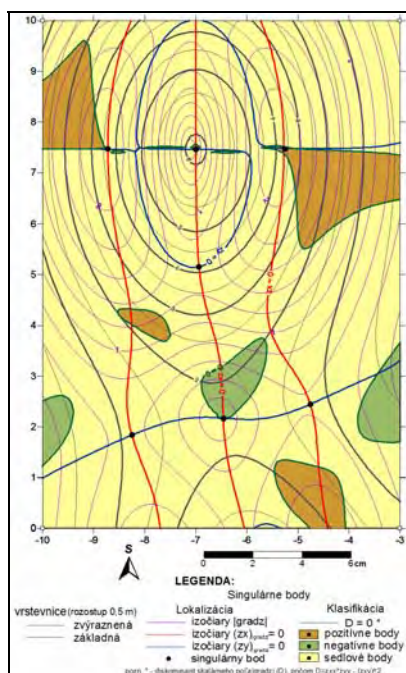
$$(z_{xx})_{A_N} = \frac{\partial^2 A_N}{\partial x^2} = \frac{OM - 2AC}{M^2} \quad [XIX.]$$

$$(z_{xy})_{A_N} = \frac{\partial^2 A_N}{\partial x \partial y} = \frac{PM - 2BC}{M^2} \quad [XX.]$$

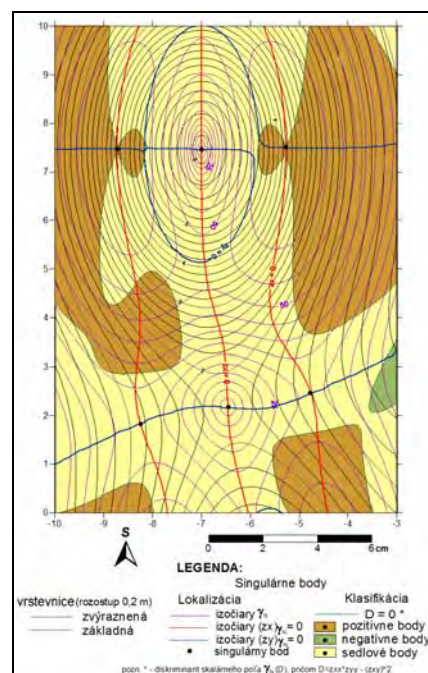
$$(z_{yy})_{A_N} = \frac{\partial^2 A_N}{\partial y^2} = \frac{QRM - 2B^2 M(2M+R)}{R^2 M \sqrt{M}} \quad [XXI.]$$

Poznámka 2.: Koeficienty uvedené vo funkciách [XIII.] až [XXI.] nadobúdajú tvar: $A = z_x z_{xx} + z_y z_{xy}$; $B = z_x z_{xy} + z_y z_{yy}$; $M = z_x^2 + z_y^2$; $K = z_{xx}^2 + z_x z_{xxx} + z_{xy}^2 + z_y z_{xyx}$; $L = z_{xy} z_{xx} + z_x z_{xxy} + z_{yy} z_{xy} + z_y z_{xyy}$; $Q = z_{xy}^2 + z_x z_{xyy} + z_{yy}^2 + z_y z_{yyy}$; $C = z_x z_{yx} - z_y z_{xx}$; $D = z_x z_{yy} - z_y z_{xy}$; $O = z_x z_{yxx} - z_y z_{xxx}$; $P = z_{xy}^2 + z_x z_{yxy} - z_{yy} z_{xx} - z_y z_{xyx}$; $S = z_{xx} z_{yy} + z_x z_{yxx} - z_{xy}^2 - z_y z_{xyx}$; $W = z_x z_{yyy} - z_y z_{xyy}$; $R = 1 + z_x^2 + z_y^2$. **Koniec poznámky 2.**

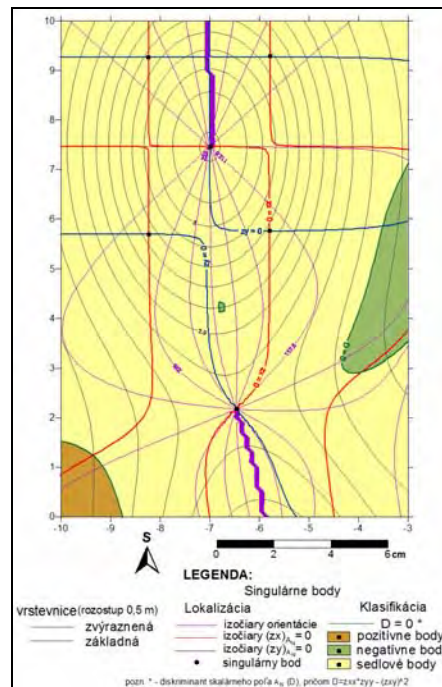
Lokalizácia a klasifikácia singulárnych bodov poľa $|grad z|$ je zobrazený na obr. 3, poľa γ_N na obr. 4 a A_N na obr. 5.



Obr. 3 Lokalizácia a klasifikácia singulárnych bodov gradientu výšok



Obr. 4 Lokalizácia a klasifikácia singulárnych bodov sklonu georeliéfu



Obr. 5 Lokalizácia a klasifikácia singularných bodov orientácie georeliéfu

Záver

Znalosť vlastností štruktúrnych polí ako aj určenie ich singularít je dôležité z hľadiska predpovedania možných hrozieb (zosuvy pôdy, pád lavín a i.), ale aj z hľadiska využitia zeme (poľnohospodárstvo, obnoviteľné zdroje energie – slnečné kolektory). Preto je predmetom nášho ďalšieho štúdia lokalizácia a klasifikácia singularných bodov štruktúrnych polí tretieho rádu – normálovej krivosti v smere spádnic a v smere dotýčnic k vrstevniciam a horizontálnej krivosti v smere vrstevníc.

PodĎakovanie

Na tomto mieste by som chcela poďakovať prof. RNDr. Jozefovi Krchovi DrSc. za vedenie a odbornú pomoc.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Krcho J. (1990) Morfometrická analýza a digitálne modely georeliéfu. VEDA, Bratislava, p. 15
- [2] Krcho J. (2001) Modeling of georelief and its geometrical structure using DTM: Positional and numerical accuracy. Knižtlačiareň Svornosť a.s., Bratislava, p. 15
- [3] Krcho J. Singularné body štruktúrnych polí georeliéfu a ich význam z hľadiska morfometrickej analýzy georeliéfu; ich výpočet a klasifikácia pomocou KDMR. rukopis

Geografická analýza Kaliningradskej oblasti a súčasný stav

Jozef Garaj

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra regionálnej geografie, ochrany a plánovania krajiny, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; garaj@fns.uniba.sk

Abstract

Kaliningrad Oblast of the Russian Federation derives its origin in the former German region of Easter Prussia ceded to the Soviet Union in 1945 by the agreement of the Allies at the Potsdam Conference. Physical geography characteristics provide a brief insight on a landscape. Economy, industry, political and social consequence of transformation from a central planned economy to the market-oriented one along with dissolution of the Soviet Union in 1991 resulting in isolation from the Russian motherland are summarized in a human geography section. Kaliningrad Oblast being surrounded by a different political and economic entity (NATO and the European Union) sustains its strategic significance, although otherwise indifferent to interests of the central government.

KLúčové slová: *Kaliningrad; oblast; Rusko; Európska únia; NATO*

Úvod a formulácia cieľa

Poloha Kaliningradskej oblasti je špecifická nielen voči svojej krajine, ale aj k svojmu okoliu. Enkláva obklopená krajinami Európskej únie a Baltským morom vďačí za svoju existenciu značným územným zmenám po 2. svetovej vojne. Severná časť bývalého Východného Pruska bola začlenená do ZSSR a odsunuté nemecké obyvateľstvo bolo nahradené prevažne ruskojazyčnou populáciou. Rozpad Sovietskeho zväzu a následne politické a ekonomické zmeny odhalili neštandardné vlastnosti tohto územia. Vstup susedných krajín Poľska a Litvy do EÚ a NATO postavilo Kaliningradskú oblasť do novej pozície. Napriek tomu, že sa od Slovenska nenachádza až tak ďaleko, zostáva neznámou nielen pre zvyšok Európy, ale aj pre občanov Ruska, ktorého je súčasťou. Cieľom príspevku je stručne opísať polohu a súčasný stav tejto oblasti, ktorá je podľa rozlohy len nepatrnou časťou Ruskej federácie, no so značným geopolitickým významom.

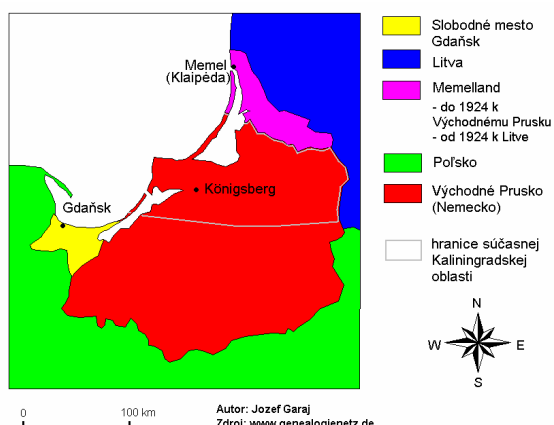
Metódy

Téma príspevku zasahuje do širokého spektra vedomostí, čo zvyšuje nároky na výber vhodnej literatúry. Vzhľadom na charakter príspevku je nevyhnutný multidisciplinárny prístup. Významnú pomoc hlavne pri získavaní podrobnejších fyzickogeografických charakteristík oblasti, ktoré sú pri ruskom vnímaní priestoru nedostupné, či z hľadiska veľkosti niekedy aj nepodstatné, ponúkol Geografičeskij atlas Kaliningradskoj oblasti.

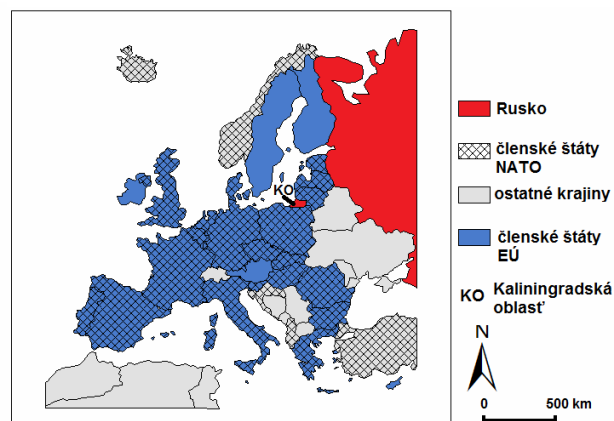
Dostupnosť humánogeografických zdrojov bola obmedzená v zmysle nedostatku uceleného radu dát, no i tie umožnili v dostatočnej miere pochopiť javy prebiehajúce nielen v Kaliningradskej oblasti, ale aj v celej Ruskej federácii. Taktiež na získanie dát a pri uvedomovaní si širších súvislostí boli nápomocní ruskí akademici počas svojho pracovného pobytu na našej fakulte a pracovníci v Ruskom kultúrnom centre v Bratislave.

Výsledky a diskusia

Kaliningradská oblasť vznikla po roku 1945 na základe Postupimskej mierovej dohody na území bývalého Východného Pruska, ktoré po 1. svetovej vojne bolo oddelené od zvyšného nemeckého územia Poľským koridorom. Pomenovaná bola po sovietskom politikovi Michailovi Kalininovi, ktorý však s týmto mestom ani regiónom nemal nič spoločné. Nemecké obyvateľstvo bolo vysídlené a narýchlo dosídlené sovietskym. Vďaka prítomnosti vojsk mala oblasť vojenský polouzavretý charakter a pre cudzincov bola úplne uzavretá, pretože sa stala najzápadnejším bodom územia ZSSR so značným strategickým významom.



Obr. 1 Východné Prusko v rokoch 1923-1939



Obr. 2 Poloha Kaliningradskej oblasti voči EÚ a NATO

Fyzickogeografická charakteristika

Kaliningradská oblasť s rozlohou 15 100 km² sa nachádza na pobreží Baltského mora a celé jej územie je súčasťou Baltskej nížiny. Najvyšší bod dosahuje nadmorskú výšku 231 m n. m., najnižší sa nachádza niekoľko metrov pod hladinou mora. Podložie tvoria horniny z obdobia starohôr a prahôr prekryté sedimentmi druhohôr. Značných hrúbok dosahujú štvrtohorné sedimenty, ktoré sú pozostatkom prítomnosti pevninského ľadovca. Reliéf je slabo členitý s vyvýšenými jazernými plošinami. Označovaný je ako Východoeurópska, niekedy aj Ruská rovina. Na pobreží je výrazný eolický reliéf v podobe dún vytvárajúcich

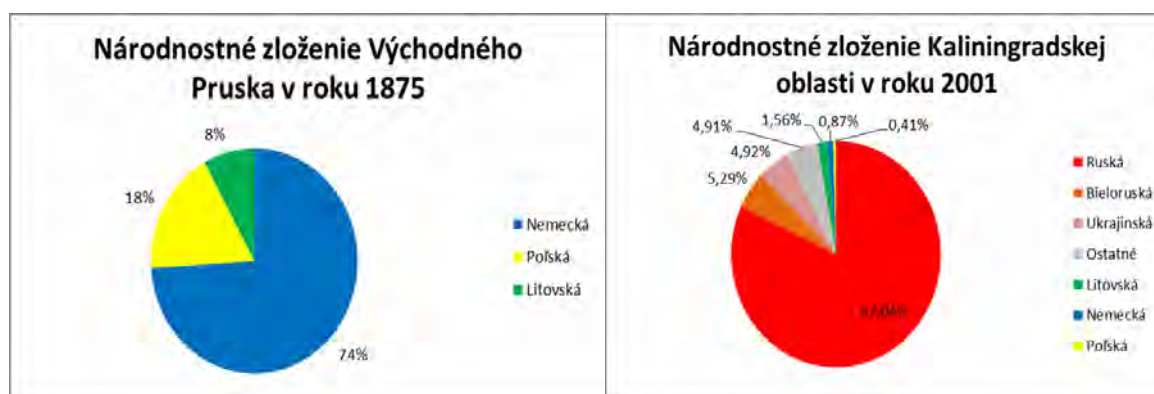
kosy (Kurská a Baltská – Vislanská). Podnebie predstavuje prechod medzi morskou klímou západnej Európy a kontinentálnou klímou východnej Európy. Prejavuje sa miernou zimou, často bez trvalej snehovej pokrývky, teplou a daždivou jeseňou, miernym teplým letom a vysokou vlhkosťou vzduchu počas celého roka. Priemerná ročná teplota vzduchu je 6,5 °C, priemerné januárové teploty sa pohybujú okolo -2 °C, júlové kolo 16-17 °C. Priemerný ročný úhrn zrážok dosahuje 750-800 mm. Najväčšia rieka Neman má prietok 685 m³/s, druhá v poradí je Pregol'a s 83 m³/s. Pri pobreží je množstvo odvodňovacích kanálov a na území oblasti sa nachádza vyše 4000 jazier. Pôdy Kaliningradskej oblasti sú tvorené dvomi hlavnými typmi: mačínovo-podzolové (podzoluvisols) a podzolované hnedé lesné pôdy (luvisols). Rastlinný kryt oblasti sa vzťahuje k lesnej zóne, podzónu zmiešaných listnato-ihličnatých lesov. Zalesnenie oblasti predstavuje len 17 %. Základné lesné druhy tvoria smrek obyčajný (*Picea abies*), borovica lesná – sosna (*Pinus sylvestris*), dub letný (*Quercus robur*), javor poľný (*Acer campestre*) a breza ovisnutá (*Betula pendula*). Živočíšna ríša oblasti spadá do Európsko-sibírskej zoogeografickej podoblasti. Chránené územia sú zastúpené národným parkom Kuršskaja kosa, kde sú chránené piesočné presypy porastené borovicovými lesmi.

Humánnogeografická charakteristika

Po rozpade ZSSR v roku 1991 zostala Kaliningradská oblasť bez priameho spojenia s materskou krajinou. Zmena spoločenského a hospodárskeho zriadenia odhalila neštandardný charakter oblasti. V roku 1995 sa stala slobodnou ekonomickou zónou, ktorá mala prilákať zahraničných investorov a podnikateľov tak rozvoj hospodárstva. Výsledky nenaplnili očakávania aj kvôli vysokej miere korupcie a právnej nekompatibilite so susednými krajinami Poľskom a Litvou, ktoré sa neskôr stali členmi NATO, Európskej únie a v rámci nej členmi Schengenskej dohody. Územie Kaliningradskej oblasti tak zostalo obklopené územím integračného celku s veľmi významnou ekonomickou a politickou silou. Vízový režim pre obyvateľov Ruska izoloval obyvateľov Kaliningradskej oblasti od zvyšného ruského územia, ktoré je bez víz dostupné len letecky alebo loďou cez Petrohrad. Moskva sa ťažko vysporiadava s tým, že pohyb občanov v ich vlastnej krajine závisí od rozhodnutí cudzích krajín. V dôsledku týchto obmedzení atraktivita oblasti poklesla, pričom musí ešte obstať v konkurencii iných regiónov, či už v Európe alebo vo svete. Svoj význam si zachovala strategická poloha.

V roku 2001 mala Kaliningradská oblasť 945 000 obyvateľov, z toho v mestách ich býva takmer 77 %. Najväčšie mesto je Kaliningrad (430 tis. obyv.). V národnostnej skladbe dominujú Rusi (82,4 %), nasledovaní Bielorusmi (5,3 %) a Ukrajincami (4,9 %). Pred 2. svetovou vojnou na území Východného Pruska z troch štvrtín prevažovali Nemci, zvyšok

tvorili Poliaci a Litovci. Nemecké obyvateľstvo bolo vysídlené a dosídlení obyvatelia vytvorili umelú, prevažne ruskojazyčnú štruktúru, ktorá nezodpovedá lokalizácii v širšom priestore, kam patrí. Rozpad ZSSR mal vplyv na životnú úroveň, keď sa stredná dĺžka života skrátila (70,1 v roku 1984 na 64,9 v roku 1999), pričom v minulosti bola nad celoštátnym priemerom, dnes je naopak podpriemernou v rámci Ruska. Na ekonomický rozvoj Kaliningradskej oblasti majú vplyv jej geografická poloha, geopolitická situácia, nezamrzajúci prístav a blízkosť Atlantického oceánu. Medzi hlavné priemyselné odvetvia patria rybolov, celulózový, papierenský a strojársky priemysel. Rozvinutý je aj potravinársky a ľahký priemysel. Dôležitú úlohu pre región zohráva ťažba jantáru. V poľnohospodárstve prevažuje intenzívna živočíšna výroba so zameraním na spracovanie mäsa a mlieka. Cestovný ruch v období Sovietskeho zväzu bol na území oblasti značne obmedzený. Počas existencie Východného Pruska centrom cestovného ruchu bol Königsberg (dnes Kaliningrad) so svojím kráľovským zámkom, univerzitou Albertina, múzeami, katedrálou, záhradami a ďalšími. V zahraničnom cestovnom ruchu prevláda „nostalgická“ a obchodná turistika z Nemecka (60 %) a prihraničný obchodný cestovný ruch z Poľska (30 %). V súčasnosti zariadenia cestovného ruchu nedosahujú medzinárodnú úroveň.



Obr. 3 Národnostné zloženie Vých. Pruska v 1875 **Obr. 4** Nár. zloženie Kaliningradskej obl. v roku 2001

Kontext rozšírenej Európskej únie a súčasný stav

Kaliningradská oblasť sa po roku 2004 stala ostrovom obkoleseným zo všetkých strán úplne odlišnou politickou, ekonomickou a vojenskou entitou. Zmeny prebiehajúce od začiatku 90. rokov mali značný dopad na ekonomiku regiónu. Priemyselná výroba klesla o 70 % a v roku 1999 dosahovala poľnohospodárska výroba len 45 % z hodnoty zo začiatku dekády. To poznačilo kúpyschopnosť obyvateľstva, ktorá klesla o 74 %. Paradoxne prudký prepád priemyslu a poľnohospodárstva viedol k dominancii sektoru služieb, čím sa neplánovane modernizovala ekonomika. Kaliningradská oblasť má najväčšie zásoby jantáru na svete, no

regiónu neprináša nijaké veľké príjmy, pretože jantár sa prevažne vyváža nelegálne. Zlá ekonomická situácia je ešte zhoršená vysokými prepravnými nákladmi medzi enklávou a zvyškom krajiny. Prekážkou rozvoja je aj korupcia v štátnych úradoch, časté finančné podvody, zlý stav cestnej infraštruktúry a nedostatočné dopravné spojenia so susednými krajinami. Zlá sociálna situácia prinútila takmer každého obyvateľa oblasti privyrábať si neoficiálnymi aktivitami ako je drobné pašovanie alkoholu či pohonných hmôt cez hranice. Zavedenie víz tento obchod čiastočne obmedzilo. Európska komisia prijala balík nástrojov s cieľom zjednodušiť tranzit medzi Kaliningradskou oblasťou a zvyšným územím Ruska. Výsledkom je zavedenie zjednodušeného tranzitného dokumentu, ktorý vydávajú konzuláty za nižšie ceny pre ľudí, ktorí potrebujú častejšie cestovať medzi Kaliningradom a ruským územím. Z vojenského hľadiska si oblasť zachovala svoj strategický význam. Existujú podozrenia vychádzajúce zo zistení vojenských tajných služieb, že na území Kaliningradu sú umiestnené jadrové zbrane, čo Moskva vždy popiera. V 60. rokoch 20. storočia boli do oblasti presunuté vojenské jednotky, ktoré bez veľkých technických problémov mohli tieto zbrane priniesť a do súčasnosti ani nemuseli byť nikdy stiahnuté. Rusko nie je viazané žiadnou dohodou, ktorá by zakazovala takéto zbrane umiestniť v Kaliningrade.

Pri pohľade na vzťahy medzi Moskvou a Kaliningradom sa jej najzápadnejšiemu regiónu nevenovala pozornosť a nemal ani jasnú víziu rozvoja. Centrálné úrady využívali Kaliningradskú enklávu proti jej vôli ako politickú zbraň proti Západu. Napríklad v roku 1995 sa vyhrážali umiestnením jadrových zbraní do oblasti kvôli prijatiu deklarácie o začlenení Poľska do NATO. Podobne postupovali v roku 2007, keď Washington oznámil plány na vybudovanie základne rakiet v Poľsku a protiraketovému radaru v Česku. Začiatkom roku 2012 Moskva oznámila svoj zámer umiestniť v oblasti rakety stredného doletu.

Záver

Napriek nárastu záujmu Moskvy o oblasť je nepravdepodobné, že by Kremľ súhlasil s akoukoľvek zmysluplnou autonómiou pre oblasť, pretože by bola v rozpore so zjednocovaním legislatívy na celom území Ruskej federácii a s centralizáciou. Taktiež nechce zblížovanie oblasti s EÚ, pretože Kaliningrad by si zvykol na európske štandardy vrátane politickej kultúry a demokracie odlišnej od tej ruskej a oslabilo by tak väzby na Moskvu. Výsledkom sú teda rastúce rozdiely medzi Kaliningradskou oblasťou a susednými členskými krajinami EÚ.

Zoznam použitej literatúry:

- [1] Cichocki B. (2006) The Kaliningrad Oblast in the context of EU enlargement [Citované: 2. december 2006] <http://pdc.ceu.hu/archive/00002218/01/kalin_oblast.pdf>
- [2] Garaj J. (2008) Kaliningradská oblasť Ruska – geografická analýza. (Diplomová práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p. 110
- [3] Joint Statement on Transit between the Kaliningrad Region and the Rest of the Russian Federation. 10th EU Russia Summit 11/11/02. European Commission [Citované: 30. Januára 2008] <http://ec.europa.eu/external_relations/russia/summit_11_02/js_kalin.htm>
- [4] Král V. (2001) Fyzická geografie Evropy. Nakladatelství Akademie věd České republiky Academia, Praha, ČR, p. 348
- [5] Orlenok V. (2002) Geografičeskij atlas Kaliningradskoj oblasti. Izdatel'stvo KGU, Kaliningrad, Rusko, p. 276
- [6] Rogoża A. et al. (2012) A captive island. Kaliningrad between Moscow and the EU [Citované: 9. októbra 2012] <http://www.osw.waw.pl/sites/default/files/Prace_OSW_Kaliningrad_EN_po_ostatkach_2_0.pdf>
- [7] Švec L. (2001) Dějiny pobaltských zemí. Nakladatelství Lidové noviny, Praha, ČR, p. 424
- [8] Transit from/to Kaliningrad Region. Lithuania in the European Union [Citované: 30. januára 2008] <<http://www.euro.lt/en/lithuanias-membership-in-the-eu/transit-from-to-kaliningrad-region>>
- [9] Vvedenskij B. A. (1953) Bol'shaja sovetskaja enciklopedija. 19 Istorizn – Kandi. 2. vyd. Gosudarstvennoje naučnoje izdatel'stvo, Moskva, Rusko, p. 606
- [10] Wirtschaft und Statistik (1940) Statistisches Reichsamt. Verlag für Sozialpolitik, Wirtschaft und Statistik, Paul Schmidt, Berlin, Nemecko, p. 181

Analýza komponentov pohybu obyvateľstva vo funkčnom mestskom regióne Michalovce

Michal Gazda

*Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta, Ústav geografie,
Jesenná 5, 040 01 Košice, Slovenská republika;
miso.gazda@gmail.com*

Abstrakt

Nowadays, demographic research of regions in Slovak geography mainly focuses on the regions of largest cities in the country. The aim of this paper is therefore to analyse an impact of the basic components of population change in selected functional urban region on the total population change. Analysis of the natural change of population and net migration was focused on the period from 1991 to 2010. Natural movement has decisive impact on overall population growth during that period.

KLúčové slová: *funkčný mestský región; Michalovce; prirodzený pohyb; migračný pohyb*

Úvod a formulácia cieľa

Všeobecným trendom populačného vývoja je v druhej polovici 20. storočia, najmä v krajinách Západnej Európy a Severnej Ameriky, postupná stabilizácia rastu obyvateľstva. Zmeny spoločnosti vyznačujúcej sa novým demografickým správaním sa obyvateľstva boli podmienené zvyšujúcou sa mierou individuálnej slobody, nástupom individualizmu, ale i dostatočnou ekonomickou a sociálnou nezávislosťou vďaka zvyšujúcej sa vzdelanostnej úrovni obyvateľstva označujeme dnes pojmom druhá demografická revolúcia [1].

Trend meniaci dynamiku obyvateľstva ovplyvnil demografický vývoj na území dnešného Slovenska v 80. rokoch 20. storočia, kedy postupujúci pokles mier reprodukcie, plodnosti, prirodzenej reprodukcie obyvateľstva, ako prvého základného komponentu populačného rastu, nedokázali plne kompenzovať ani pronatalitné opatrenia vtedajšieho komunistického vedenia krajiny. Model jednoduchej reprodukcie s nevýrazným prirodzeným prírastkom, resp. úbytkom obyvateľstva, dosiahla populácia Slovenska v 90. rokoch 20. storočia, ako súčasť komplexných zmien spoločnosti.

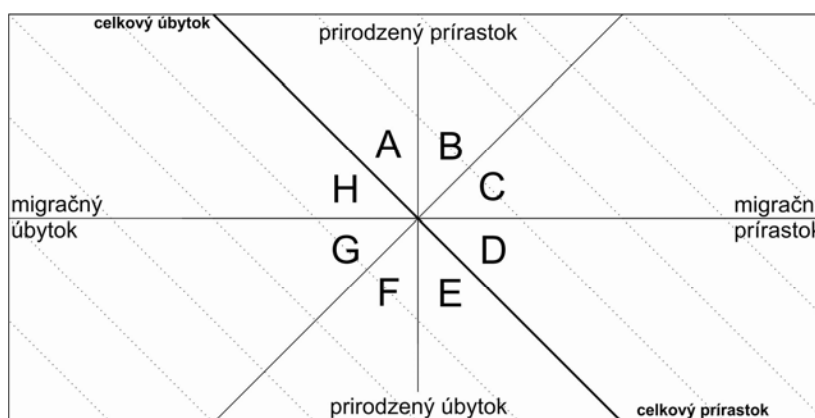
Zároveň možno na Slovensku po roku 2000 pozorovať meniaci sa charakter druhého komponentu rastu obyvateľstva – migračného pohybu. Migračné toky sa pre celkový rast obyvateľstva stávajú významnejšími [2]. Cieľom tejto práce je popísať vplyv jednotlivých komponentov rastu obyvateľstva na celkový pohyb obyvateľstva funkčného mestského regiónu Michalovce na regionálnej, ale i lokálnej úrovni.

Materiál a metódy

Ako základný priestorový rámeček je v práci využitý regionálny systém funkčných mestských regiónov 91-A vytvorený Bezákom [3]. Sústava funkčných mestských regiónov, už vďaka spôsobu delimitácie, sa pre populačné analýzy regiónov javí ako najvhodnejšia. Funkčné mestské regióny sú priestorovo súvislé územia, vzhľadom na dennú migráciu za prácou vnútorne koherentné a navonok uzavreté. Vďaka podobnosti smeru a intenzity denných pracovných migrácií v regiónoch so sociálnymi väzbami obyvateľstva má skúmanie funkčných mestských regiónov význam nielen v oblasti skúmania regionálneho trhu práce.

Každý funkčný mestský región pozostáva z dvoch základných častí – centra a zázemia. Vo funkčnom mestskom regióne Michalovce (ďalej FMR MI), tvorenom 109 obcami, budeme považovať za centrum mesto Michalovce. Zvyšné obce, vrátane dvoch so štatútom mesta (Strážske a Sobrance) tvoria zázemie funkčného mestského regiónu.

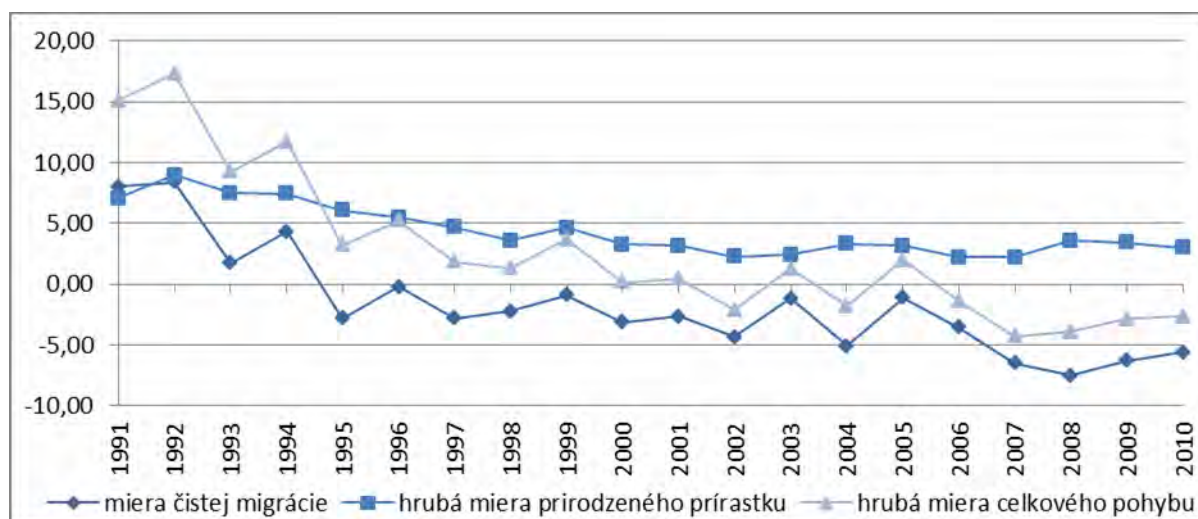
Pre sledovanie intenzity vplyvu migrácie a prirodzeného pohybu obyvateľstva a ich dopadu na celkový pohyb obyvateľstva sú v práci využité miera čistej migrácie, hrubá miera prirodzeného prírastku a hrubá miera celkového prírastku, ktoré sú vyjadrené ako podiel čistej migrácie (resp. prirodzeného prírastku a hrubej miery celkového prírastku) a stredného stavu obyvateľstva v päťročných priemeroch v štyroch obdobiach, a to 1991 – 1995, 1996 – 2000, 2001 – 2005 a 2006 – 2010. Jednotlivé miery sú vyrátavané na úrovni základných častí FMR, centra a zázemia, ale i na úrovni jednotlivých obcí a sú udávané v promile. Pre detailnejší popis váhy migračného a prirodzeného pohybu na lokálnej úrovni bolo v práci využité Webbovo rozdelenie [4], ktoré podľa dynamiky pohybu obyvateľstva v jeho základných komponentoch kategorizuje obce do ôsmich oktantov (obr. 1), kde v oktantoch C, D, H a G má rozhodujúci vplyv na celkový pohyb obyvateľstva migračný pohyb a v oktantoch A, B, E a F prirodzený pohyb obyvateľstva. V práci sú využívané údaje o pohybe obyvateľstva z Bilancie pohybu obyvateľstva SR.



Obr. 1 Model typológie regionálnych jednotiek podľa dynamiky obyvateľstva

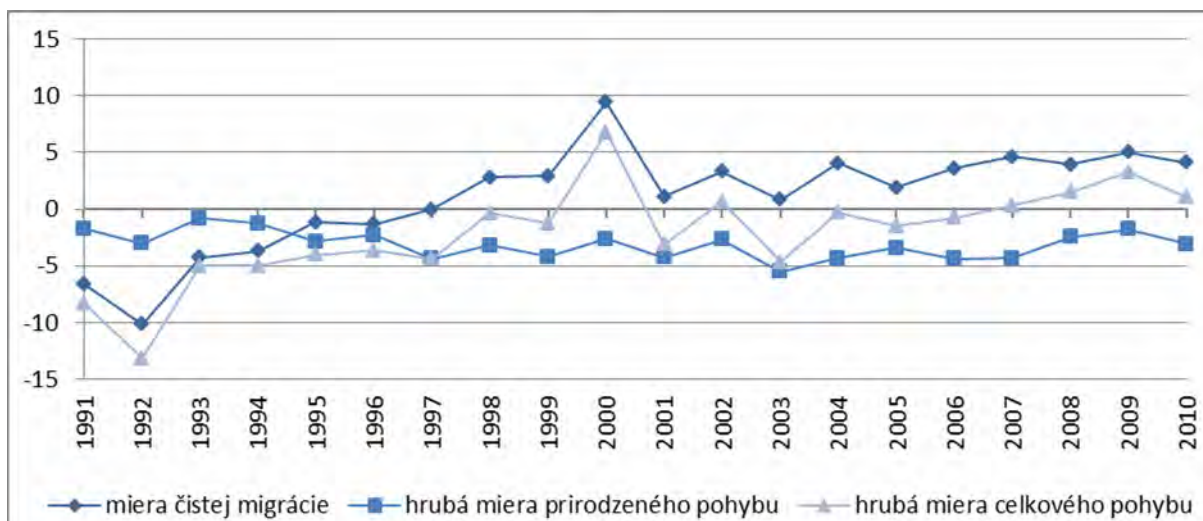
Výsledky a diskusia

Vďaka doznievaniu socialistickej urbanizácie v slovenských mestách je centrum regiónu, mesto Michalovce, v počiatočných rokoch sledovaného obdobia imigračne atraktívne. V roku 1991 a 1992 hodnoty miery čistej migrácie presahujú 8 ‰. Migračne pasívnym sa mesto stáva už po roku 1994, odkedy už migračný prírastok nezaznamenalo. Migračný úbytok mesta sa ešte zväčšuje po roku 2006, kedy migračný úbytok v nasledujúcich štyroch rokoch presahuje hodnotu 5 ‰. Prirodzený prírastok v centre regiónu v prvej dekáde pozvoľne klesá. Prirodzený prírastok sa v centre regiónu postupne znižuje z počiatočnej úrovne viac ako 15 ‰ v prvých dvoch rokoch. Po roku 2000 dochádza k stabilizácii prirodzeného prírastku na úrovni 2 až 4 ‰. Prirodzený prírastok zväčša dokázal vykompenzovať migračný úbytok mesta. Posledné roky sú však vďaka vyššiemu migračnému úbytku charakteristické aj záporným celkovým pohybom obyvateľstva mesta Michalovce (obr. 2).



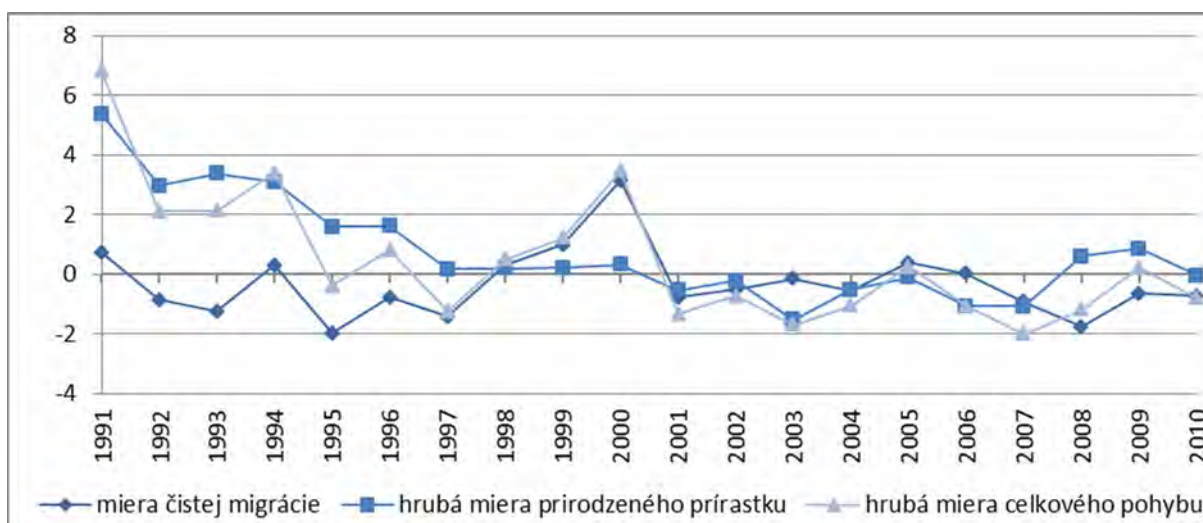
Obr. 2 Vývoj hodnôt mier pohybu obyvateľstva v centre FMR MI v rokoch 1991 až 2010

Populačný vývoj zázemia regiónu je oproti jadrú odlišný. Hodnoty miery čistej migrácie nadobúdajú v počiatočných rokoch sledovaného obdobia záporné hodnoty, čo podobne ako u centra regiónu, môžeme spojiť s doznievaním socialistickej urbanizácie typickej smerovaním migračných tokov do miest, centier regiónov, z ich zázemia. Migračne úbytkový bol región až do roku 1997, odkedy zázemie FMR MI zaznamenáva už iba migračné prírastky. Prirodzený pohyb počas sledovaných dvoch desaťročí nadobúda vždy negatívne hodnoty. Vyššia intenzita prirodzeného úbytku ako migračného prírastku ústi, s výnimkou posledných štyroch rokov sledovaného obdobia, do takmer pre celé obdobie charakteristického celkového úbytku obyvateľstva (obr. 3).



Obr. 3 Vývoj hodnôt mier pohybu obyvateľstva v zázemí FMR MI v rokoch 1991 až 2010

Región, ako celok, zaznamenáva počas sledovaného obdobia postupný prechod od relatívne vysokej miery prirodzeného prírastku obyvateľstva k jej miere oscilujúcej okolo nulových hodnôt v intenzite, či už kladnej alebo zápornej, nižšej ako 1 ‰. Miera čistej migrácie nadobúda v regióne vo väčšine sledovaného obdobia pomerne nízke negatívne hodnoty intenzitou nižšie ako prírastok prirodzený. Celkový prírastok obyvateľstva v regióne tak má tendenciu väčšmi kopírovať vývoj hrubej miery prirodzeného prírastku (obr. 2). Región zaznamenáva najmä v druhej polovici sledovaného obdobia mierne negatívne hodnoty hrubej miery celkového pohybu. Za sledované dvadsaťročné obdobie zaznamenal región mierny negatívny migračný prírastok na úrovni -0,33 ‰, ktorý kompenzoval prirodzený prírastok na úrovni 0,62 ‰. Región tak zaznamenal medzi rokmi 1991 a 2010 celkový prírastok na úrovni 0,29 ‰ (tab. 1).



Obr. 4 Vývoj hodnôt mier pohybu obyvateľstva vo FMR MI v rokoch 1991 až 2010

Tab. 1 Zastúpenie obcí FMR MI v rastových typoch v sledovaných obdobiach

	miera	zázemie	centrum	celok
1991-1995	r_M	-5,16	3,93	-0,62
	r_P	-1,93	7,40	2,74
	r_C	-7,09	11,33	2,12
1996-2000	r_M	2,76	-1,88	0,44
	r_P	-3,32	4,32	0,50
	r_C	-0,56	2,44	0,94
2001-2005	r_M	2,24	-2,90	-0,33
	r_P	-4,03	2,85	-0,59
	r_C	-1,79	-0,05	-0,92
2006-2010	r_M	4,26	-5,90	-0,82
	r_P	-3,19	2,87	-0,16
	r_C	1,07	-3,03	-0,98
1991-2010	r_M	1,03	-1,69	-0,33
	r_P	-3,12	4,36	0,62
	r_C	-2,09	2,67	0,29

vysvetlivky: r_M -hrubá miera čistej migrácie, r_P -hrubá miera prirodzeného prírastku, r_C -hrubá miera celkového prírastku

Pri komparácii komponentov pohybu obyvateľstva na lokálnej úrovni v štyroch päťročných obdobiach (tab. 2) je možné pozorovať určité zmeny. V období rokov 1991 až 1995 je dominantným typom obce v regióne typ G so záporným celkovým pohybom obyvateľstva, kde migračný úbytok presahuje prirodzený úbytok obyvateľstva. Zároveň je v obciach regiónu rozhodujúcim migračný pohyb obyvateľstva. V nasledujúcich dvoch obdobiach (1996 až 2000 a 2001 až 2005) je už vo väčšine obcí dominantný komponent prirodzeného pohybu obyvateľstva. Najviac zastúpený je najprv typ E s prirodzeným úbytkom prevyšujúcim migračný prírastok, neskôr typ F s prirodzeným úbytkom prevyšujúcim úbytok migračný. V poslednej päťici rokov (2005 až 2010), má opäť na celkový pohyb obyvateľstva výraznejší vplyv migračný pohyb, s najčastejším typom D. U týchto obcí migračný prírastok presahuje prirodzený úbytok.

Tab. 2 Zastúpenie obcí FMR MI v rastových typoch v sledovaných obdobiach

	A	B	C	D	E	F	G	H	A+B+E+F	C+D+G+H
1991-1995	6	8*	7	11	14	13	31	19	41*	68
1996-2000	5*	8	10	22	32	18	11	3	63*	46
2001-2005	5	6	12	23	23	25	7	8*	59	50*
2006-2010	5	5	11	33	27	13	8	7*	50	59*

*vrátane centra FMR MI, mesta Michalovce

Záver

Populačný vývoj v sledovanom dvadsaťročnom období znamenal v prípade FMR Michalovce výrazné zmeny v charaktere a intenzite migračného i prirodzeného pohybu obyvateľstva. Zároveň zaznamenávame prechod regiónu od výrazného celkového prírastku ku stagnácii populačného vývoja, ktorá sa prejavuje po roku 2001 nízkymi celkovými

prírastkami alebo úbytkami populácie nepresahujúcimi 1 ‰. Celkovo však zaznamenal región v tomto období mierny populačný prírastok, na ktorom sa pozitívne podieľalo centrum, negatívne zázemie regiónu.

Prirodzený pohyb obyvateľstva zázemia a centra regiónu je značne rozdielny. Zatiaľ čo v centre regiónu je počas všetkých štyroch období zaznamenávaný prirodzený prírastok, v zázemí pozorujeme prirodzený úbytok obyvateľstva. Takýto vývoj v regióne môže byť dôsledkom snáh komunistických vlád z období predchádzajúcich sledovanému dvadsaťročnému obdobiu o zvyšujúci sa podiel mestského obyvateľstva na úkor obyvateľstva vidieckeho a smerovaním najmä mladých rodín do miest, čím mohol byť demografický potenciál zázemia i tohto regiónu značne znížený.

V obciach regiónu má väčší vplyv migračný pohyb v prvom a štvrtom päťročnom období, v druhom a treťom pohyb prirodzený. V prvom období bol v obciach regiónu dominantný migračný úbytok najmä kvôli doznievaniu vplyvu socialistickej urbanizácie na Slovensku. S meniacou sa spoločnosťou, objavením a zintenzívňovaním sa negatívnych spoločenských javov (nezamestnanosť, zvyšujúca sa miera chudoby) klesá v nasledujúcich dvoch obdobiach intenzita migrácie obyvateľstva. Posledné päťročné obdobie je vo väčšine obcí významnejším komponentom rastu obyvateľstva pohyb migračný, resp. migračný prírastok, čo môže naznačovať určitú spätnú polarizáciu migračných tokov naznačujúcich prejavovanie sa procesu suburbanizácie.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Mládek J. (2008) *Acta Geographica Universitatis Comenianae*. 50, p. 63
- [2] Bezák A. (2011) *Acta Geographica Universitatis Comenianae*. 55, p. 149
- [3] Bezák A. (2000) Funkčné mestské regióny na Slovensku. In: *Geographia Slovaca*, 15. Bratislava: VEDA, Vydavateľstvo SAV, p. 89
- [4] Webb J. W. (1963) *Economic Geography*. 39, p. 130

Formovanie suburbánnych zón stredne veľkých miest Nitrianskeho samosprávneho kraja

Mária Gažiová, Gabriela Repaská

Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Fakulta prírodných vied, Katedra geografie a regionálneho rozvoja, Tr. A. Hlinku 1, 949 74 Nitra, Slovenská republika; marria.gaziova@gmail.com

Abstrakt

The suburbanization is one of the current trends that lead to changes in the settlement structure. Migration flows of population have not directed to the city from rural areas, as in the case of urbanization, but changed its direction from the city to the countryside. They contribute to the growth and development of the countryside or the city background. The paper shows the characteristics of suburbanization and its impact on the medium-sized towns of the Nitra Region.

Kľúčové slová: *Nitriansky samosprávny kraj; stredne veľké mestá; suburbanizácia*

Úvod a formulácia cieľa

Suburbánne procesy v Slovenskej republike, podobne ako v ostatných postkomunistických krajinách, boli spustené po období socializmu. Lacnejšie pozemky v čistom prostredí vidieka, túžba vlastniť rodinný dom so záhradou a možnosť mať väčšie súkromie, sa prejavili v odlive obyvateľstva z miest. Nastalo intenzívne sťahovanie obyvateľstva na vidiek a do okrajových zón miest [1].

Cieľom príspevku je na základe vhodného metodického postupu poukázať na priebeh suburbanizácie v stredne veľkých mestách Nitrianskeho samosprávneho kraja, a to v Komárne, Leviciach, Nových Zámkoch, Šali a v Topoľčanoch. Príspevok bude zameraný na hodnotenie vplyvu suburbánneho procesu na uvedené mestá, pričom poukáže aj na formovanie suburbánnych zón jednotlivých miest.

Materiál a metódy

Problematika procesu suburbanizácie je v slovenskej literatúre značne rozpracovaná. Na Slovensku možno prostredníctvom prác geografov prebiehajúci proces potvrdiť v mestách Bratislava [2, 3], Košice [4, 5], Nitra [1, 6] a Prešov [7, 8]. Ide predovšetkým o veľkomestá a veľké mestá Slovenska. V súčasnosti však suburbanizácia neprebieha len v zázemí väčších miest, ale proces sa postupne začína formovať aj v zázemí stredne veľkých a menších miest [9].

Stredne veľké mestá Nitrianskeho samosprávneho kraja (ďalej NSK) majú počet obyvateľov v rozpätí od 20 000 do 49 999. V rámci Nitrianskeho samosprávneho kraja vystupuje päť stredne veľkých miest – Komárno (35 840 obyv.), Levice (35 378obyv.), Nové

Zámky (40 402 obyv.), Šaľa (23 742 obyv.) a Topoľčany (28 541 obyv.). Koncentrujú 163 903 obyvateľov NSK, čo tvorí z celkového počtu obyvateľov kraja (706 002) 23,21 %.

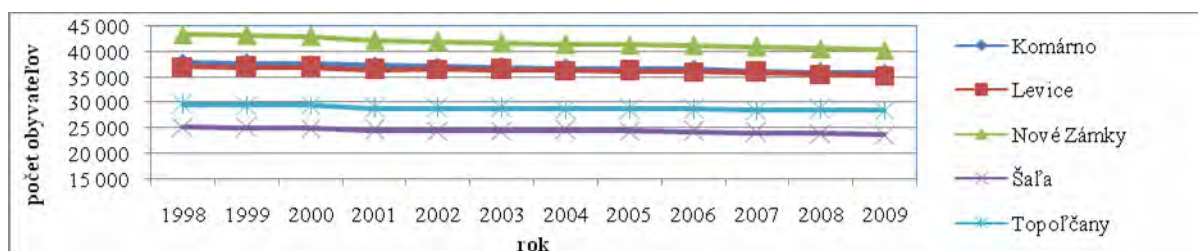
Príspevok bol vypracovaný na základe štatistických databáz sťahovania obyvateľstva z jednotlivých stredne veľkých miest do vidieckych obcí. Nakoľko migrácia obyvateľstva je veľmi dynamickým procesom, ktorý prebieha neustále, pracovali sme s dlhším časovým radom rokov 1998 – 2009. Pre potvrdenie procesu suburbanizácie sme vychádzali z nasledujúcich indikátorov:

1. ***Pokles počtu obyvateľstva v mestách***- je dôležitým indikátorom suburbanizácie, proces však jednoznačne nepotvrďuje. Pokles počtu obyvateľov nemusí byť spôsobený len emigráciou z mesta, môže byť výsledkom aj dezintegračných procesov, prípadne mortality.
2. ***Migračný úbytok obyvateľstva v mestách a migračný prírastok vo vidieckych obciach*** – je predpokladom prebiehajúcej suburbanizácie, nie je však jej dôkazom. Zvýšenie počtu prisťahovaných obyvateľov do obce nemusí byť znakom len suburbanizácie, nakoľko neidentifikuje smer imigrantov. Rovnako, aj kladné migračné saldo nezahŕňa len prisťahovaných z mesta. Preto je dôležité v obci zistiť len prisťahovaných obyvateľov z mesta a vytýčiť obce, v ktorých imigrácia z konkrétneho sledovaného mesta má prevažujúci podiel.
3. ***Podiel prisťahovaných obyvateľov do vidieckej obce z konkrétneho sledovaného stredne veľkého mesta z celkového počtu prisťahovaných danej vidieckej obce*** – je predpokladom suburbanizácie, pretože identifikuje, že sa obyvatelia do obce sťahujú zo sledovaného mesta. Ich podiel však musí prevažovať nad podielom prisťahovaných z iných smerov (z iných miest alebo vidieckych obcí) [10]. Obec bude prislúchať mestu, z ktorého podiel prisťahovaných prevažuje. Medzi suburbánne obce budú patriť tie, v ktorých je podiel prisťahovaných zo sledovaného mesta nad 50 %, pretože je podiel jednoznačne prevažujúci. Vidiecke obce, v ktorých je podiel prisťahovaných zo sledovaného mesta nižší ako 50 %, môžu byť tiež suburbánne, ak je tento podiel zo sledovaného mesta dominantný.

Výsledky a diskusia

Na základe uvedenej metodiky sme vyhodnotili jednotlivé indikátory suburbanizácie. Štartovacím indikátorom suburbanizácie bol dôkaz ***poklesu počtu obyvateľov v stredne veľkých mestách***. Tento pokles bol sledovaný prostredníctvom vývoja počtu obyvateľov. Vývoj počtu obyvateľov má vo všetkých stredne veľkých mestách NSK v období rokov 1998 - 2009 klesajúcu tendenciu, podľa čoho možno usúdiť, že strata obyvateľstva môže súvisieť s emigráciou z miest. V rokoch 1998 – 2009 nastal najväčší pokles obyvateľstva v meste

Nové Zámky. V roku 1998 tu žilo 43 435 obyvateľov. Ich počet sa v roku 2009 znížil na 40 402, čo je pokles o 3 033 obyvateľa (6,98 %).



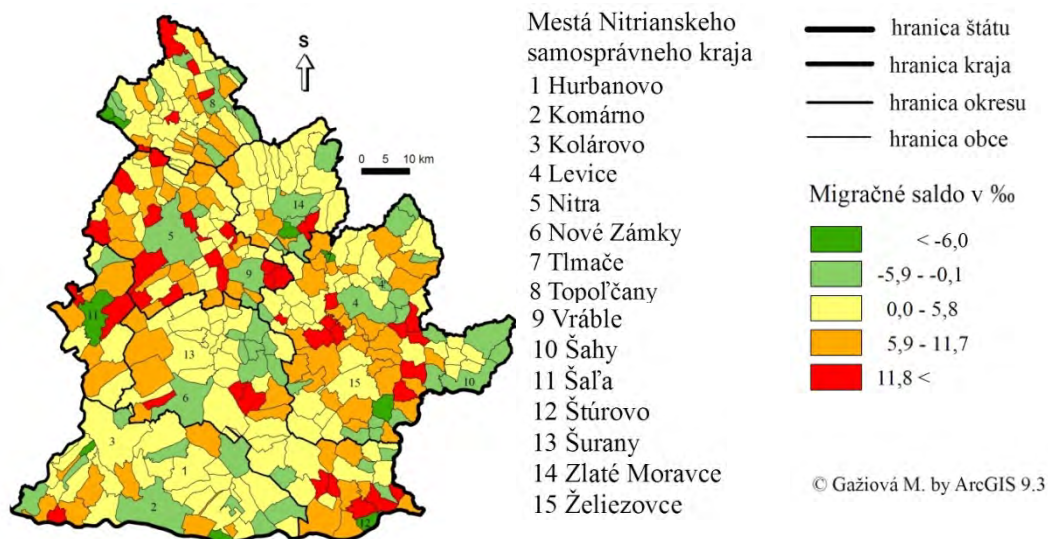
Obr. 1 Vývoj počtu obyvateľov v stredne veľkých mestách NSK v rokoch 1998 – 2009. Zdroj: ŠÚ SR 2011

Pokles počtu obyvateľov v mestách však nemusí byť len v dôsledku suburbanizácie, môže ísť aj o územné zmeny v mestách spôsobené dezintergráciou. Preto sme priebeh suburbanizácie analyzovali aj prostredníctvom migračných procesov, pričom sme pristúpili k charakteristike indikátora *migračného salda*.

Tab. 1 Migračné saldo v stredne veľkých mestách Nitrianskeho samosprávneho kraja v rokoch 1998 – 2009

Stredne veľké mestá		Komárno	Levice	Nové Zámky	Šaľa	Topoľčany
Migračné saldo	abs.	-93	-111	-197	-147	-78
	%	-2,5	-3,1	-4,7	-6,0	-2,7

Zdroj: ŠÚ SR, 2011



Obr. 2 Migračné saldo v obciach NSK v rokoch 1998 – 2009

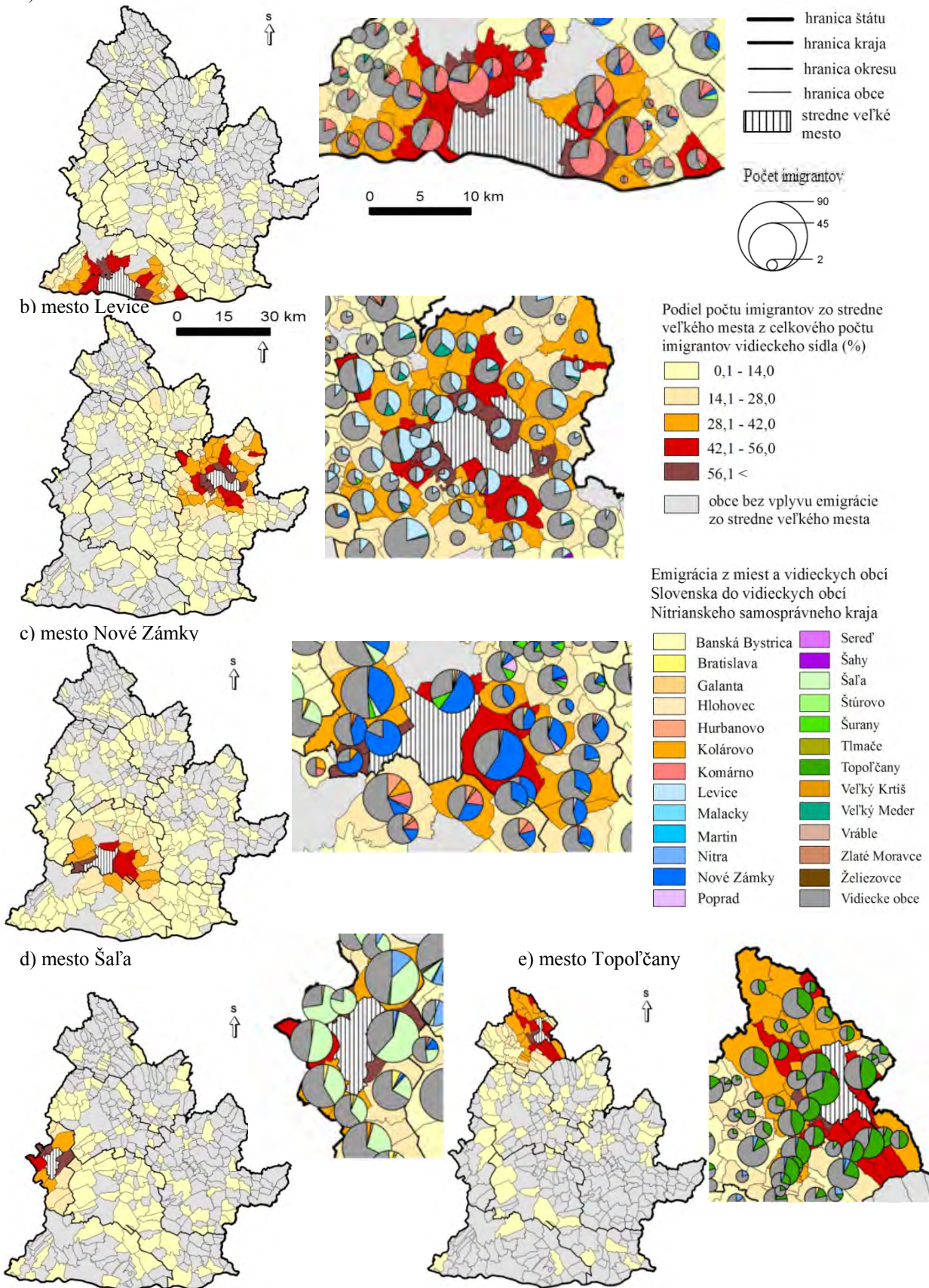
Z tab. 1 možno na prvý pohľad vyčítať, že stredne veľké mestá NSK charakterizuje migračný úbytok obyvateľstva, čo môže byť znakom prebiehajúcej suburbanizácie. Tá sa potvrdzuje vtedy, keď mestá strácajú obyvateľstvo na úkor zisku počtu obyvateľov v okolitých vidieckych obciach. Podľa obr. 2 majú všetky obce v okolí miest Šaľa, Nové Zámky, Komárno migračný prírastok. V okolí miest Topoľčany a Levice sú migračne

prírastkové obce na sever, juh a západ od sledovaného mesta. Z toho usudzujeme, že proces suburbanizácie môže v týchto obciach prebiehať. Nakoľko migračné saldo hodnotí sťahovanie obyvateľstva zo všetkých smerov, pre potvrdenie procesu suburbanizácie je potrebné analyzovať *podiel počtu prisťahovaných zo sledovaného stredne veľkého mesta vo vidieckej obci z celkového počtu prisťahovaných danej vidieckej obce* v rokoch 1998 - 2009.

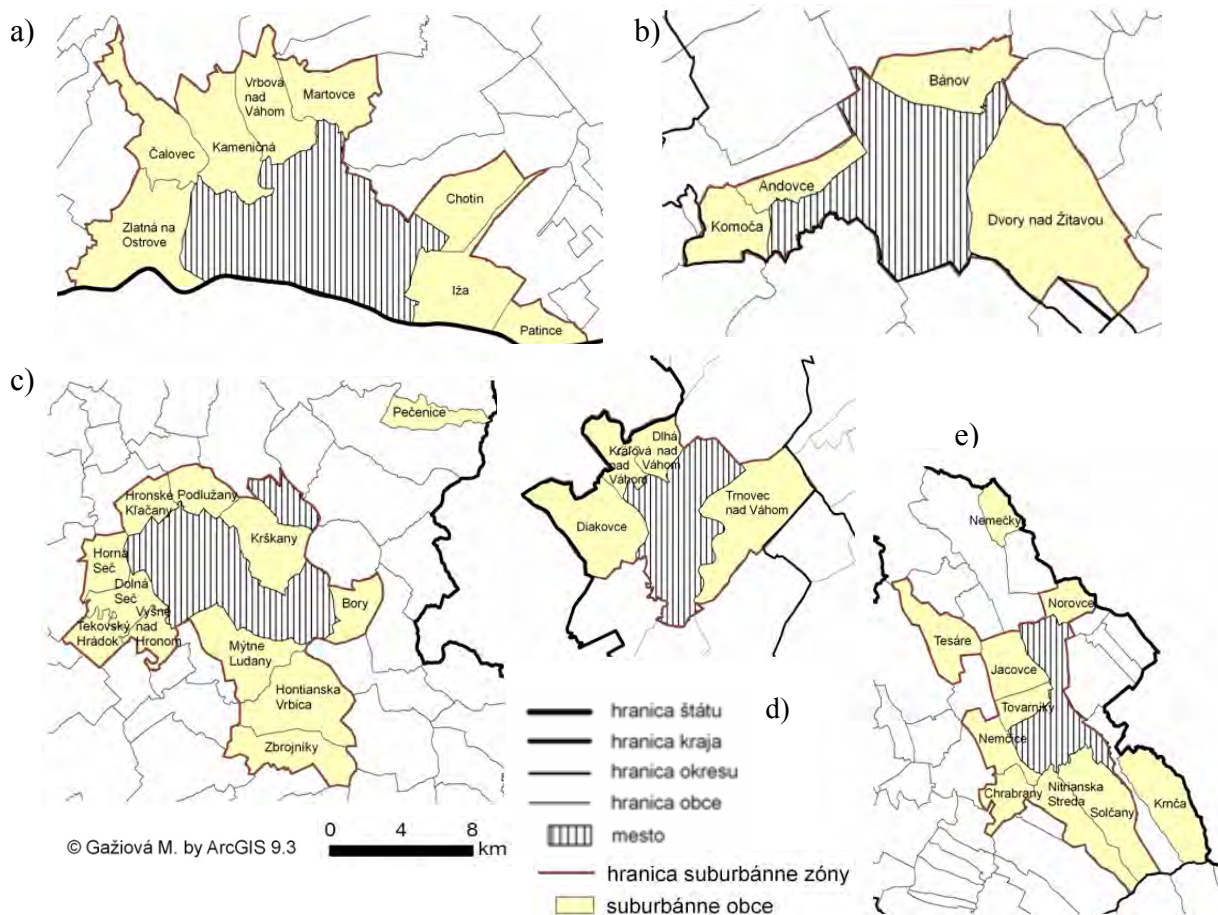
Z mesta **Komárno** sa v období rokov 1998-2009 do vidieckych obcí NSK prisťahovalo v priemere 261 obyvateľov. Najväčší podiel imigrantov z Komárna (69,0 %) zaznamenala obec *Iža*. Viac ako 50 %-ný podiel imigrantov z Komárna mali ešte obce *Kameničná* (64,7 %), *Čalovec* (56,7 %), *Patince* (52,0 %) a *Zlatná na Ostrove* (50,7 %). Všetky tieto obce možno označiť za suburbánne obce Komárna, pretože podiel imigrantov z mesta prevažuje nad podielom imigrantov z iných smerov. Medzi suburbánne obce možno zaradiť aj obce *Chotín* (47,6 %), *Martovce* (46,9 %) a *Vrbová nad Váhom* (46,6 %). I keď podiel imigrantov z Komárna nedosahuje ani 50 %, stále prevažuje nad prisťahovanými z iných vidieckych obcí alebo miest (obr. 3a, 4a).

Podobne boli vytýčené aj suburbánne obce ostatných stredne veľkých miest. Najväčší podiel imigrantov z mesta **Levice** mala obec *Horná Seč*, a to 81,9 %. Medzi suburbánne obce patria ešte obce *Podlužany* (62,8 %), *Vyšné nad Hronom* (60,8 %), *Dolná Seč* (58,4 %), *Krškany* (57,6 %), *Hronské Kľačany* (55,7 %), *Mýtne Ludany* (49,6 %), *Bory* (47,6 %), *Tekovský Hrádok* (47,3 %), a *Zbrojničky* (43,9 %) (obr. 3b, 4c). Najväčšiu imigráciu z **Nových Zámkov** zaznamenala obec *Andovce*. Prisťahovalo sa sem priemerne 31 obyvateľov z mesta, čo tvorí 80,0 % zo všetkých prisťahovaných do obce. Najmenší, aj keď nadpolovičný podiel imigrantov z mesta Nové Zámky mala obec *Bánov* (51,5 %). Medzi ostatné suburbánne obce patria *Komoča* (59,3 %) a *Dvory nad Žitavou* (55,3 %) (obr. 3c, 4b). Najväčší podiel prisťahovaných z mesta **Šaľa** vykazuje obec *Dlhá nad Váhom* (75,6 %). Ostatné obce s prevažujúcim podielom z mesta Šaľa sú *Diakovce* (49,8%), *Kráľová nad Váhom* (59,3 %) a *Trnovec nad Váhom* (59,3 %) (obr. 3d, 4d). Čo sa týka mesta **Topoľčany**, obec *Tovarníky* vykazuje najvyšší podiel prisťahovaných z mesta (65,4 %). K ostatným suburbánnym obciam patria: *Nemčice* (56,9 %), *Jacovce* (53,5 %), *Solčany* (51,0 %), *Tesáre* (49,7 %), *Chrabrany* (49,3 %), *Nitrianska Streda* (48,9 %), *Norovce* (47,6%). Obce *Krnča* (44,7 %) a *Nemečky* (55,3 %), napriek vysokému podielu imigrantov z mesta, nepatria do suburbánnej zóny, čo nevylučuje, že raz sa môžu stať jej súčasťou (obr. 3e, 4e).

Obr. 3 Emigrácia obyvateľstva zo stredne veľkých miest NSK do vidieckych obcí v rokoch 1998 – 2009
 a) mesto Komárno



Na základe indikátorov stanovených v metodike príspevku možno potvrdiť, že v období rokov 1998 – 2009 prebiehala v stredne veľkých mestách NSK suburbanizácia a v ich okolí sa vytvorili súvislé suburbánne zóny (obr. 4). Počtom obcí je najrozsiahljšia suburbánna zóna mesta Levice, rozlohou najväčšia je suburbánna zóna Komárna, počtom obyvateľov dominuje suburbánna zóna mesta Levice a hustotou zaľudnenia zóna Topoľčian (tab. 2).



Obr. 4 Suburbánne zóny stredne veľkých miest Nitrianskeho samosprávneho kraja v rokoch 1998 -2009 (a- Komárno, b- Nové Zámky, c- Levice, d- Šaľa, e- Topoľčany)

Tab. 2 Vybrané ukazovatele suburbánnych zón stredne veľkých miest NSK

Suburbánna zóna mesta	Počet obcí	Rozloha (v km ²)	Počet obyvateľov	Hustota zaľudnenia (obyvateľ/km ²)
Komárno	8	194,5	10 510	54,0
Levice	11	131,2	6 862	52,3
Nové Zámky	4	107,9	11 223	104,0
Šaľa	4	72,4	7 653	105,7
Topoľčany	8	85,2	9 353	109,8

Zdroj: ŠÚ SR, 2011

Záver

Príspevok poukazuje na potvrdenie suburbanizácie v stredne veľkých mestách Nitrianskeho samosprávneho kraja. Samozrejme, v nich nedosahuje také rozmery, ako je tomu vo veľkých mestách Slovenska. Napriek tomu, v nich prebieha. Významným motivačným faktorom suburbanizácie je možnosť vlastníť rodinný dom. Obyvatelia tak odchádzajú bývať do tichého vidieckeho prostredia. Zároveň však zostávajú v blízkosti mesta, ktoré im poskytuje potrebné služby a zamestnanie. Stredne veľké mestá Nitrianskeho samosprávneho kraja sú relatívne rovnomerne rozmiestnené. Rozvinuli sa pozdĺž hlavných vodných tokov a tvoria základnú koncepčnú a komunikačnú kostru osídlenia kraja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Repaská G. (2012) Rezidenčná suburbanizácia miest Nitrianskeho samosprávneho kraja (Empirický príklad mesta Nitra). Fakulta prírodných vied UKF v Nitre, Nitra, p. 8
- [2] Slavík V., Kurta T. (2007) Forum Statisticum Slovaca 3(3), p. 201
- [3] Slavík V. et al. (2011) Forum Statisticum Slovaca 7(6), p. 169
- [4] Dická J. (2006) Geografická revue 2(2), p. 295
- [5] Dická J. (2007) Geographia Cassoviensis 1(1), p. 19
- [6] Czaková G. (2009) GEO Information 5(1), p. 14
- [7] Matlovič R., Sedláková A. (2004) Folia geographica 7. 42(1), p. 75
- [8] Sedláková A. (2005) Folia geographica 8 43(1), p. 87
- [9] Gajdoš P. (2007) Životné prostredie 41(6), p. 255
- [10] Czaková G. (2010) Geographia Cassoviensis 4(1), p. 39

Časopriestorová analýza národnostnej štruktúry v pobaltských republikách (Litva, Lotyšsko, Estónsko) po roku 1918

Michal Hladký

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra regionálnej geografie, ochrany a plánovania krajiny, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko;
michalh.312@gmail.com*

Abstrakt

The paper is aimed at ethnic structure of population of the Baltic states (Lithuania, Latvia and Estonia) and its analysis in terms of intertemporal and interregional approach. It describes changes of ethnic structures in claimed region after year 1918 with their consequences, spatial disparities of the ethnics and their mutual connections between each other. Among nations and national minorities are mentioned those which are to be „extinct“ in this area due to natural decrease and high level of emigration and potentially replaced by the new perspective ethnics. As a summary, the article refers to the conception of core areas of states and specify the core areas of the autochthonic minorities in the Baltics.

Kľúčové slová: *historická geografia; politická geografia; národnostná štruktúra obyvateľstva*

Úvod a formulácia cieľa

Národnostná skladba pobaltských republík (Litvy, Lotyšska, Estónska), s ktorou vstupovali po roku 1918 po kolapse cárskeho Ruska do novej etapy samostatných národných štátov, bola výsledkom komplikovaného historického vývoja. Cieľom nášho príspevku je podať analýzu etnických a národnostných pomerov transformujúcej sa spoločnosti pobaltských štátov v priebehu 20. a na začiatku 21. storočia, a to s využitím dvojakeho prístupu: intertemporálneho, sledujúceho procesy a javy z dynamického hľadiska a skúmajúceho ich zmeny v priebehu času; a interregionálneho, postihujúceho vnútornú štruktúru populácie skúmaných krajín a ich diferenciácie v priestore. Príspevok zachytáva vzťahy jednotlivých etník medzi sebou, ich transformáciu a vytlačanie vymierajúcich a „vyst'ahovavajúcich sa“ národností v regióne imigrantmi, ako aj vytýčenie jadrových priestorov osídlenia autochtónnych menšín v priestore Pobaltia.

Materiál a metódy

Pri tvorbe príspevku sme vychádzali prevažne z informácií zo sčítaní obyvateľstva, poskytnutých národnými štatistickými úradmi v Litve, Lotyšsku a Estónsku [1, 2, 3, 4, 5]. Ako východiskové obdobie sme si zvolili kvôli názornej komparácii prierezové roky na začiatku (nevýhodou bolo, že sa v 20./30. rokoch 20. storočia prvé sčítania po dosiahnutí samostatnosti konali v každej krajine v inom roku- v Litve v roku 1923, v oblasti okolo

Klajpedy v roku 1925, na litovských územiach okupovaných Poľskom v roku 1921, v Lotyšsku 1925, v Estónsku 1922 resp. 1934; v príspevku zjednodušene hovoríme o tomto období ako o roku približne 1925) a na konci sledovaného obdobia (2011).

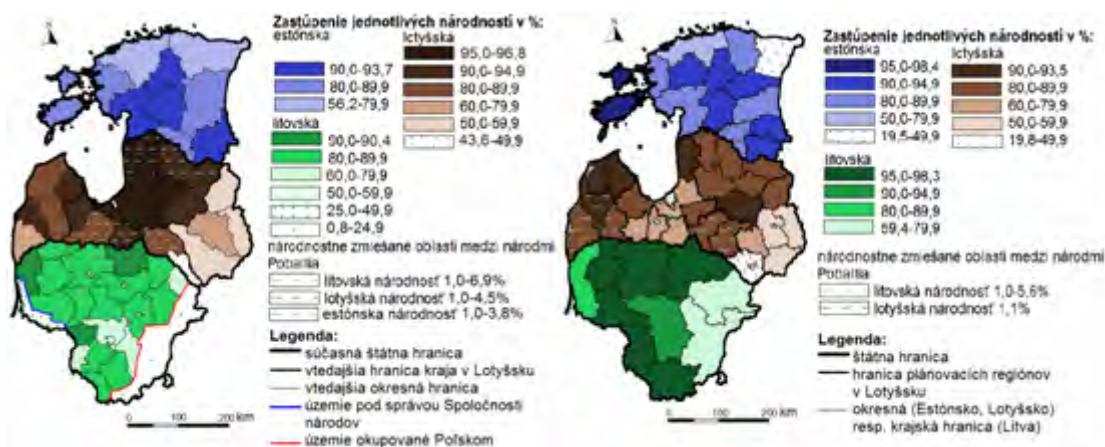
Pri spracúvaní týchto databáz sme museli vyriešiť viacero druhov problémov: zatiaľ nezverejnené výsledky sčítania v Litve za municipality, zlúčenie rozdrobených lotyšských municipalít kvôli korektnosti do skupín municipalít, absencia historických databáz v prípade Estónska (tu sú podiely Estóncov na obyvateľstve okresného sídla vzťahnuté na celý okres, tieto údaje pochádzajú z oficiálnej databázy Knižnice Kongresu v USA [6]). Na získanie základného pohľadu do problematiky politického a historického vývoja Pobaltia v európskom kontexte sme využili skriptá od Gurňáka [7] a načrtli sme jadrové územia pôvodných menšín v pobaltskom priestore podľa definície od Mellora [8], keďže národnostné zloženie obyvateľstva významne späté s ďalším politickým, sociálnym a kultúrnym rozvojom krajiny, tvorbou národného povedomia a pod.

Získané údaje sme spracovali vo forme a mapovej projekcie (obr. 1-5), zachytávajúcej kartogramovou metódou koncentráciu jednotlivých etnických skupín v regiónoch Pobaltia podľa podielu na obyvateľstve v skúmaných územných jednotkách (s výnimkou „domácich“ národov, teda v Litve Litovcov, v Lotyšsku Lotyšov a v Estónsku Estóncov, sme priestorovo zachytili v mape tie národnostné skupiny, ktorých podiel na obyvateľstve vo vymedzených územných jednotkách dosahoval aspoň 1%).

Výsledky a diskusia

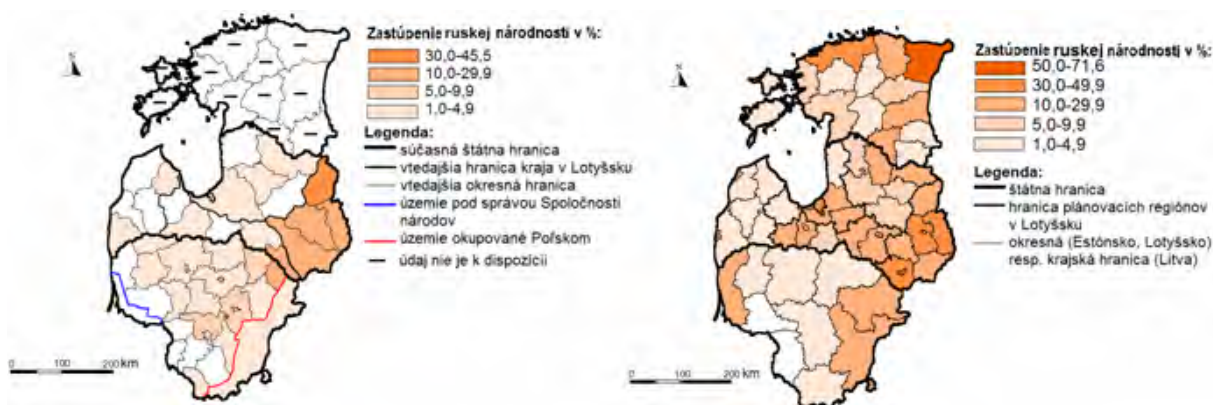
Etnický vývoj pobaltských republík po roku 1918 môžeme v zásade rozdeliť do troch veľkých etáp. Prvou je obdobie od konštituovania samostatných štátov, odčlenených od Ruska v dôsledku prvej svetovej vojny v roku 1918, do druhej svetovej vojny (1940). Táto epocha bola na rozdiel od neskorších charakteristická vyššou národnostnou diverzitou a vysokou koncentráciou viacerých početných a vplyvných národnostných menšín v mestách (Nemci, Židia), najmä v Lotyšsku a Litve (podiel Nemcov na obyvateľstve dosahoval vyše 3%, zastúpenie Židov bolo vyše 5% v Lotyšsku a viac ako 7,5% v Litve). Židia boli viacmenej difúzne rozmiestnení po celej vtedajšej Litve (nepatrili k nej východný, silne spolonizovaný okupovaný pás so súčasným hlavným mestom Vilniusom, z dvoch tretín obývaný Poliakmi; ani pobrežie okolie prístavu Klajpeda, zo 40% obývané Nemcami). V Lotyšsku sa židovské osídlenie sústreďovalo na pobrežie Baltiku, do južnej polovice krajiny (regióny Kurónsko, Zemgalsko, Latgalsko) a Rigy (tu podiel Židov predstavoval asi tretinu). Historicky tradične nemeckou oblasťou v Pobaltí z čias nemeckých križiakov

a Východného Pruska bolo okrem Klajpedy aj Kurónsko na západnom pobreží Lotyšska (najmä okolie mesta Liepaja). Najpočetnejšie ruské menšiny sa nachádzali vo východnom pohraničí Lotyšska, kde miestami presahovali štvrtinu obyvateľov daného územia (okolie miest Daugavpils, Rezekne a pod.), menšou, ale nie zanedbateľnou menšinou boli Bielorusi, ktorých osídlenie v zásade kopírovalo koncentráciu Rusov na východe Lotyšska. Poľské osídlenie môžeme diferencovať na tri regióny: okolie Kaunasu, dočasného hlavného mesta Litvy počas obsadenosti Vilniusu Poliakmi, juhovýchodné pohraničie Lotyšska a južné pobrežie Lotyšska.



Obr. 1a,b Relatívny podiel Litovcov, Lotyšov a Estóncov na obyvateľstve v pobaltských republikách (Litva, Lotyšsko, Estónsko) podľa hlavných územnosprávnych jednotiek okolo roku 1925-1a (dnešná Litva k roku 1921-1925, Lotyšsko 1925, Estónsko 1934) a v roku 2011-1b.

Prameň: spracované autorom podľa [1, 2, 3, 4, 5, 6].



Obr. 2a, b Priestorová zmena rozmiestnenia ruskej menšiny v Pobaltí podľa hlavných územnosprávnych jednotiek v rokoch cca. 1925 (2a) až 2011 (2b).

Prameň: spracované autorom podľa [1, 2, 3, 4, 5, 6].



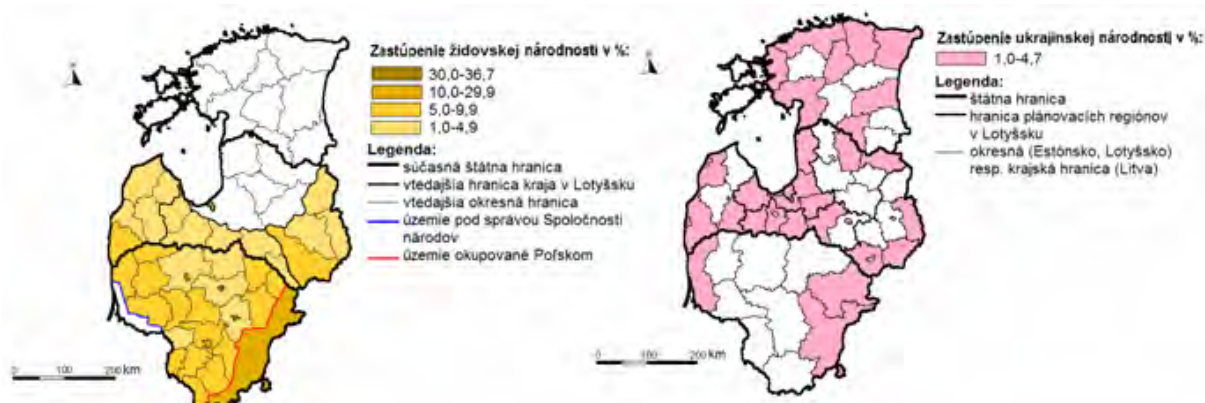
Obr. 3a, b Priestorová zmena rozmiestnenia poľskej menšiny v Pobaltí podľa hlavných územnosprávnych jednotiek v rokoch cca. 1925 (3a) až 2011 (3b) a geografická distribúcia finskej menšiny v regióne v roku 2011 (3b).

Prameň: spracované autorom podľa [1, 2, 3, 4, 5, 6].



Obr. 4a, b Priestorová zmena rozmiestnenia bieloruskej menšiny v Pobaltí podľa hlavných územnosprávnych jednotiek v rokoch cca. 1925 (4a) až 2011 (4b) a geografická distribúcia nemeckej menšiny v regióne okolo roku 1925 (4a).

Prameň: spracované autorom podľa [1, 2, 3, 4, 5, 6].



Obr. 5a, b Geografická distribúcia židovskej menšiny v Pobaltí podľa hlavných územnosprávnych jednotiek okolo roku 1925 (5a) a priestorová lokalizácia obyvateľstva ukrajinskej národnostnej menšiny v pobaltských republikách v roku 2011 (5b).

Prameň: spracované autorom podľa [1, 2, 3, 4, 5, 6].

Po roku 1940 bola v dôsledku nacistickej a neskôr povojnovej sovietskej okupácie väčšina Židov a neskôr aj Nemcov vysídlená. Naštartoval sa proces rusifikácie obyvateľstva, rýchlo sa zvyšoval sa podiel národov Sovietskeho zväzu na obyvateľstve, najmä v Lotyšsku a Estónsku, kde dramaticky vzrástol počet Rusov za roky 1934/1935-1989 z cca. 10% na vyše tretinu v Lotyšsku (súčasne podiel Lotyšov klesol z troch štvrtín na 52%) a z cca. 8% na vyše 30% v Estónsku (zároveň podiel Estóncov poklesol o viac ako 25 percentuálnych bodov z 88 na 61,5%).

V posledných rokoch sa v tretej etape po roku 1990 a opätovnom získaní nezávislosti pobaltských krajín postupnou, často vynútenou naturalizáciou, podiel etnických Rusov (asi 500 tis. sú tzv. „neobčania“ bez štátneho občianstva) začína znižovať - podiel Rusov v roku 2011 predstavoval v Lotyšsku i Estónsku približne štvrtinu obyvateľov a naopak, podiely štátotvorných národov začínajú narastať (podiel Lotyšov v Lotyšsku v roku 2011 bol približne 62%, podiel Estóncov v Estónsku takmer 70%). Jedinou krajinou, kde sa podiel domáceho obyvateľstva v celom období udržoval stabilne na približne rovnakej úrovni, bola Litva (83-84%), ale aj tu sa podiel Rusov (aj Poliakov) v povojnovom období mierne zvýšil (z cca. 1,5% v roku 1923 na takmer 6% v roku 2011 a relatívne zastúpenie Poliakov vzrástlo v tomto istom období z približne 3% na cca. 6,5%).

Záver

Jadrovými priestormi pobaltských autochtónnych menšín (Litovci, Lotyši, Estónci) je najmä oblasť (rozšírená na sever aj na juh) okolo Rižského zálivu, pričom v pohraničí dochádza k presahom národnostných menšín za hranicu druhého štátu (predovšetkým Lotyšsko- zo severu – oblasť okolo mesta Valmiera- tu zasahujú Estónci a z juhu- významnými koncentračnými uzlami sú mestá Jelgava a Jekabpils- Litovci, ale tieto národnostne zmiešané oblasti sa nachádzajú aj na juhu Estónska, kam zasahuje osídlenie Lotyšov; a aj na sever Litvy, kde tiež žijú lotyšské menšiny). Pôvodným centrom osídlenia autochtónnej bieloruskej a ruskej menšiny je východné pohraničie Lotyšska s mestami Rezekne a Daugavpils). Centrom osídlenia Poliakov v Pobaltí je najmä Vilnius a okolie mesta Kaunas v Litve.

Pod'akovanie

Chcel by som sa touto formou poďakovať doc. RNDr. Danielovi Gurňákovi, PhD. za cenné rady a pripomienky pri tvorbe tohto príspevku, najmä k záležitostiam týkajúcich sa spôsobu prevedenia mapovej projekcie.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Lietuvos statistikos departamentas (1923) Lietuvos gyventojai 1923. Vilnius, Litva, p. 36. [Citované: 28. február 2013]
<http://www.stat.gov.lt/uploads/leidiniai/Lietuvos_gyv_sur.pdf>
- [2] Latvijas statistika (1925) Deuxième recensement de la population en Lettonie. Riga, Lotyšsko, p. 84. [Citované: 28. február 2013]
<http://www.csb.gov.lv/sites/default/files/dati/TSK_1929_02_03.pdf>.
- [3] Lietuvos statistikos departamentas (1923) Lietuvos gyventojai 2011. Vilnius, Litva, p. 21. [Citované: 28. február 2013]
<http://www.stat.gov.lt/uploads/Lietuvos_gyventojai_2011.pdf>
- [4] Latvijas statistika (2011). Resident population in statistical regions, cities under state jurisdiction and counties by ethnicity, gender and by place of birth on March 1, 2011. [Citované: 28. február 2013]
<http://data.csb.gov.lv/Dialog/varval.asp?ma=TSG11-061a&ti=TSG11-061.+RESIDENT+POPULATION+IN+STATISTICAL+REGIONS%2C+CITIES+UNDER+STATE++JURISDICTION+AND+COUNTIES+BY+ETHNICITY%2C+GENDER+AND++BY+PLACE+OF+BIRTH+ON+MARCH+1%2C+2011&path=../DATABASEEN/tautask_11/Final%20results%20of%20the%20Population%20and%20Housing%20Census%202011/&lang=1>
- [5] Statistics Estonia (2012) Population by sex, ethnic nationality and county. [Citované: 28. február 2013]
<http://pub.stat.ee/px-web.2001/Dialog/varval.asp?ma=PO0222&ti=POPULATION+BY+SEX%2C+ETHNIC+NATIONALITY+AND+COUNTY%2C+1+JANUARY&path=../I_Databas/Population/01Population_indicators_and_composition/04Population_figure_and_composition/&lang=1>
- [6] The Library of Congress. [Citované: 28. február 2013]
<http://lcweb2.loc.gov/frd/cs/estonia/ee_appen.html> .
- [7] Gurnák D., Blažík T., Lauko V. (2007) Úvod do politickej geografie, geopolitiky a regionálnej geografie. Geografika, Bratislava, Slovensko, p. 47
- [8] Mellor R. E. H. (1989) Nation, state and territory – a political geography. Routledge, London – New York, p. 50

Hodnotenie odlesnenia s využitím regresie

Júlia Jurištová

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra kartografie,
geoinformatiky a DPZ, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
jjuristova@gmail.com*

Abstrakt

This work is devoted to the evaluation of deforestation using regression methods through software Idrisi Taiga. Deforestation is evaluated by the method of logistic regression. The dependent variable has discrete values "0" and "1", indicating that the deforestation occurred or not. Independent variables have continuous values, expressing the distance from the edge of the deforested areas of forests from urban areas, the river and the road network. The results were also used in predicting the probability of deforestation in subsequent periods. The result is a map showing the output probability of deforestation for the periods 1990/2000 and 200/2006 in accordance with predetermined coefficients (values of independent variables).

KLúčové slová: *odlesnenie; regresia; analýza vzdialenosti; krajinná pokrývka; lesné porasty*

Úvod a formulácia cieľa

Lesy tvoria podstatnú časť slovenského územia. Pod termínom odlesňovanie chápeme systematické vyrúbavanie lesných porastov, ktorého zámerom je zmenšenie rozlohy lesov v určitej danej oblasti. Existuje veľa príčin odlesňovania, napr. ťažba dreva, rozširovanie ornej pôdy na úkor lesnej a podobne. K úbytku lesov môže však prísť aj bez prispenia človeka a to prostredníctvom prírodným katastrof (napr. požiar), vplyvom škodcov, atď. To má nielen miestny až regionálny význam, ale aj globálny. Podiel odlesňovania sa každým rokom zvyšuje. Táto situácia môže mať negatívny dopad, napr. na zmenu klímy, spôsobovať zvyšovanie objemu erózie a podobne. V súčasnosti sa pod pojmom regresia rozumejú predovšetkým systematické zmeny jedných veličín pri zmenách iných veličín a zobrazenie priebehu týchto zmien pomocou matematických funkcií. Vychádza sa z toho, že hodnoty niektorých veličín sú ľahko dostupné (možno ich určiť alebo odmerať) a hodnoty iných veličín sa určujú alebo ovplyvňujú veľmi ťažko. Avšak medzi týmito dvoma druhmi veličín existujú vzťahy a väzby, kedy z hodnôt jednej veličiny možno viac menej presne odhadnúť hodnoty druhej veličiny. Tieto vzťahy a väzby však treba popísať, vyjadriť a matematicky formulovať. Veličiny vystupujúce ako príčina sa označujú ako vysvetľujúce resp. nezávislé premenné a veličina vystupujúca ako dôsledok je označovaná ako vysvetľovaná resp. závislá premenná [1]. V tejto práci boli za nezávislé premenné určené vzdialenosti od okraja lesov, sídel, od cestnej a riečnej siete a závislou premenou boli vrstvy lesov.

Cieľom tejto práce je zhodnotenie odlesnenia v oblasti stredného Slovenska (konkrétne oblasť Poľany) za časové obdobia 1990-2000 a 2000-2006. Hlavným cieľom bolo identifikovať územia, v ktorých môže prísť k odlesneniu. Za faktory, ktoré by mohli mať najväčší vplyv na odlesnenie v danom území sme navrhli nasledovne: vzdialenosť od okraja lesov, vzdialenosť od sídel, vzdialenosť od riečnej siete vzdialenosť od cestnej siete. Podstatou práce bolo spracovanie vstupných údajov takou formou, aby bolo možné z výstupov stanoviť, či k danému odlesneniu v oblasti prišlo alebo nie, a ak áno, určiť jeho rozsah.

Materiál a metódy

Oblasť experimentu zaberá severnú, severozápadnú a strednú časť Banskobystrického kraja, čiže okres Brezno a časť okresu Banská Bystrica a Detva. V rámci geologického členenia patrí oblasť do Alpsko - Himalájskej sústavy, podsústavy Karpaty, provincie Západné Karpaty a subprovincie Vnútorne západné Karpaty. V danej oblasti sa nachádza Horehronské podolie, Veporské vrchy, časť Zvolenskej kotliny a Poľana. Najvyšším bodom je vrch Poľana (1457,8 m n. m.). Značnú časť územia pokrývajú nepoľnohospodárske pôdy (cca 60 - 70%), v rámci nich sú najviac zastúpené lesné pôdy (cca 60 - 65%), zvyšok tvorí poľnohospodárska pôda. Z lesných porastov je najviac zastúpený smrek obyčajný, menej buk lesný a jedľa biela. Časť Zvolenskej kotliny je porastená najmä dubinami (cerovo-dubové, dubovo-hrabové lesy). Oblasť Horehronského podolia je silne odlesnená. Na danom území sa rozprestiera CHKO Poľana a zasahuje tu aj časť ochranného pásma NP Nízke Tatry. Pohorie Poľana je zaradené aj medzi Biosférické rezervácie Programu UNESCO.

V tejto práci je prezentovaná logistická regresia pre analýzu a predikciu (predpoveď) lesných zmien. Vstupné údaje použijeme pre analýzu lesných zmien a zároveň aj predpovedať trendy týchto zmien v budúcnosti. Za faktory, ktoré by mohli mať najväčší podiel na odlesnení sme si zvolili: vzdialenosť od okraja lesov, vzdialenosť od sídel, vzdialenosť od riečnej siete a vzdialenosť od cestnej siete. V prvom kroku uskutočníme logistickú regresiu pre zmeny lesov medzi rokmi 1990 a 2000. V tomto prípade budeme pokladať rok 1990 za základný časový horizont pre vytvorenie 4 rastrových vrstiev pre jednotlivé vzdialenosti (toto budú 4 rastrové vrstvy našich 4 nezávislých premenných) a 1 rastrovú vrstvu pre závislú premennú (odlesnenie). Pri tvorbe závislej premennej bolo potrebné vytvoriť si obraz, ktorý ukazuje premenu lesov na iné kategórie krajinej pokrývky. Vo výslednej vrstve, hodnota 1 reprezentovala tie oblasti, ktoré sa zmenili z lesov v roku 1990 na nejakú inú kategóriu krajinej pokrývky v roku 2000. V ďalšom kroku sme si pomocou príslušných modulov

vytvorili 4 vrstvy nezávislých premenných (vrstva vyjadrujúca vzdialenosť od okraja lesov, vrstva vzdialenosti od zastavaných oblastí (sídliel) a vrstvy vzdialenosti od ciest a vodných tokov). Po zostavení všetkých vrstiev sme uskutočnili logistickú regresnú analýzu. Pre nové predikcie (predpovede) bolo ešte potrebné aby sme zostrojili 4 premenné pre obdobie 2000-2006. Zo štyroch premenných sa za toto obdobie zmenili len dve veličiny: vzdialenosť k okraju lesov a vzdialenosť k sídlam. O zvyšných dvoch nezávislých premenných (vzdialenosť od vodných tokov a vzdialenosť od ciest) nemáme informácie, že by došlo k výrazným zmenám medzi jednotlivými časovými obdobiami. Preto sme predpokladali, že zostali nezmenené a použili tie isté vrstvy. Po dokončení modulu sme získali predikcie odlesnenia pre dané časové horizonty.

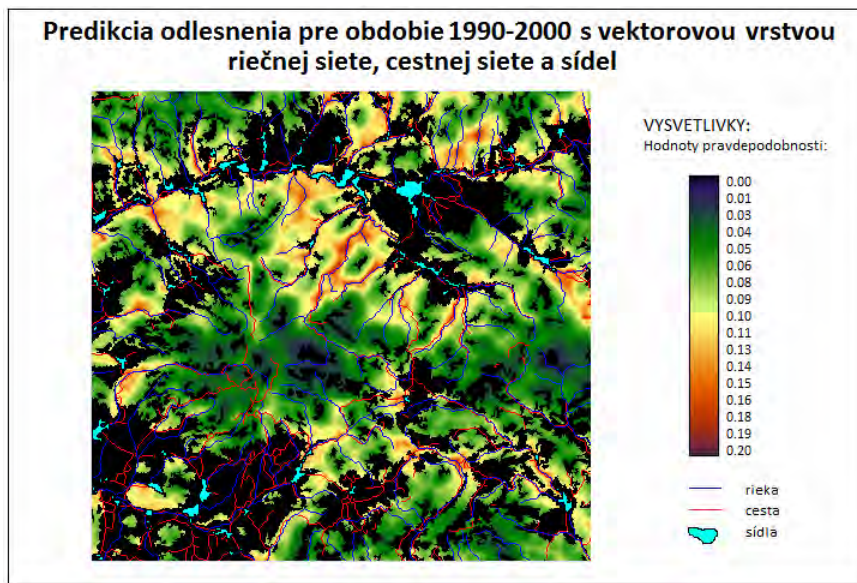
Výsledky a diskusia

Program Idrisi nám v poslednom kroku pokusu zostavil rovnicu logickej regresie. Regresná rovnica obsahovala regresné koeficienty pre každú premennú. Koeficienty boli umiestené do modelu za účelom odhadu pravdepodobnosti jednotlivých subjektov. Rovnica nášho experimentu, ktorú sme dostali z príslušného modulu mala tvar:

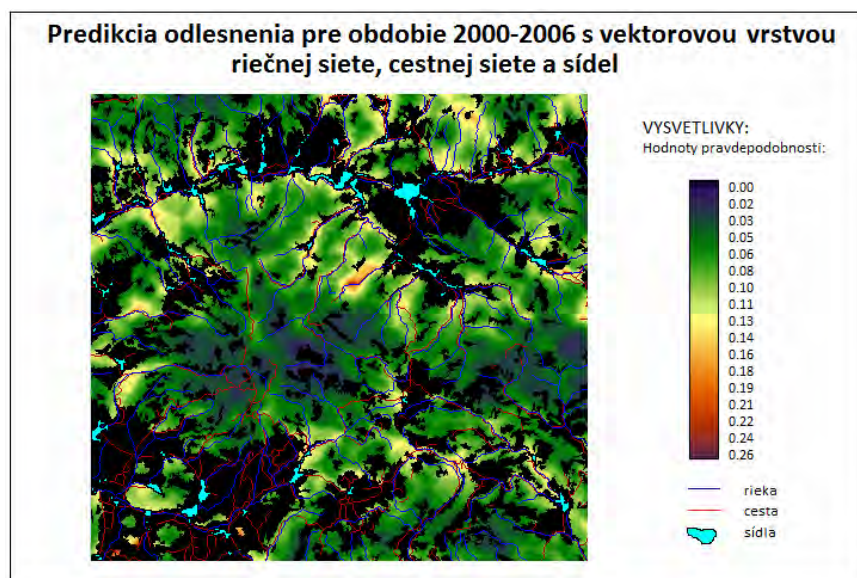
$$\begin{aligned} \text{logit}(\text{odles_new}) = & -1.7444 + 0.000582 * \text{les90_dist_new} - & [I.] \\ & 0.000176 * \text{urban90_dist_new} - 0.013210 * \text{cesty_dist_new} - \\ & 0.000211 * \text{vodstvo_dist_new}. \end{aligned}$$

Jednotlivé komponenty nám znázorňujú vplyv každej nezvislej premennej na závislej premennej. Koeficienty, ktoré dosahujú najvyššie hodnoty sú pre daný predpoklad najvýznamnejšie, koeficienty s menšími hodnotami sú menej významné. Podľa tohto môžeme usúdiť, že najvplyvnejším činiteľom bola práve vzdialenosť od okraja lesov. Druhým najväčším činiteľom vplývajúcim na odlesnenie je vzdialenosť od sídel. Najnižší vplyv z jednotlivých komponentov dosahuje vzdialenosť od cestnej siete. Prvá hodnota v rovnici je hodnota vplyvu premennej, ktorú nepoznáme.

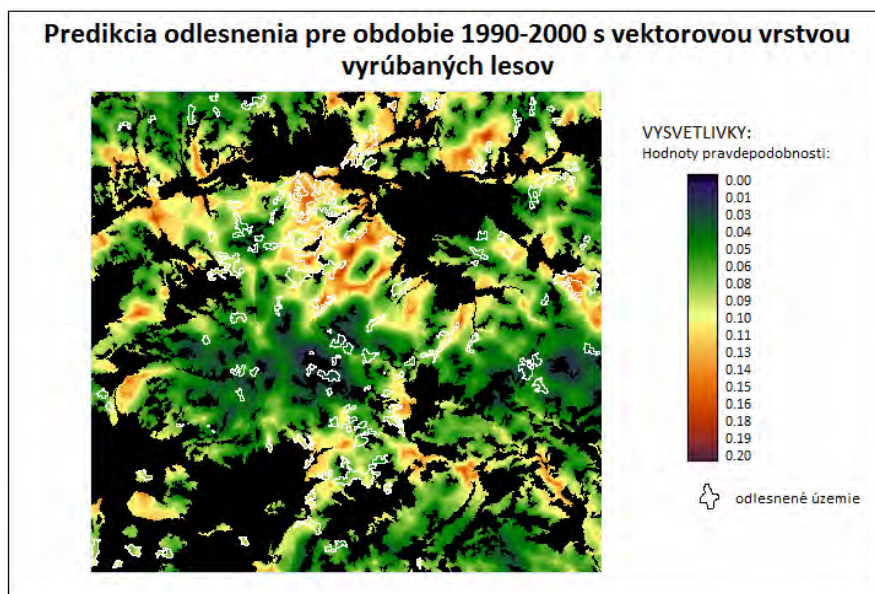
Na mapách, ktoré sme vytvorili, možno vidieť, že územia s najvyššou hodnotou pravdepodobnosti (0,10 - 0,20 čo predstavuje 10 - 20%) sú znázornené žltou až tmavočervenou farbou. Naopak územia z nízkou hodnotou pravdepodobnosti (0,01 - 0,04 čiže 1 - 4%) sú tmavo zelenej až tmavo modrej farby. K lepšiemu porovnaniu sme na mapy priložili aj vektorové vrstvy vyrúbaných lesov, ciest, riek a sídel. Tu možno vidieť, že rozloženie týchto komponentov je sústredené práve v oblastiach s najvyšším odlesnením. Z uvedeného môžeme usúdiť, že náš výber ukazovateľov (koeficientov) bol relatívne správny.



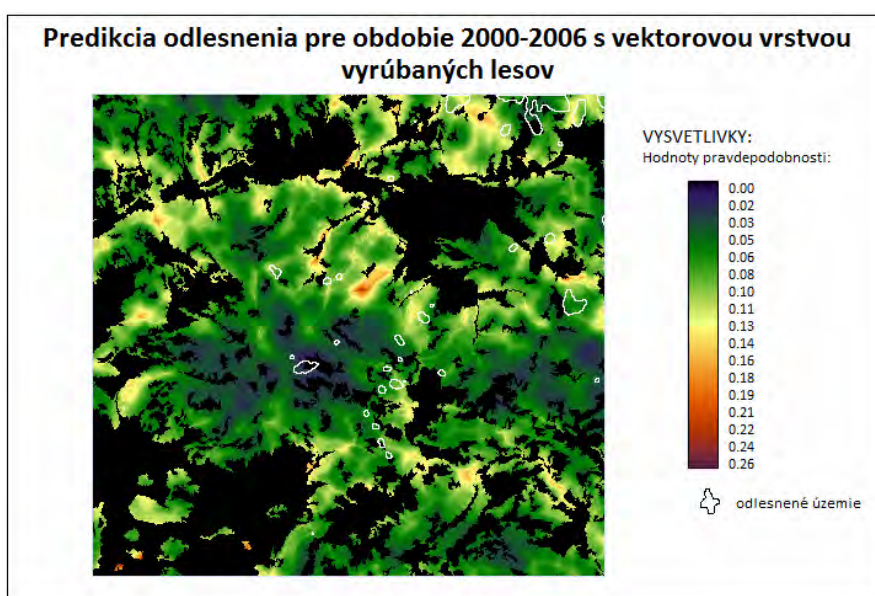
Obr.1 Predikcia odlesnenia pre obdobie 1990-2000 s vektorovou vrstvou riečnej siete, cestnej siete a sídel



Obr.2 Predikcia odlesnenia pre obdobie 2000-2006 s vektorovou vrstvou riečnej siete, cestnej siete a sídel



Obr.3 Predikcia odlesnenia pre obdobie 1990-2000 s vektorovou vrstvou vyrúbaných lesov



Obr.4 Predikcia odlesnenia pre obdobie 2000-2006s vektorovou vrstvou vyrúbaných lesov

Záver

Účelom tejto bakalárskej práce bola identifikácia území, na ktorých mohlo vplyvom určitých faktorov nastať odlesnenie. Uvedené územie sme identifikovali plnoautomatickou metódou, ktorá je založená na využití rovnice logistickej regresie.

Urýchľovanie odlesnenia môže viesť k viacerým negatívnym dopadom nielen na životné prostredie ale aj na ľudskú spoločnosť. Môže prísť k strate prírodnej rozmanitosti, zmene klímy, porušeniu prirodzenej funkcie lesa a podobne.

Vývoj odlesňovania lesov je v celku priaznivý. Súčasný stav lesov je výsledkom práce predchádzajúcej generácie. Na špecifikovanom území pozorujeme znižovanie podielu odlesňovania. Obdobie za ktoré sme tieto pozorovania uskutočňovali je pomerne krátke, preto nemožno celkom objektívne posúdiť krátkodobé zmeny v stave lesov. V období 1990 – 2000 je zaznamenaná vyššia ťažba dreva. Preferuje sa najmä ťažba ihličnatých porastov, ale aj buka lesného, ktorý je v príslušnej oblasti značne zastúpený. Vysoký podiel odlesnenia je dôsledkom najmä klimatických zmien, zvýšenej frekvencie a intenzity pôsobenia predovšetkým abiotickými škodlivými činiteľmi. V nasledujúcom období 2000 – 2006 pozorujeme už nižší podiel odlesnenia. Presunom dospelých porastov do rubného veku, by sa však odlesnenie malo zvyšovať. Významnou skutočnosťou a špecifikom lesov danej oblasti je, že značná časť lesov sa nachádza v chránených oblastiach (napr. CHKO Poľana). V týchto miestach je ťažba obmedzená.

Značný vplyv na odlesnenie majú riečna a cestná sieť. Aj napriek nízkemu pokroku vo výstavbe lesných ciest, ich údržbe a rekonštrukcií je ich vplyv na odlesnenie vysoký. Za celé sledované obdobie sa dĺžka ciest v podstate nemenila. Obdobne je to platné aj pri vodných tokoch, starostlivosť o ne je malá. Vzdialenosť od sídel je ďalším významným činiteľom ovplyvňujúcim odlesnenie. Vyšší podiel výrubu lesov v okolí sídelnej štruktúry je podmienený najmä nižšou cenou dopravných nákladov.

Z uvedeného vyplýva, že náš predpoklad pri určovaní faktorov, ktoré by vo vyššej miere mohli ovplyvniť hodnoty odlesnenia, bol správny. Teda sme splnili cieľ našej práce.

PodĎakovanie

PodĎakovanie patrí všetkým, ktorí mi pomohli pri spracovaní práce. Najväčšia vďaka patrí Mgr. Jurajovi Strakovi.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Hebák P., Hustopecký J. (1987) Vícerozmerné statistické metody s aplikacemi. SNTL/Alfa, Praha/Bratislava, ČR, SR, p. 209

Využitie dištančne vážených migračných mier a indikátorov priestorovej autokorelácie vo výskume migrácie

Arnold Kakaš

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra humánnej geografie a demografie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská Republika;
kakasarnold@gmail.com*

Abstract

In the research of migration often appear terms as intraregional, foreign, attractive region, immigration center etc. which evoke spacial reach and relations with other regions. This article deals with the application of less-known methods, whose methodology allows exactly support statements about the spatial nature and relations between regions in the context of migration. These methods will be applied on the example of internal migration in Slovak Republic in periods 1996-1998 and 2009-2011.

Kľúčové slová: atraktivita regiónu; migrácia; autokorelácia

Úvod a formulácia cieľa

Regionálna štruktúra vnútorných migrácií sa v geografickej i demografickej literatúre už tradične analyzuje pomocou sumárnych indikátorov, ktoré poskytujú diferencovaný pohľad na rôzne dimenzie migračných procesov. Pri štúdiu celkovej úrovne migračnej bilancie v jednotlivých regiónoch sa najčastejšie dáva prednosť dvom indikátorom – miere čistej migrácie a indexu migračnej efektívnosti [1].

Cieľom tohto príspevku je analýza vnútornej migrácie v Slovenskej republike pomocou dištančne váženej miery efektívnosti migrácie (indexu atrakčnej efektívnosti - IAE), porovnanie (priestorovej) migračnej situácie v období rokov 1996 – 1998 a 2009 – 2011 a identifikáciu migračne atraktívnych a neatraktívnych skupín regiónov pomocou štatistických ukazovateľov priestorovej autokorelácie.

Za výberom týchto málo resp. vôbec nevyužívaných indikátorov stojí fakt, že klasicky využívané indikátory ako efektívnosť migrácie, intenzita migračného salda a najčastejšie používané korelačné a regresné analýzy nie sú schopné zachytiť priestorový aspekt migrácie, ktorý je jeho hlavným znakom. V prípade vnútornej migrácie Slovenskej republiky je táto priestorovosť migrácie o to výraznejšia, že Bratislava a celý jej okolitý región má excentrickú polohu.

Dáta a metódy

Ako zdroj vstupných údajov pre výpočet indexov atrakčnej efektívnosti (IAE) boli použité pramenné diela vydávané Štatistickým úradom SR s názvom Pohyb obyvateľstva v

Slovenskej republiky v roku 1996, 1997, 1998, 2009, 2010, 2011 [2]. Dáta týkajúce sa okresov Bratislava I až V a Košice I až IV boli agregované do regiónu Bratislava-mesto a Košice-mesto nakoľko v prípade migrácie do týchto miest je ich ďalšie členenie (ako cieľových miest migrantov) neopodstatnené.

Na analýzu vnútornej migrácie bol využitý index atrakčnej efektívnosti. Jeho výpočet je rozšírením vzorca pre výpočet efektívnosti migrácie (ako podielu migračného salda a objemu migrácie regiónu) o vzdialenosť, na ktorú jednotlivé migračné toky začínajúce/končiacie v danom regióne prebiehajú:

$$IAE_i = \frac{\sum_{j=1}^n d_{ij} (M_{ji} - M_{ij})}{\sum_{j=1}^n d_{ij} (M_{ji} + M_{ij})} \cdot 100 \text{ (}\%) \quad [I.]$$

kde M_{ij} je objem migračného toku smerujúceho z regiónu i do regiónu j , M_{ji} je objem migračného toku smerujúceho z regiónu j do regiónu i , d_{ij} je vzdialenosť medzi regiónmi i a j [1]. Výsledná hodnota pre každý región môže dosahovať, rovnako ako v prípade indikátoru efektívnosti migrácie, hodnoty od -100 % po 100 %, pričom (v prípade dvojíc regiónov):

hodnota 100 % znamená jednosmerný tok z regiónu j do regiónu i ;

hodnota -100% znamená jednosmerný tok z regiónu i do regiónu j ;

hodnota 0% znamená že toky medzi dvojicou regiónov sú vyrovnané.

Ako vzdialenosti medzi regiónmi boli použité vzdialenosti ich centroidov s výnimkou dvojice Košice-mesto a okresu Košice okolie, ktorých vzájomná vzdialenosť bola vypočítaná ako priemerná vzdialenosť centroidov obcí okresu Košice okolie od centroidu mesta Košice.

Na analýzu priestorovej autokorelácie vypočítaných hodnôt IAE okresov boli použité dva indikátory:

i) jednovariantné Moranovo I, ktoré sme použili na globálne určenie prítomnosti a intenzity priestorovej autokorelácie hodnôt IAE. Moranovo I sa vypočíta podľa nasledujúceho vzorca:

$$I = \frac{n \sum_i \sum_j w_{ij} (y_i - \bar{y})(y_j - \bar{y})}{(\sum_i \sum_j w_{ij}) \sum_i (y_i - \bar{y})^2} \quad [II.]$$

kde n je počet regiónov, w_{ij} je váha pre dvojicu regiónov i a j , \bar{y} je priemerná hodnota sledovaného javu (v našom prípade IAE), y_i je hodnota sledovaného javu v regióne i a y_j je hodnota sledovaného javu v regióne j . Hodnoty Moranovho I sa môžu pohybovať od -1, kedy je sledovaný jav v priestore dokonale rozptýlený (vysoké hodnoty sa nachádzajú vedľa nízkych), cez 0, kedy je rozmiestnenie javu náhodné po 1, kedy je jav zhlukovaný (vysoké hodnoty vedľa vysokých, nízke vedľa nízkych) [3].

ii) lokálna G štatistika:

$$G_i(d) = \frac{\sum_{j=1, j \neq i}^n w_{ij}(d) \cdot x_j - \bar{x}_i \sum_{j=1, j \neq i}^n w_{ij}(d)}{S_i(d) \sqrt{\frac{(n-2) \sum_{j=1, j \neq i}^n w_{ij}^2(d) - [\sum_{j=1, j \neq i}^n w_{ij}(d)]^2}{n-2}}} \quad [\text{III.}]$$

kde d je kritická vzdialenosť, n je počet regiónov, x_j je hodnota sledovaného javu v regióne j a $w_{ij}(d)$ je váha pre dvojicu regiónov i, j a vzdialenosť d , S_i je rozptyl okolia regiónu i a \bar{x}_i je priemerná hodnota javu nepočítajúc s hodnotou regiónu i . Lokálna G štatistika indikuje v akom rozsahu je lokalita i obklopená zhlukom vysokých, resp. nízkych hodnôt. Na rozdiel od Moranovho I , hodnotí lokálna G štatistika len pozitívnu priestorovú autokoreláciu [4].

Pri výpočte oboch indikátorov boli použité váhy typu Queen stupňa 1. Na výpočet bol použitý program OpenGeoDa.

Výsledky a diskusia

Na základe výsledkov analýzy migračnej atraktivity okresov SR pomocou metódy indexu atrakčnej efektívnosti môžeme vo všeobecnosti súhlasiť s častými tvrdeniami autorov [5,6], že migračne atraktívne regióny sú lokalizované v západnej časti republiky a naopak migračne neatraktívne vo východnej. Napriek tomu môžeme v konkrétnych prípadoch okresov nájsť výrazné rozdiely hodnotení, ku ktorým dospeli autori klasickými indikátormi. Jedným z najvýznamnejších je prípad hlavného mesta Bratislavy, ktoré je o.i. v dôsledku suburbanizácie migračne stratové [5], avšak pri aplikácii IAE dosahuje v období 1996-1998 11. najvyššiu hodnotu a v období 2009-2011 4. najvyššiu hodnotu (Tab.1). Je to dôsledkom toho, že hoci počet prisťahovaných je menší ako vystťahovaných, prisťahovní prichádzajú z výrazne väčšej vzdialenosti ako je vzdialenosť vystťahovaných.

Tab. 1 Regióny s najvyššou a najnižšou hodnotou IAE (podľa 2009-2011)

Okres	1996-1998		2009-2011		rozdiel	
	IAE (%)	poradie	IAE (%)	poradie	IAE* (%)	poradie**
Senec	13,05	10	71,62649	1	58,58	9
Pezinok	20,06	3	55,0282	2	34,97	1
Malacky	21,51	1	47,70327	3	26,20	-2
Bratislava mesto	12,72	11	44,66641	4	31,95	7
Dunajská Streda	18,74	4	41,69574	5	22,95	-1
...						
Bardejov	-18,03	59	-45,4926	68	-27,47	-9
Spišská N. Ves	-17,98	58	-47,7912	69	-29,81	-11
Stará Ľubovňa	-15,50	57	-48,6961	70	-33,20	-13
Humenné	-30,83	70	-53,5353	71	-22,71	-1
Snina	-24,00	67	-56,2182	72	-32,22	-5

zdroj: vlastný výpočet

* kladná hodnota znamená nárast IAE medzi obdobiami, záporná znamená pokles

** kladná hodnota znamená vzostup v poradí medzi obdobiami, záporná zostup

Do obdobia 2009-2011 je evidentné zvýšenie rozdielov atraktívnosti východných a západných okresov, pričom počet tých s kladnou hodnotou IAE klesol a hodnoty sa zvýšili (Obr.1), čo je o.i. dôsledkom otvorenia, dovtedy migračne relatívne uzavretého regiónu východného Slovenska [6], možno teda očakávať, že sa zintenzívnila aj priestorová autokorelácia podľa IAE.

To potvrdzujú aj hodnoty Moranovho I, ktoré boli v období 1996-1998 na úrovni 0,61 a v období 2009-2011 na úrovni 0,75 (Tab.2), čiže hodnoty IAE boli stredne až silne autokorelované.

Tab.2 Výsledky analýzy Moranovho I

	obdobie	
	1996-1998	2009-2011
Moranovo I	0,612796	0,750133
z skóre	8,08	10,09

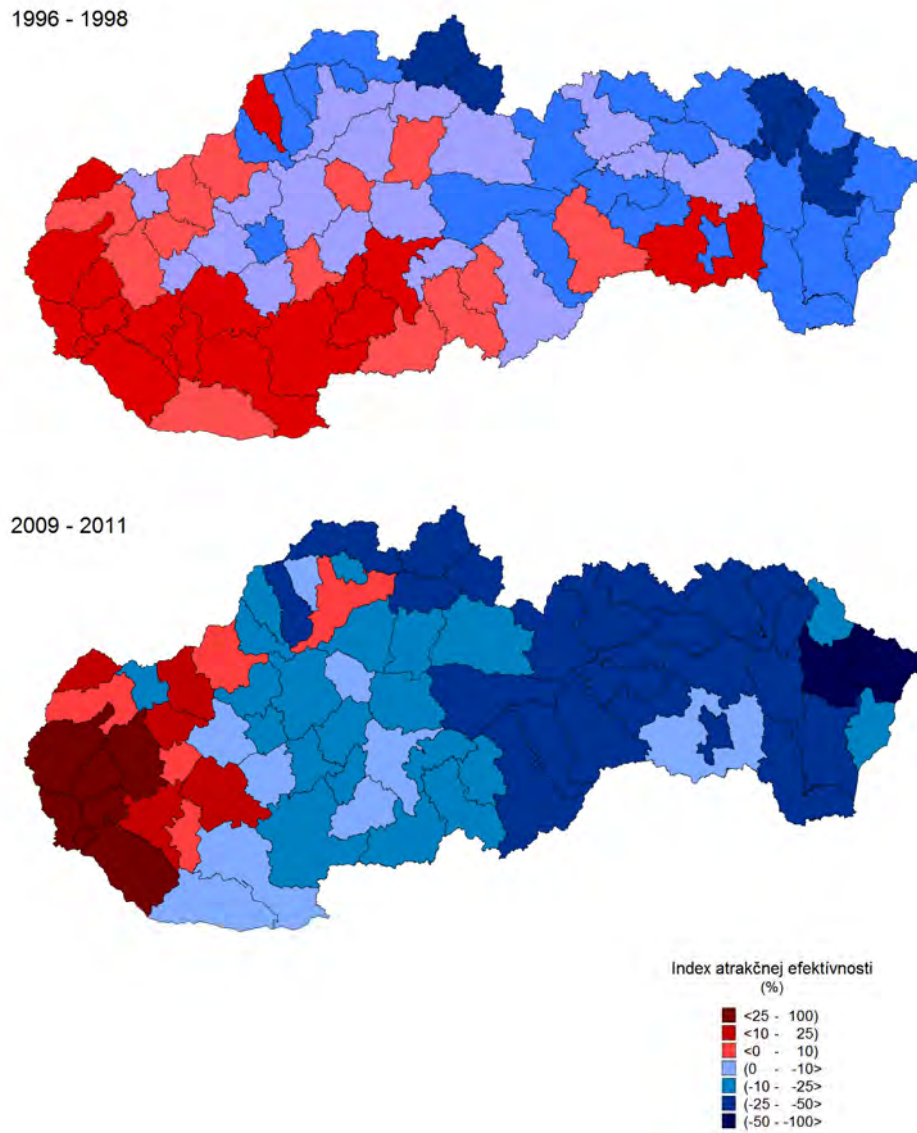
zdroj: vlastný výpočet

Rovnako je tomu tak aj v prípade použitia lokálnej G štatistiky (na hladine významnosti 5% a 1%), ktorej grafické výstupy (Obr.2) poskytujú aj informáciu, že došlo k rozšíreniu územia zhlukov okresov s nízkymi hodnotami IAE, ktorých väčšia časť pokrýva takmer celý Košický a Prešovský kraj a naopak k zmenšeniu územia s vysokými hodnotami, ktoré je tvorené najmä Bratislavským krajom a časťou Trnavského kraja. V prípade, ak by sme sa zaoberali len s zhlukmi, ktoré sú vyčlenené na hladine významnosti 1% zistili by sme, že jadro regiónu s vysokými hodnotami tvorí celý Bratislavský kraj a niektoré susedné okresy Trnavského kraja. Jadrom regiónu s nízkymi hodnotami sú najmä okresy Prešovského kraja s výnimkou okresov Poprad, Kežmarok, Stará Ľubovňa.

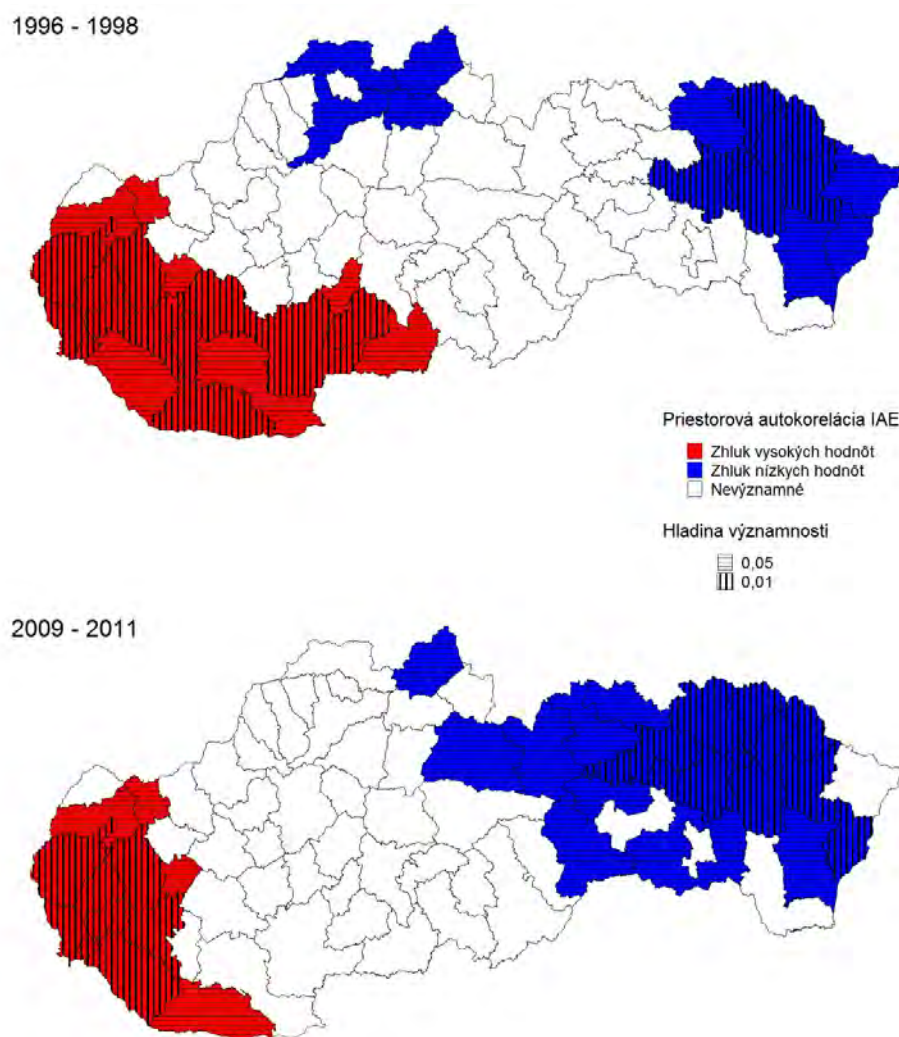
Záver

Používanie dištančne vážených indikátorov prináša do výskumu migrácie často zanedbávaný priestorový rozmer tohto procesu. Rovnako aj málo používané prostriedky priestorovej autokorelácie umožňujú analýzu priestorových vzťahov ako určovanie jadra imigračného/emigračného regiónu s ohľadom na priestorové vzťahy s okolitými regiónmi. Výsledky tejto práce potvrdili očakávané rozmiestnenie vysokých a nízkych hodnôt migračnej atraktivity okresov, odhalili však aj prípady, ktoré sa podľa jednoduchých absolútnych

ukazovateľov ako migračné saldo javia byť statovými/ziskovými, ale s ohľadom na dĺžku emigračných a imigračných tokov je ich atraktivita presne opačná.



Obr.1 IAE v okresoch SR podľa obdobia



Obr.2 Priestorová autokorelácia IAE podľa hladín významnosti

Zoznam použitej literatúry

- [1] Bezák A. (2008) Geografická revue 4(2), p. 31
- [2] ŠÚ SR (1997-2000, 2010-2012), Pohyb obyvateľstva v Slovenskej republike v roku 1996, 1997, 1998, 2009, 2010, 2011
- [3] Rogerson P. A. (2001) Statistical Methods for Geography. SAGE Publications Ltd, London, Veľká Británia, p. 167
- [4] Kusendová D., Solčianska J. (2007) Sympóziu GIS Ostrava 2007, VŠB-TUO Ostrava, nestránkované
- [5] Jurčová D. (2010) Migračné toky v Slovenskej Republike. Inštitút informatiky a štatistiky, Bratislava, SR, p. 18
- [6] Kakaš A., Káčerová M. (2012) VI. medzinárodné geografické kolokvium 2012, Danišovce, SR, p.37

Zhodnotenie presnosti výpočtu parciálnych derivácií prvého rádu z TIN

Martin Kalivoda

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra kartografie, geoinformatiky a diaľkového prieskumu Zeme, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko; kalivoda.martin@gmail.com

Abstrakt

The study is focused on the analysis of digital georelief models represented by triangular irregular networks (TIN). It presents a method of calculating the first order partial derivatives from triangular irregular network. It evaluates the accuracy of calculation by comparing the values of the first order partial derivatives calculated by direct differentiation of function which describes etalon area and the first order partial derivatives calculated from the generated triangular network (representing the same etalon area).

Keywords: *TIN; partial derivatives of the first order; deviations of values*

Úvod a formulácia cieľa

Georeliéf je fenoménom krajinnej sféry Zeme. Sústredí sa na ňom prevažná väčšina ľudských aktivít, preto mu ľudská spoločnosť od nepamäti venuje patričnú pozornosť, opisuje ho a študuje ho.

Jedným z prístupov štúdia je morfometrická analýza georeliéfu, ktorá skúma geometrickú štruktúru georeliéfu na báze aparátu teórie polí. Dynamický vedecko-technický pokrok najmä v oblasti informačných technológií rozšíril aplikačné možnosti morfometrickej analýzy georeliéfu. Začali sa rozvíjať geografické informačné systémy (GIS), ktorých neodmysliteľnou súčasťou sa stal komplexný digitálny model georeliéfu (KDMR).

Digitálne modely georeliéfu sa snažia rekonštruovať georeliéf vo virtuálnej realite. Vstupom na rekonštrukciu georeliéfu je podrobné diskkrétne bodové pole (PDBP), ktoré nesie najmä polohovú informáciu o stave georeliéfu, ale môže niesť aj rôzne doplnkové informácie. Georeliéf a jeho geometrickú štruktúru možno z PDBP rekonštruovať prostredníctvom interpolačných a aproximačných funkcií alebo prostredníctvom trojuholníkových sietí [1]. Výhodami reprezentácie georeliéfu pomocou nepravidelných trojuholníkových sietí sú najmä malé požiadavky na pamäť počítača, výpočtová nenáročnosť, schopnosť prostredníctvom nich zachytiť rôznorodé tvary georeliéfu a možnosť jednoduchej kalkulácie parciálnych derivácií (ktoré vstupujú do výpočtu morfometrických parametrov georeliéfu).

V našom príspevku chceme nadviazať na doteraz získané poznatky o modelovaní georeliéfu pomocou TIN a pretaviť ich do aplikačnej roviny. Na tieto účely slúži nami

naprogramovaná počítačová aplikácia, ktorá je schopná na základe algoritmu zohľadňujúceho vybrané podmienky kvality trojuholníkovej siete vygenerovať zo vstupného bodového poľa trojuholníkovú sieť a následne z nej vypočítať parciálne derivácie prvého rádu. Funkcionalitu naprogramovanej počítačovej aplikácie demonštrujeme na fiktívnej topografickej ploche georeliéfu, tzv. etalóne matematicky určenom polynómickou funkciou n -tého stupňa. Následne na základe rôznych štatistických prístupov zhodnotíme presnosť výpočtu parciálnych derivácií prvého rádu vo vrcholoch trojuholníkov vypočítaných z trojuholníkovej siete porovnaním ich hodnôt s exaktnými hodnotami parciálnych derivácií prvého rádu vypočítanými priamym derivovaním predpisu funkcie etalónovej plochy $z = z(x, y)$. V ďalšom texte budeme parciálnu deriváciu $\frac{\partial z}{\partial x}(x_0, y_0)$ označovať symbolom z_x a parciálnu deriváciu $\frac{\partial z}{\partial y}(x_0, y_0)$ označovať symbolom z_y .

Materiál a metódy

V príspevku vychádzame z experimentu realizovanom v bakalárskej práci a nadväzujeme naň. Cieľom bakalárskej práce bolo zostaviť ucelený algoritmus automatizovanej tvorby primárnej TIN a výpočtu parciálnych derivácií prvého rádu v jej vrcholoch.

Algoritmus sme verifikovali na predpisom určenej etalónovej ploche. Definičnú funkciu etalónovej plochy sme prevzali z práce [2]. Jej tvar je

$$z = \sum_{r=0}^n \sum_{s=0}^n a_{rs} x^r y^s \quad \text{pre } n = 4. \quad [1.]$$

Geometrickú štruktúru tohto polynómu sme vyšetrovali v intervaloch $\langle x_d = -300m; x_h = 300m \rangle$, $\langle y_d = -200m; y_h = 600m \rangle$, pričom hodnoty koeficientov a_{rs} sú: $a_{04} = a_{13} = a_{14} = a_{22} = a_{24} = a_{31} = a_{40} = a_{41} = a_{42} = 0$, $a_{00} = 150$, $a_{01} = 0,2$, $a_{02} = -1,5 \cdot 10^{-4}$, $a_{03} = -2,0 \cdot 10^{-7}$, $a_{10} = 0,1$, $a_{11} = 1,6 \cdot 10^{-4}$, $a_{12} = -1,2 \cdot 10^{-6}$, $a_{20} = 1,0 \cdot 10^{-4}$, $a_{21} = 3,2 \cdot 10^{-6}$, $a_{23} = 2,0 \cdot 10^{-12}$, $a_{30} = -1,0 \cdot 10^{-6}$, $a_{32} = -1,0 \cdot 10^{-12}$, $a_{33} = -1,0 \cdot 10^{-14}$, $a_{34} = 2,5 \cdot 10^{-17}$, $a_{43} = -5,0 \cdot 10^{-17}$, $a_{44} = -1,0 \cdot 10^{-19}$.

Na takto definovanej etalónovej ploche sme si v stanovených intervaloch vybrali 759 bodov a na základe hodnôt súradníc x , y ich dosadením do vzťahu [1.] vypočítali hodnoty výšok z . Výšky z variujú v intervale $\langle z_d = 38,664m; z_h = 326,974m \rangle$.

V práci porovnáme vypočítané parciálne derivácie zo štyroch nepravidelných trojuholníkových sietí opisujúcich tú istú etalónovú plochu. Všetky trojuholníkové siete sa budú iteratívne generovať z počiatočnej strany tvorenej bodmi s číslami 1 a 4. Na tvorbu

každej z nich zvolíme inú hodnotu kritéria s_{LIM} (limitnej dĺžky strany trojuholníka, ktorá je jedným z parametrov reprezentatívnosti TIN) v poradí $65m$, $66m$, $79m$ a $80m$. Tieto hodnoty sú volené zámerne, aby sme porovnali zmeny presnosti výpočtu parciálnych derivácií jednak medzi podobnými TIN z hľadiska hodnoty s_{LIM} , jednak na základe značne rozdielnych TIN. Treba podotknúť, že pri rôznych hodnotách kritéria s_{LIM} bude využitá vždy iná podmnožina vstupných bodov, z ktorej budú trojuholníkové siete pozostávať.

Parciálne derivácie prvého rádu vo vrchoch TIN určujeme v dvoch krokoch. V prvom kroku vypočítame hodnoty parciálnych derivácií pre každý trojuholník. Každému trojuholníku prislúcha jedna rovina definovaná jeho vrcholovými bodmi A_i , A_j , A_l a parciálne derivácie z_x a z_y nám určujú naklonenie tejto roviny. My budeme parciálne derivácie vzťahovať do ťažiska T trojuholníka.

Trojuholník určený bodmi $A_i(x_i, y_i, z_i)$, $A_j(x_j, y_j, z_j)$, $A_l(x_l, y_l, z_l)$ môžeme vyjadriť v tvare vektorového súčiny

$$v_{ij} \times v_{il} = (A_j - A_i) \times (A_l - A_i) = D_x i + D_y j + D_z k \quad [\text{II.}]$$

vektorov reprezentujúcich strany trojuholníka [3]. Subdeterminanty D_x, D_y, D_z majú tvar

$$D_x = \begin{vmatrix} \Delta y_{ij} & \Delta z_{ij} \\ \Delta y_{il} & \Delta z_{il} \end{vmatrix}, \quad D_y = - \begin{vmatrix} \Delta x_{ij} & \Delta z_{ij} \\ \Delta x_{il} & \Delta z_{il} \end{vmatrix}, \quad D_z = \begin{vmatrix} \Delta x_{ij} & \Delta y_{ij} \\ \Delta x_{il} & \Delta y_{il} \end{vmatrix} \quad [\text{III.}]$$

a okrem významu súradníc vektora normály k rovine trojuholníka sú vstupnými parametrami na výpočet parciálnych derivácií z_x a z_y v ťažisku trojuholníka

$$z_x = -\frac{D_x}{D_z}, \quad z_y = -\frac{D_y}{D_z}. \quad [\text{IV.}]$$

V druhom kroku určíme približné hodnoty parciálnych derivácií vo vrchoch TIN. Majme q trojuholníkov z vnútra trojuholníkovej siete, ktoré majú spoločný vrchol A_i . Priamo zo subdeterminantov, resp. súradníc normálových vektorov $(D_x)_k, (D_y)_k, (D_z)_k$ každého jedného trojuholníka so spoločným vrcholom A_i , kde k nadobúda hodnoty od 1 do q , môžeme určiť približné hodnoty parciálnych derivácií $(z_x)_i^*$ a $(z_y)_i^*$ vo vrchole A_i

$$(z_x)_i^* = -\frac{\sum_{k=1}^q (D_x)_k}{\sum_{k=1}^q (D_z)_k}, \quad (z_y)_i^* = -\frac{\sum_{k=1}^q (D_y)_k}{\sum_{k=1}^q (D_z)_k}. \quad [\text{V.}]$$

Keďže subdeterminanty $(D_x)_k, (D_y)_k, (D_z)_k$ predstavujú súradnice normály k rovine k -teho trojuholníka, pre korektné vyčíslenie vzťahov [V.] je potrebné zabezpečiť, aby mali normály všetkých q trojuholníkov prislúchajúcich každému bodu A_i rovnakú orientáciu.

Následne takto vypočítané hodnoty parciálnych derivácií odpočítame od exaktne

vyčíslených hodnôt určených priamym derivovaním predpisu [I.]. V každom vrchole získame diferencie parciálnych derivácií prvého rádu. Pokiaľ bude hodnota diferencie kladná, parciálna derivácia určená z TIN je menšia ako skutočná hodnota. Pokiaľ bude hodnota diferencie záporná, parciálna derivácia určená z TIN je väčšia ako skutočná hodnota.

Hodnoty diferencií parciálnych derivácií následne podrobíme analýzam. Inšpirujeme sa metódami uvádzanými v práci [4]. Priestorovú diferenciáciu odchýlok parciálnych derivácií zobrazíme v podobe 2,5D modelov. Vypočítame štatistické veličiny priemer, medián, smerodajnú odchýlku a strednú kvadratickú chybu a zostavíme histogramy hustoty pravdepodobností výskytu jednotlivých hodnôt diferencií priradených do intervalov s rozsahom $0,01$.

Výsledky a diskusia

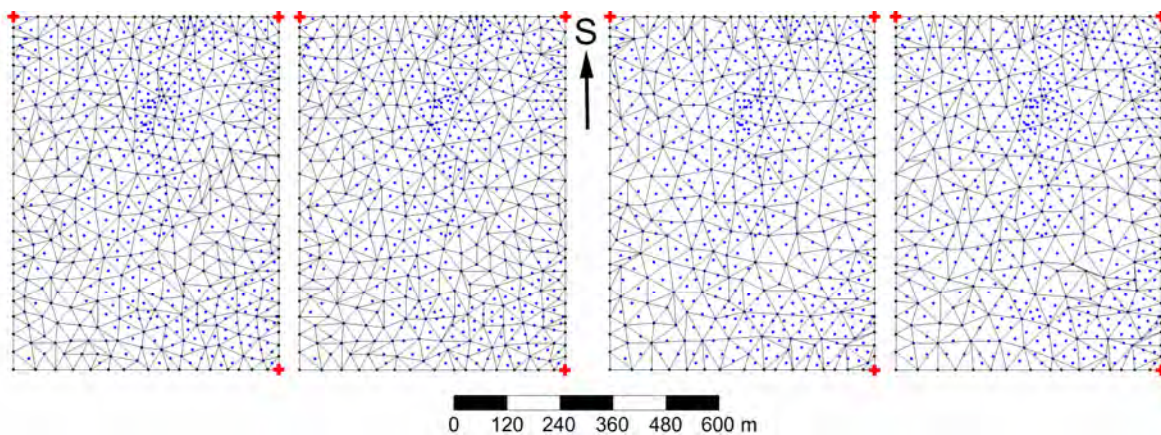
Na základe vstupných parametrov, ktorými boli čísla bodov prvej strany prvého trojuholníka a hodnota kritéria s_{LIM} , boli vygenerované štyri trojuholníkové siete a následne vypočítané a podrobené analýzam parciálne derivácie z_x , z_y .

Tab. 1 Charakteristiky trojuholníkových sietí a parciálnych derivácií

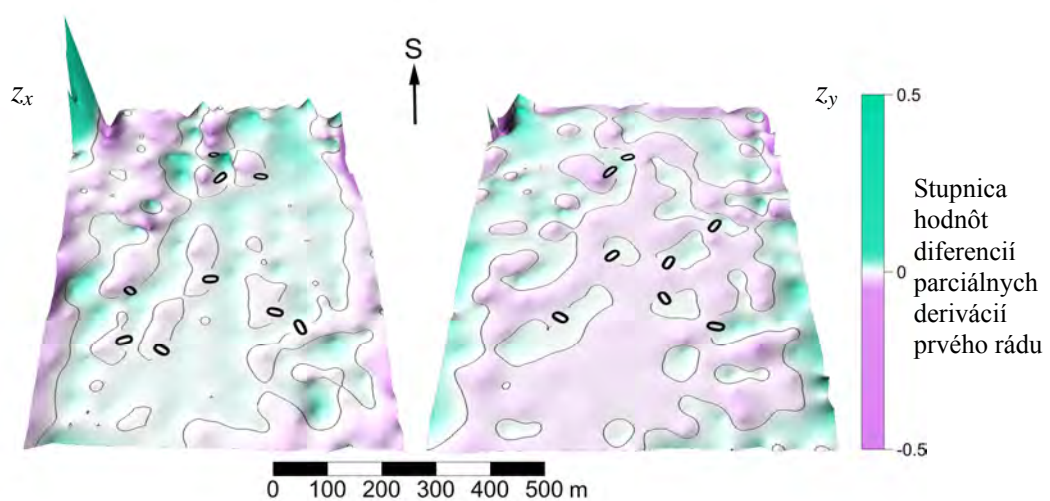
s_{LIM} [m]	65	66	79	80
čísla počiatkových bodov	[1; 4]	[1; 4]	[1; 4]	[1; 4]
počet vrcholov	342	330	238	237
počet trojuholníkov	595	571	387	385
interval variácií z_x vypočítaných z TIN	<-1,158; 0,308>			
interval variácií z_x vypočítaných exaktne	<-1,406; 0,783>			
interval variácií z_y vypočítaných z TIN	<-0,904; 0,667>			
interval variácií z_y vypočítaných exaktne	<-0,976; 0,672>			
interval variácií diferencií z_x	<-0,248; 0,475>	<-0,303; 0,475>	<-0,283; 0,475>	<-0,337; 0,475>
interval variácií diferencií z_y	<-0,223; 0,101>	<-0,183; 0,050>	<-0,223; 0,066>	<-0,279; 0,073>
priemer diferencií z_x	-0,00221	-0,00502	-0,00430	-0,00550
priemer diferencií z_y	-0,00216	-0,00232	-0,00363	-0,00361
medián diferencií z_x	-0,00064	-0,00142	-0,00210	-0,00385
medián diferencií z_y	-0,00056	-0,00011	-0,00081	-0,00158
smerodajná odchýlka diferencií z_x	0,05493	0,05760	0,06976	0,07077
smerodajná odchýlka diferencií z_y	0,02485	0,02445	0,03081	0,03472
stredná kvadratická chyba diferencií z_x	0,05498	0,05782	0,06989	0,07098
stredná kvadratická chyba diferencií z_y	0,02495	0,02456	0,03103	0,03490

Z uvedenej tabuľky je zrejмый trend, podľa ktorého presnosť výpočtu parciálnych derivácií klesá so zvyšujúcou sa hodnotou parametra s_{LIM} . Vidíme, že tento nepriamoúmerný

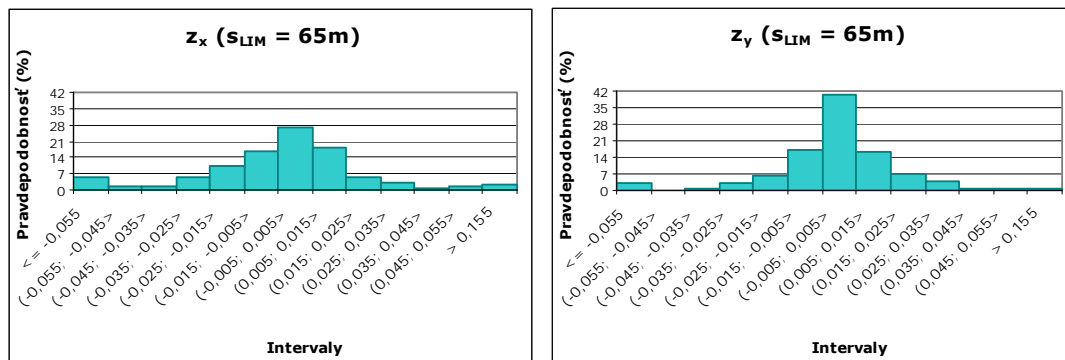
trend platí aj pre počet vrcholov a z nich vytvorených trojuholníkov. Za povšimnutie stoja aj rozsahy intervalov variácií parciálnych derivácií. Tieto intervaly sú totožné pre všetky hodnoty s_{LIM} pri z_x a z_y vypočítaných z TIN aj exaktne. Uvedené hodnoty striedavo prislúchajú trom rohovým bodom trojuholníkovej siete, ktoré sú zobrazené červenou farbou na *obr.1*. Tieto body ležia v miestach s najväčšími sklonmi etalónovej plochy v danom rozsahu, a to priamo súvisí s hodnotami parciálnych derivácií. Na túto skutočnosť nadväzuje aj fakt, že pri intervaloch variácií diferencií z_x je horná hranica intervalu totožná pre všetky TIN. To je spôsobené tým, že rohovým bodom prislúcha vždy len jeden trojuholník, a tak parciálne derivácie v nich sú totožné s parciálnymi deriváciami ťažiska prislúchajúceho trojuholníka a sú zaťažené značnou odchýlkou. Z ostatných štatistických charakteristík vidno, že TIN s $s_{LIM} = 65m$ je najreprezentatívnejšia. V niektorých charakteristikách vyniká TIN s $s_{LIM} = 66m$.



Obr. 1 Vygenerované TIN s rôznymi limitnými hodnotami dĺžok strán (zľava doprava 65m, 66m, 79m, 80m) a rohovými bodmi, v ktorých z_x , z_y dosahujú extrémny



Obr. 2 Blokdigram diferencií parciálnych derivácií z_x , z_y v bodoch prvej TIN ($s_{LIM} = 65m$)



Obr. 3 Histogramy hustoty pravdepodobností intervalov diferencií parciálnych derivácií

Na základe *obr. 3* možno tvrdiť, že rozdelenie pravdepodobností výskytu jednotlivých intervalov diferencií parciálnych derivácií pri TIN s $s_{LIM} = 65m$ sa približuje normálnemu rozdeleniu náhodnej premennej. Podobne to je aj pri ostatných TIN. Na kompenzáciu okrajových extrémnych odchýlok by bolo potrebné navrhnúť optimalizačný algoritmus, ktorý by prekombinoval strany trojuholníkov v okolí bodov s týmito hodnotami, alebo by sa pokúsil upraviť trojuholníkovú sieť zjemňovaním, t.j. pribráním nevyužitých bodov z okolia za vytvorenia nových reprezentatívnejších trojuholníkov.

Záver

Výsledky doterajšieho výskumu nás podnecujú pokračovať ďalej vo vývoji algoritmov na optimalizáciu TIN tvorených iteratívne so zameraním na elimináciu odchýlok hodnôt parciálnych derivácií.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Kalivoda M. (2012) KDMR – Algoritmus automatizovanej tvorby trojuholníkových sietí a priameho výpočtu parciálnych derivácií 1. rádu. (Bakalárska práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava
- [2] Benová A. (2005) Georeliéf a modelovanie jeho geometrickej štruktúry pomocou KDMR. (Dizertačná práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava
- [3] Feciskanin R. (2009) Optimalizácia nepravidelných trojuholníkových sietí pre modelovanie georeliéfu. (Dizertačná práca) Prírodovedecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno
- [4] Iring M. (2010) Hodnotenie presnosti digitálnych výškových modelov. (Diplomová práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava

Predpoklady cestovného ruchu v Strážovských a Súľovských vrchoch

Anton Kasagrand

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra regionálnej geografie ochrany a plánovania krajiny, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko;
kasagrand@fns.uniba.sk*

Abstrakt

Main topic of this article is to characterize assumptions of tourism in selected municipalities of Strážovské and Súľovské vrchy. As first, we set the topic and basically characterize methodology and materials. Then, step by step we define the area, characterize localization and realization assumptions for tourism. The last chapters are conclusion in which we reviewing the plan of entire article and references cited.

Kľúčové slová: *predpoklady cestovného ruchu; Strážovské vrchy; Súľovské vrchy; charakteristika*

Úvod a formulácia cieľa

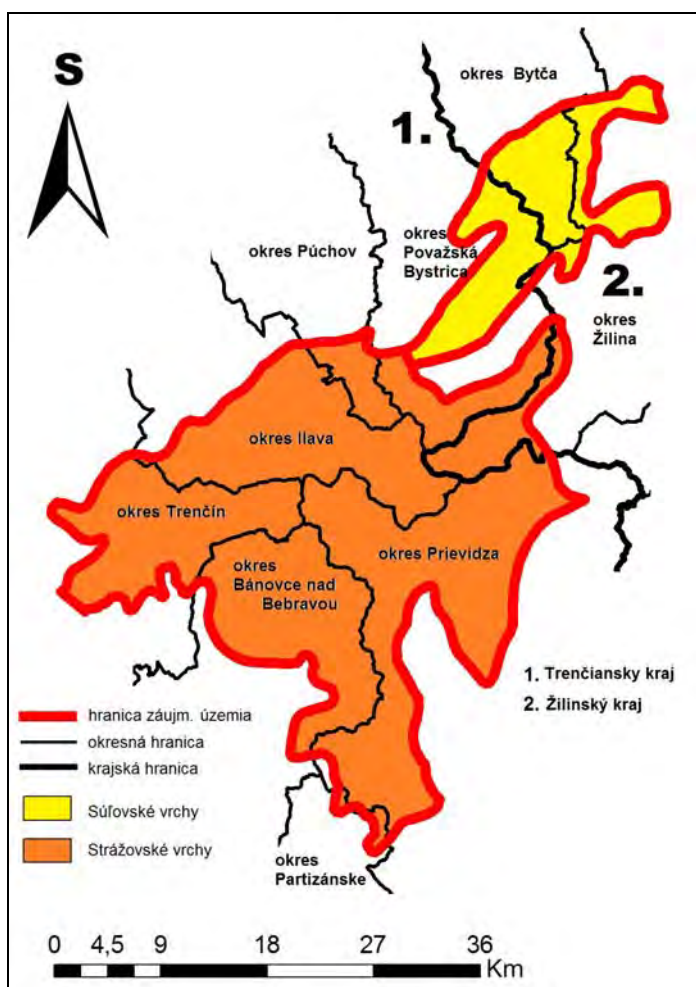
Cestovným ruchom sa v súčasnosti zaoberá mnoho odborníkov z pomedzi geografov (Džupinová, Kulla, Krogmann, Čuka a i.). Je hospodárskym odvetvím, ktorého význam sa v súčasnosti zvyšuje. Plesník [1] dokonca tvrdí, že „cestovný ruch je fenomén, ktorý sa považuje za jedno z najperspektívnejších odvetví hospodárskej činnosti človeka“. Je priamo závislý od prítomnosti lokalizačných, realizačných a selektívnych predpokladov. V príspevku sa budeme zaoberať existenciou a charakteristikou predpokladov cestovného ruchu obcí patriacich do Strážovských a Súľovských vrchov. Po vymedzení územia venujeme pozornosť stručnej charakteristike lokalizačných (prírodných a kultúrno-správnych) a realizačných (komunikačných a materiálno-technickej základni) predpokladov cestovného ruchu.

Materiál a metódy

Východiskom pri stanovení a charakteristike predpokladov cestovného ruchu je prístup a metodológia v zmysle Mariota [2] (Geografia cestovného ruchu, 1983). Podnetné sú pre nás tiež práce od Plesníka [1] (Vymedzenie a ocenenie regiónov cestovného ruchu, 2008) a Čuku [3] (Základy teórie, metodológie a regionalizácie cestovného ruchu, 2011), ktorú v určitom kontexte môžeme podľa autora [3] chápať ako „doplnenie a rozvinutie pôvodnej funkčno-chorologickej paradigmy Mariota“. Uvedené, respektíve citované práce sú pre nás akýmsi metodologickým vzorom, návodom pre kategorizáciu predpokladov cestovného ruchu. Hlavné metódy, ktoré sme pri písaní príspevku použili sú štatisticko-matematické metódy, kartografické metódy, metódy vysvetľujúceho opisu a pod..

Vymedzenie územia

Záujmové územie Súľovských i Strážovských vrchov sa nachádza v severozápadnej časti Slovenska. Leží na území dvoch vyšších územných celkoch (Trenčiansky a Žilinský samosprávny kraj), v ktorých zasahujú do ôsmich okresov - bytčianskeho, ilavského, považskobystrického, púchovského, žilinského, prievidskeho, bánovského a partizánskeho



Obr. 1: Vymedzenie územia
Zdroj: autor, by ArcGIS, 2013

(obr. 1).

Rozloha územia je približne 1100 km². Nadmorská výška je v rozpätí 280 – 1213 m. n. m. (najvyšším bodom je vrch Strážov). Poloha regiónu je vymedzená súradnicami medzi 49° 13' až 48° 45' severnej geografickej šírky a 18° 11' 46" až 18° 41' východnej geografickej dĺžky.

Zo severozápadu a západu susedí vymedzené územie s Javorníkmi a s Bielymi Karpatmi. Severnú hranicu tvoria tiež Javorníky. Východnú od severu až na juh tvorí Žilinská kotlina, Malá Fatra a Hornonitrianska kotlina. Južná hranica územia je tvorená Podunajskou pahorkatinou, spolu s Hornonitrianskou kotlinou.

Najvýznamnejším vodným tokom odvodňujúcim územie je rieka Váh. Ďalšími významnými tokmi sú Rajčianka, Domanižanka, Pružinka, potok Hradné a rieka Tužina odvodňujúca juhovýchodnú časť a vlievajúca sa do Nitry.

Na území sa nachádza 6 národných prírodných rezervácií (NPR Súľovské skaly, NPR Strážov, NPR Vápeč a pod.), spolu s nimi prírodné rezervácie (PR Kostelecká tiesňava, PR Klapy) a prírodné pamiatky (PP Prečínska skalka, PP Bosmany, PP Súľovský hrádok a pod.) vrátane národných kultúrnych pamiatok. Záujmové územie sa nachádza v troch regiónoch cestovného ruchu podľa kategorizácie od Weissa a kol. [4] - Severopovažskom, Hornonitrianskom a v regióne Stredné Považie.

Predpoklady cestovného ruchu

Významnou súčasťou **lokalizačných predpokladov** sú **prírodné predpoklady**. Z ich pohľadu je pre rozvoj cestovného ruchu zásadná vhodná kombinácia *reliéfu, klímy, vodstva a rastlinstva*. Tá následne určuje, akým spôsobom môže byť územie pre takéto účely využívané. Strážovské a Súľovské vrchy sú územím s veľkým rozdielom v nadmorských výškach na pomerne malom území (nadmorská výška v rozpätí 280 – 1213 m. n. m.). Členitý reliéf a klíma územia definuje potenciál, ktorý je vhodný v zime pre rozvoj zimných (lyžovanie, skyalpinizmus, bežkovanie) a v lete pre rozvoj letných (cykloturistika, horolezectvo, turistika a pod.) športov. Estetické vlastnosti územia významne dopĺňa prítomnosť maloplošných chránených území (tab. 1), ktorých je v území až 13. O vzácnosti rastlinstva a živočíšstva územia hovorí vyhlásenie významnej časti územia v roku 1989 za CHKO Strážovské vrchy.

Tab. 1 Maloplošné chránené územia

národné prírodné rezervácie (NPR)	prírodné rezervácie (PR)	prírodné pamiatky (PP)
Súľovské skaly	Kostelecká tiesňava	Bosmany
Manínska tiesňava	Klapy ¹	Prečínska skalka
Strážov		Zliechovský močiar
Podskalský roháč		Súľovský hrádok
Vápeč		Briestenné ¹
Kľak		

Zdroj: [5]

Druhou súčasťou **lokalizačných predpokladov** sú tie **kultúrno-správne**. V území sa nachádza až 99 národných kultúrnych pamiatok (tab. 2). Najviac ich je v Žilinskom okrese (hlavne vďaka obci Čičmany) a okresoch Považská Bystrica a Bytča.

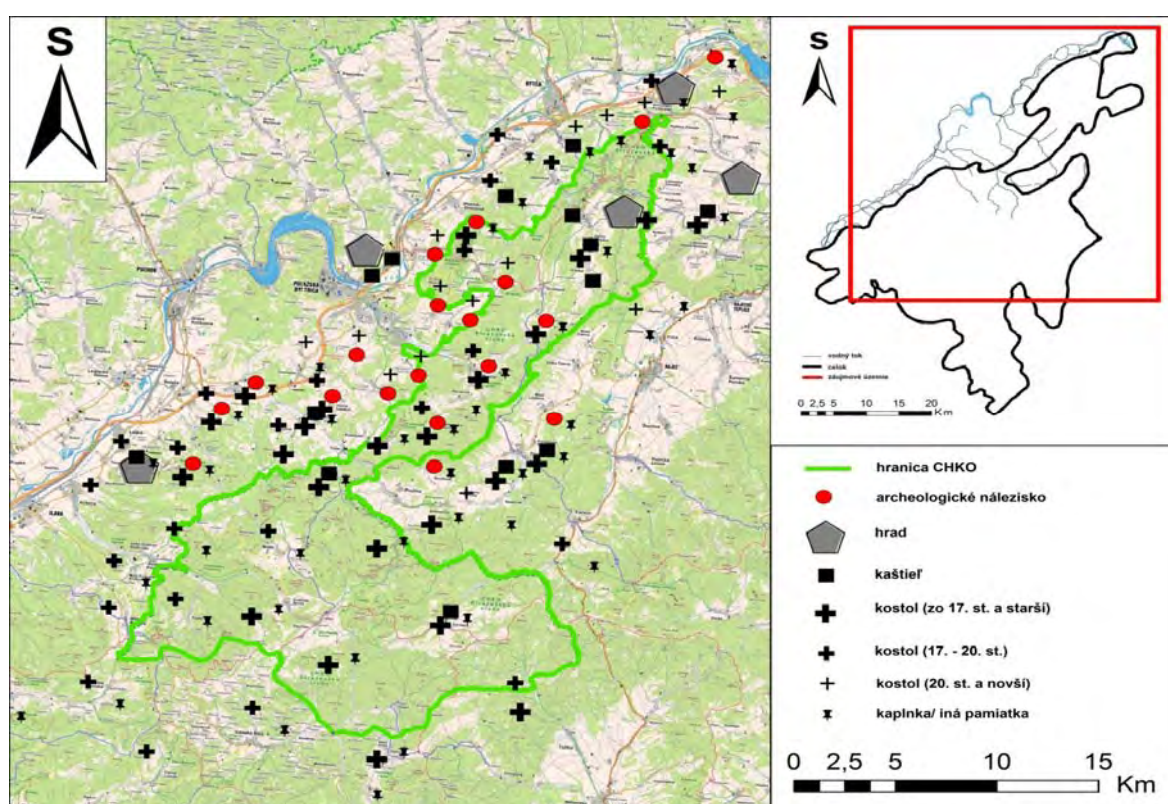
Tab. 2 Zoznam Národných kultúrnych pamiatok (NKP) v záujmovom území

Okres	Počet obcí s NKP	Počet NKP	Typ pamiatky
Trenčín	2	3	kostol, zvonica, socha
Púchov	1	4	mohylník, mohyla, kaplnka, kostol
Prievidza	1	4	socha, kaplnka, kostol
Považská Bystrica	8	20	kostol, socha, hradisko, hrob, škola, pamätný dom, hrad, zvonica, božia muka, pomník
Ilava	4	6	brána, kostol, hrad, pomník, kaštieľ
Žilina	6	42	kostol, dom, dvor, dom s hosp. časťou, hrad pomník
Bytča	5	20	kaštieľ, socha, súsošie, pamätný dom, pam. Tabuľa, pošta, kostol, hrad, hradisko, zvonica, park, kaplnka

Zdroj: [6]

Podľa Krogmanna [7] sú „*kultúrno-správne predpoklady často chápané iba ako faktory komplementárne k prírodným predpokladom*“. Dôležitým faktom však zostáva, že sa

významným spôsobom podieľajú na estetike územia a zvyšujú jeho celkovú atraktivitu. Ak je možné ich prítomnosť spojiť tematickou trasou (napr. sakrálna cesta, renesančná cesta a pod.) môže ich význam výrazne stúpnuť a podieľať sa na tzv. poznávacom cestovnom ruchu. V území sa nachádza niekoľko nádherných zrúcanín hradov (Lietava, Hričov, Súľov, Považský hrad, Košeca; obr. 2), kaštieľov (Čičmany, Hrabové, Domaniža, Dolný Lieskov a i.), starých kostolov (Súľov-Hradná, Čičmany, Pružina, Prečín a i.), archeologických nálezísk (Sverepec, Bosmany, Lieskov, Podmalenica, Klapé a i., obr. 2), rodných, či pamätných domov – Predmier (J. I. Bajza), Domaniža (D. Tatarka), Kostelec (P. Jilemnický) a i.. V regióne je lokalizovaných aj množstvo ďalších kultúrno-správnych predpokladov, ako kaplnky, kalvárie a pod., ktoré sa podieľajú na atraktivite územia.



Obr. 2 Kultúrno-správne predpoklady v záujmovom území

Zdroj: autor by ArcGIS 9,3, podklad [8]

Významnou súčasťou **realizačných predpokladov** sú **komunikačné predpoklady**. Tie sú pre rozvoj cestovného ruchu zásadné hlavne z hľadiska dostupnosti. Ich neprítomnosť totiž neumožňuje potenciálnemu návštevníkovi vôbec sa do územia dostať. Strážovské a Súľovské vrchy majú pomerne výhodnú dopravnú polohu (obr. 3). Nachádzajú sa v severozápadnej časti Slovenska a ich východná strana lemuje diaľnicu D1 na úseku Trenčín - Žilina. Rovnakou stranou vedie aj hlavná železničná trať v smere Bratislava – Žilina –

¹ Prírodná pamiatka, respektíve prírodná rezervácia sa nachádza mimo hraníc CHKO Strážovské vrchy

Košice. Priamo územím vedú cesty I. (E 50, E64) a II. triedy (E 517, E 574, obr. 3). Územie je s využitím cestnej siete dostupné zo všetkých smerov.



Obr. 3 Dopravná poloha záujmového územia
Zdroj: [9], upravil autor by ArcGIS 9.3, 2013

Diaľkové, prípadne medzimestské autobusové spojenie vedie územím v troch hlavných smeroch a to Považská Bystrica – Rajec, Rajec – Prievidza a Rajec – Ilava. Železničná trať priamo územím nevedie – výnimku tvoria zanedbateľné časti severného cípu Súľovských a juhovýchodná časť Strážovských vrchov.

Materiálno-technická základňa je druhou významnou súčasťou **realizačných predpokladov**. Tá je pre cestovný ruch zásadná z ďalšieho významného dôvodu – udržiava návštevníka v mieste jeho uskutočňovania. Mariot [2] ju vnútorne člení na ubytovacie zariadenia, stravovacie a zábavné zariadenia, dopravné zariadenia a iné zariadenia MTZ. Ich prítomnosť v študovanom území udáva tabuľka 3. Počet dopravných zariadení ako aj iné zariadenia MTZ sa nám nepodarilo identifikovať absolútnym číslom – ich počet sa totiž veľmi ťažko kvantifikuje a relatívne často mení.

Tab. 3 Počet stravovacích a zábavných zariadení v záujmovom území

Počet obcí a typ materiálno-technickej základne		
počet obcí (bez miest)	počet stravovacích zariadení	počet zábavných zariadení
53	33	10

Zdroj: vlastný výskum, 2013

Potenciálom pre vytvorenie zázemia pre cestovný ruch disponuje viac obcí – Čičmany, Pružina, Domaníža, Prečín, Súľov - Hradná, Valaská Belá, Mojtín, Zliechov a i.. Ich presná špecifikácia by si však vyžadovala väčší priestor a budeme sa jej venovať v

budúcnosti.

Záver

V príspevku sme sa snažili charakterizovať predpoklady cestovného ruchu v Strážovských a Súľovských vrchoch. Postupne sme si vymedzili územie a charakterizovali lokalizačné a realizačné predpoklady. Územie disponuje výnimočnými prírodnými a kultúrno-správnymi predpokladmi, ktoré môžu byť pri správnej implementácii „mäkkých faktorov“ a vhodného dobudovania realizačných predpokladov (hlavne materiálno-technickej základne a dopravných a iných zariadeniach MTZ), pre budúci rozvoj územia prostredníctvom cestovného ruchu kľúčové.

PodĎakovanie

Príspevok bol spracovaný v rámci riešenia projektu VEGA 1/1143/12 Regióny: vývoj, transformácia a regionálna diferenciácia.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Plesník P. (2008) Vymedzenie a ocenenie regiónov cestovného ruchu. Ekonomická univerzita v Bratislave: EKONÓM, Bratislava, SR, p. 81
- [2] Mariot P. (1983) Geografia cestovného ruchu. 1.vyd. Slovenská akadémia vied, Bratislava, SR, p. 252
- [3] Čuka P. (2011) Základy teórie, metodológie a regionalizácie cestovného ruchu. Prešovská univerzita v Prešove, Vydavateľstvo PU, Prešov, SR, p. 93
- [4] Weiss a kol. (2005) Regionalizácia cestovného ruchu v Slovenskej republike. Ministerstvo Hospodárstva SR (odbor Cestovného ruchu). Bratislava, SR, p. 90
- [5] Chránená krajinná oblasť Strážovské vrchy [Citované: 1. február 2013]
< <http://www.sopsr.sk/strazovskevrchyweb/maloplosky.html>>
- [6] Pamiatkový úrad Slovenskej republiky [Citované: 15. február 2013]
<<http://www.pamiatky.sk/sk/page/evidencia-narodnych-kulturnych-pamiatok>>
- [7] Krogmann A. (2006) Problematika kultúrno-správnych predpokladov a ich delimitácie v geografickej literatúre. Nitra: UKF, In: GEO Information 3, p. 44
- [8] Turistická mapa.sk [Citované: 17. február 2013]
< <http://mapy.hiking.sk/?ref=navigator>>
- [9] Slovenská správa ciest [Citované: 20. február 2013]
< http://www.cdb.sk/files/img/zakladne-mapy-cs/tahy/tahy_e.jpg>

Vplyv hospodárskej krízy na stav priamych zahraničných investícií a mieru evidovanej nezamestnanosti v okresoch Trenčianskeho kraja

Róbert Hamada, Anton Kasagrandá

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra regionálnej geografie ochrany a plánovania krajiny, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko; e-mail: hamada@fns.uniba.sk

Abstrakt

Foreign direct investment and registered unemployment rate are in Slovakia some of the most important factors of development in regions. They are also indicators for measuring regional disparities. Foreign direct investment contribute to the reconstruction and development of industry, agriculture, trade, build infrastructure, create new jobs and increase the stability of the economy. The aim of this paper is to present the impact of the economic crisis on the state of foreign direct investment and the registered unemployment rate in counties of Trenčin Region from 2003 to 2010.

Kľúčové slová: *priame zahraničné investície; miera evidovanej nezamestnanosti; hospodárska kríza; Trenčiansky kraj; okresy*

Úvod a formulácia cieľa

Pre Slovensko ako člena Európskej únie (ďalej len „EÚ“) je veľmi dôležité, aby jednotlivé regióny Slovenska boli dostatočne konkurencieschopné a hospodársky silné v porovnaní s ostatnými ekonomicky rozvinutejšími regiónmi EÚ. Práve zabezpečenie rastu a rozvoja regiónov predstavuje jednu z najdiskutovanejších tém v jednotlivých štátoch Európy ako aj na pôde samotnej Európskej únie. Preto je dôležité zameriavať sa na podmienky, resp. faktory podmieňujúce všestranný rozvoj regiónov, zvyšovanie jeho atraktivity a konkurencieschopnosti [1]. V príspevku sme sa zamerali na vplyv hospodárskej krízy na stav priamych zahraničných investícií (ďalej len „PZI“) a miery evidovanej nezamestnanosti, ako hlavných faktorov regionálneho rozvoja regiónov, v okresoch Trenčianskeho kraja v rokoch 2003 - 2010.

Materiál a metódy

Pri spracovaní príspevku bola použitá kabinetná metóda, metóda analýzy odborného textu a následne syntéza. Pre zreteľnejšiu prezentáciu výsledkov v čase a priestore bola uplatnená štatistická metóda. Vychádzali sme z údajov o stave PZI a miere evidovanej nezamestnanosti v rokoch 2003 - 2010. Zo štatistických údajov boli použité oficiálne štatistické dáta Národnej banky Slovenska (NBS) ako aj dáta Štatistického úradu Slovenskej republiky - databázy RegDat (2013) na úrovni regiónov NUTS 3 (kraje) a NUTS 4 (okresy).

Výsledky a diskusia

PZI vyvolávajú množstvo efektov vo svojom regióne a sú impulzom ekonomického rozvoja. Medzi kľúčové sa v tejto súvislosti zaraďuje prílev voľných finančných zdrojov (kapitálu), spillover efekty, čiže „presakovanie“ vyspelých technologických a manažérskych postupov zo zahraničných firiem do domácich podnikov, môžu taktiež pozitívne ovplyvniť inštitucionálny systém v danej ekonomike a celkové podnikateľské prostredie a zvýšená investičná aktivita, dáva šancu uplatniť sa ďalším domácim spoločnostiam [2]. Zahraničný kapitál zvyšuje podstatným spôsobom tvorbu hrubého fixného kapitálu v regiónoch a môže sprostredkovať aj zvyšovanie technologickej úrovne produkcie v regióne [3].

PZI predstavujú kategóriu medzinárodných investícií, ktorá vyjadruje zámer subjektu, ktorý je rezidentom jednej ekonomiky, získať trvalý podiel v podniku so sídlom v inej ekonomike. Trvalý podiel vyjadruje existenciu dlhodobého vzťahu medzi priamym investorom a podnikom priamej investície a významný stupeň vplyvu na riadenie podniku. Pri určovaní existencie vzťahu priamej investície sa v súlade s medzinárodnými štandardami používa – kritérium 10 % podielu na základnom kapitáli alebo hlasovacích právach podniku [4]. PZI v SR a investíciami Slovenska v zahraničí sa rozumie prírastok majetkového kapitálu a reinvestovaného zisku, plynúceho zo zahraničia alebo do zahraničia, vo forme finančného alebo hmotného vkladu [5].

Stav PZI dobre dokumentuje investičnú atraktivitu jednotlivých regiónov Slovenskej republiky a pozitívne ovplyvňuje ich rozvojovú dynamiku. Ich význam je aj v stimulácii rozvoja regionálnej resp. lokálnej podnikateľskej sféry v podobe subdodávateľských vzťahov. Vývoj výšky a stavu PZI v okresoch Trenčianskeho kraja môžeme rozdeliť do dvoch časových období (tab. 1) - pred a po začatí hospodárskej krízy, teda do roku 2008, kedy sa o hospodárskej kríze vo svete začína oficiálne hovoriť a po ňom, kedy sa dôsledky hospodárskej krízy začínajú významne dotýkať i Slovenskej ekonomiky. Pred rokom 2009 sa tempo rastu PZI oproti predchádzajúcemu obdobiu výrazne spomalilo (tab.1). Toto „rozdelenie“ sa nedotýka výlučne Trenčianskeho kraja, ale i celej Slovenskej republiky, kde je všeobecne známe, že v roku 2008 sa trend zrýchľovania výkonnosti ekonomiky Slovenska prerušil v dôsledku globálnej hospodárskej krízy.

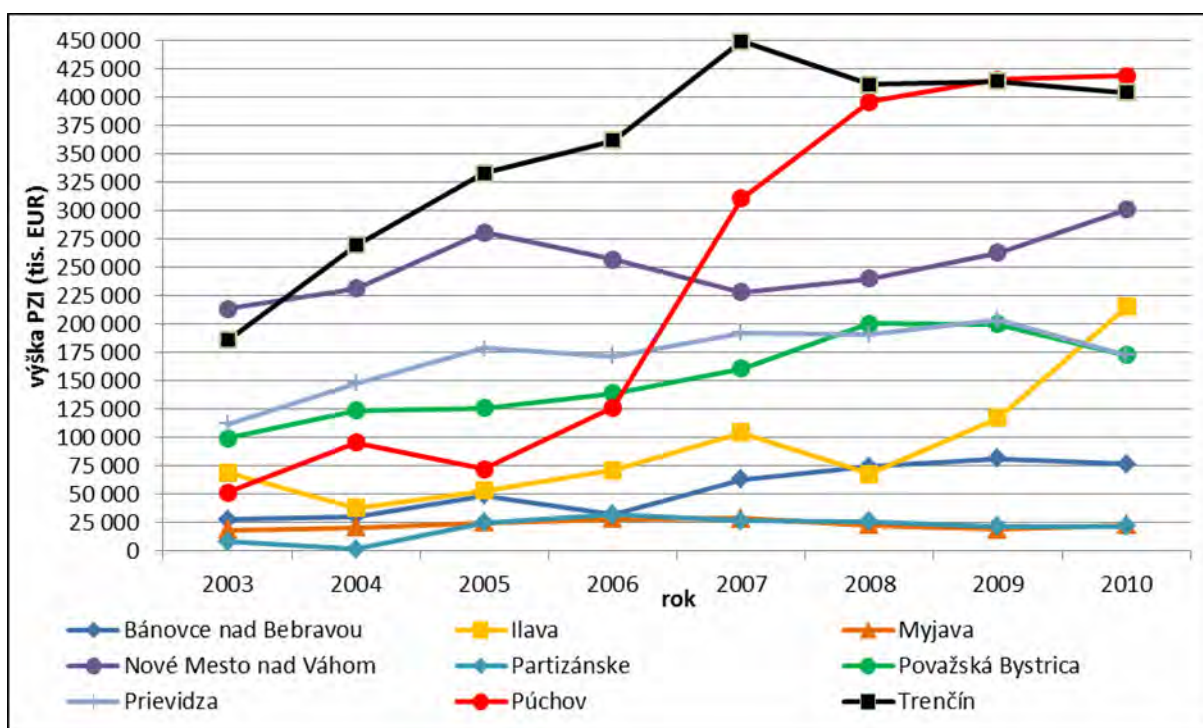
Okresy Trenčianskeho kraja zaznamenávajú maximálne výšky PZI v dvoch obdobiach, tesne pred začiatkom hospodárskej krízy – v roku 2006 (Partizánske), 2007 (Myjava, Trenčín) a 2008 (Považská Bystrica) a následne po vypuknutí krízy v roku 2009 (Bánovce nad Bebravou, Prievidza) a 2010 (Ilava, Nové Mesto nad Váhom, Púchov) (tab. 1). V tomto prípade je pozitívne, že k znižovaniu PZI dochádza v posledných troch rokoch

(2008 - 2010) len v okrese Partizánske (obr. 1). V okresoch Ilava, Nové Mesto nad Váhom a Púchov naopak, v porovnaní s ostatnými okresmi Trenčianskeho kraja, dochádza k výraznému rastu PZI z dôvodu budovania premyslených zón a príchodu väčšieho množstva investorov. V ostatných okresoch (Bánovce nad Bebravou, Myjava, Považská Bystrica, Prievidza, Trenčín) dochádza v rokoch 2008 - 2010 skôr k stagnovaniu výšky PZI.

Tab. 1: Výška priamych zahraničných investícií v okresoch Trenčianskeho kraja v rokoch 2003 – 2010

Okres/ rok (v tis. EUR)	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Bánovce nad Bebravou	27 653	29 869	48 505	31 814	62 663	74 136	81 072	76 170
Ilava	68 721	37 534	53 150	70 656	104 237	67 592	117 000	215 018
Myjava	18 288	20 111	24 932	27 801	28 234	22 606	18 898	22 351
Nové Mesto nad Váhom	213 621	231 097	280 949	256 701	228 088	240 113	262 800	300 991
Partizánske	7 738	1 104	24 521	31 579	26 346	26 008	21 600	21 369
Považská Bystrica	99 224	123 628	125 854	138 741	160 783	200 537	200 029	172 476
Prievidza	111 873	147 762	178 413	171 676	192 355	190 257	203 518	172 483
Púchov	51 170	95 519	72 119	126 562	310 916	395 955	415 890	419 099
Trenčín	185 813	269 503	332 988	361 783	449 372	411 272	414 106	403 974

Zdroj: [6]



Obr. 1: Výška priamych zahraničných investícií v okresoch Trenčianskeho kraja v rokoch 2003 - 2010

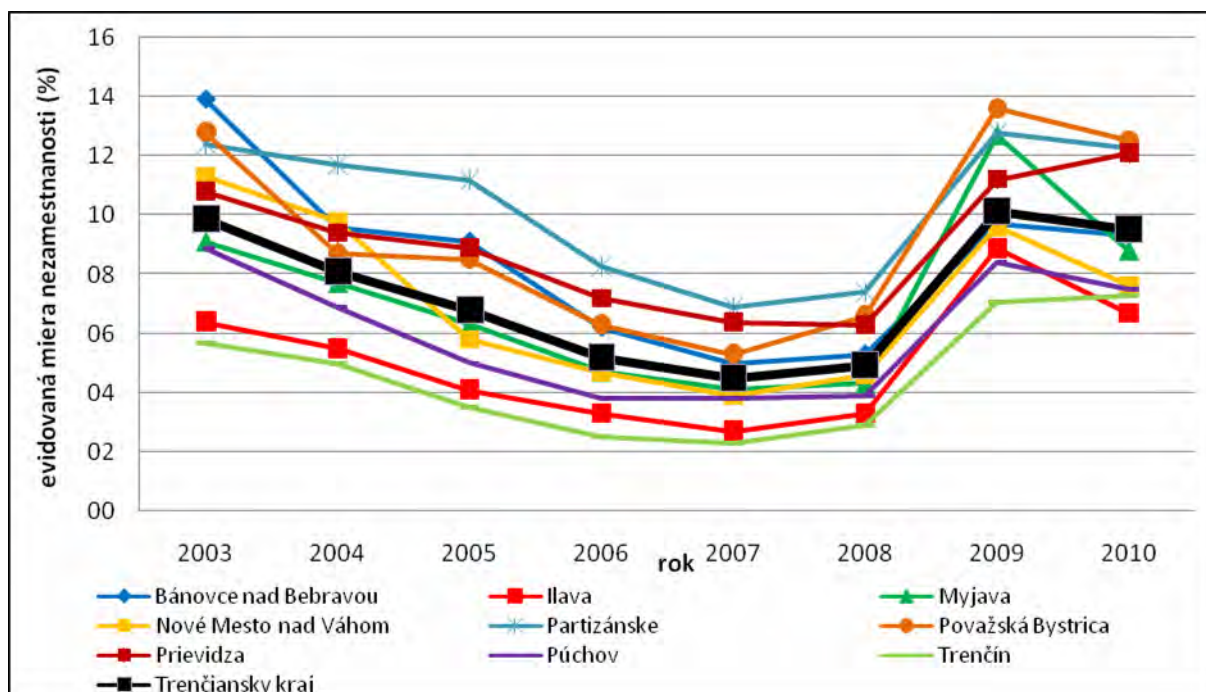
Zdroj: [6]

Na vzťah hospodárskej krízy, PZI a miery evidovanej nezamestnanosti vo svojom príspevku „Priame zahraničné investície ako faktor znižovania regionálnej nezamestnanosti“ poukazuje Novák [7]. Autor tvrdí, že „viaceré spoločnosti v slovenských regiónoch museli

pristúpiť k hromadnému prepúšťaniu, či prinajmenšom k znižovaniu počtu svojich zamestnancov. Tí slabší, ktorí nedokázali „prežiť“ stroskotali. Miera nezamestnanosti vykazuje enormné hodnoty. Ťažko zhodnotiť, či to najhoršie obdobie už máme za sebou, alebo nás ešte očakávajú dozvuky tejto celosvetovej „búrky“. Autor [7] tvrdí, že „zahraniční investori sú hnacím motorom pre rozvoj regiónov a v spolupráci s vládou by mohli dopady hospodárskej krízy na ekonomiku a mieru nezamestnanosti čiastočne eliminovať“.

PZI sú jedným z významných determinantov hospodárskeho rastu súčasnej doby. Považujú sa za jeden z najdôležitejších katalyzátorov ekonomického rozvoja. U verejnosti sú často zjednodušované ako **hlavný faktor vytvárania pracovných miest** [8].

Rajčáková, Švecová [9] hovoria, že „hlavnou príčinou rastu nezamestnanosti v súčasnom období je vplyv svetovej finančnej krízy, ktorá spôsobila pokles dynamiky ekonomického rastu a pokles efektívnej výkonnosti slovenského hospodárstva“. Podľa Lauka, Križana a Gurňáka [10] „možno nezamestnanosť považovať za jeden zo základných indikátorov regionálneho rozvoja a disparít. Preto riešenie tejto problematiky možno pokladať v kontexte regionálneho rozvoja za fundamentálne. V súčasnosti, v čase globálnych ekonomických problémov alebo hospodárskych diverzií a internacionálnych (ne)systémových opatrení sa riešenie témy nezamestnanosti javí ako vysoko aktuálne“.



Obr. 2: Vývoj miery evidovanej nezamestnanosti v okresoch Trenčianskeho kraja v rokoch 2003 - 2010

Zdroj: [11]

Určitý vzťah PZI a miery evidovanej nezamestnanosti možno nájsť aj v predkladanom príspevku. S hospodárskou krízou prišlo k ustáleniu výšky PZI. V období rokov 2003 – 2008

dochádza k výraznému znižovaniu nezamestnanosti a súčasne zvyšovaniu PZI (pozri obr. 1 a obr. 2). Od roku 2008, kedy došlo v mnohých okresoch k zníženiu tempa rastu PZI oproti predchádzajúcim rokom, zaznamenávame i výrazný nárast v miere evidovanej nezamestnanosti. V okresoch Ilava, Nové Mesto nad Váhom a Púchov (r. 2008 - 2010 rast PZI) dochádza v roku 2010 k najvýraznejšiemu poklesu miery evidovanej nezamestnanosti v porovnaní s rokom 2009. Kríza má vplyv na štruktúru hospodárstva, podnikateľský sektor, mení sa intenzita odbytu a odberateľsko-dodávateľských vzťahov. Znižuje sa kúpyschopnosť obyvateľov a dopyt po tovaroch a službách klesá. Firmy pre nízky dopyt šetria, čo sa prejavuje v prepúšťaní zamestnancov a zvyšovaní miery nezamestnanosti (pozri napr. [12]).

Záver

PZI a miera evidovanej nezamestnanosti výrazným spôsobom determinujú regionálny rozvoj regiónov, konkurencieschopnosť ako i celkovú hospodársku kondíciu regiónov. Vďaka týmto skutočnostiam je pozitívny vývoj PZI ako aj miery evidovanej nezamestnanosti pre územie Slovenska nesmierne dôležité. V roku 2008 začala globálna hospodárska kríza, ktorá sa u nás naplno prejavila až v roku 2009. Dokumentuje to aj stav PZI v okresoch Trenčianskeho kraja, ktorý od roku 2008 v porovnaní s predchádzajúcim obdobím začal stagnovať. Tento stav dokumentuje, že hospodárka kríza nemala až taký obrovský dopad na stav PZI v okresoch Trenčianskeho kraja ako sme si možno mysleli. Viditeľné je len spomalenie nastoleného rastu PZI v okresoch, s výnimkou Púchova, Nového Mesta nad Váhom a Ilavy, kde PZI po vypuknutí hospodárskej krízy rástli. Odlišne sa správa miera evidovanej nezamestnanosti, ktorá začala od roku 2009 vo všetkých okresoch Trenčianskeho kraja výrazne stúpať. Aj keď začala miera evidovanej nezamestnanosti v okresoch Trenčianskeho kraja v roku 2010 pozvoľne klesať (okrem okresu Trenčín a Prievidza), trvanie krízy je stále veľkou neznámou a oživenie prílevu PZI resp. znižovanie miery evidovanej nezamestnanosti nemožno do budúcnosti dokázať ani nijak podložiť. Všetko závisí od situácie krajín v EÚ. Slovensko ako člen EÚ je silno naviazané na európsky trh, zahraničný kapitál, dodávateľsko-odberateľské vzťahy, export a pod.. Od týchto indikátorov sa bude odvíjať výška PZI, ako aj množstvo pracovných miest, či miera nezamestnanosti v regiónoch SR.

PodĎakovanie

Príspevok je súčasťou riešenia grantového projektu VEGA č. 1/1143/12 Regióny: vývoj, transformácia a regionálna diferenciácia.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Hamada R. (2012) Študentská vedecká konferencia 2012, Geografická sekcia. Priemysel ako kľúčový determinant regionálneho rozvoja okresu Hlohovec, Bratislava, SR, p. 1295
- [2] Minarčík P. (2009) *Acta Geographica Universitatis Comenianae* 53, p. 97
- [3] Měrtlová L. (2012) XV. mezinárodní kolokvium o regionálních vědách: Valtice, 20. - 22. června 2012. Brno: MU, ČR, p. 81
- [4] OECD (2013) Foreign direct investment. In *OECD Factbook 2013: Economic, Environmental and Social Statistics*, OECD Publishing. [Citované: 28. január 2013] <<http://dx.doi.org/10.1787/factbook-2013-34-en>>
- [5] Michaeli E., Matlovič R., Ištók R., Klamár R., Hofierka J., Mintálová T., Mitříková J. (2010) *Regionálny rozvoj pre geografov*. Prešovská univerzita v Prešove, Prešov, SR, p. 717
- [6] Priame zahraničné investície. NBS Bratislava, 2003-2010, [Citované: 04. marec 2013] <<http://www.nbs.sk/sk/statisticke-udaje/statistika-platobnej-bilancie/priame-zahranicne-investicie>>
- [7] Novák M. (2012) *Finančné trhy [elektronický zdroj]: odborný mesačník pre teóriu a prax finančných trhov*. Bratislava. číslo: október 2012. [Citované: 05. marec 2013] <http://www.derivat.sk/files/casopis%202012/2012_Okt_M.Novak_PZI.pdf>
- [8] Hudec O. a kol. (2009) *Podoby regionálneho a miestneho rozvoja*. Ekonomická fakulta Technickej univerzity v Košiciach, Košice, SR, p. 344
- [9] Rajčáková E., Švecová A. (2010) 13th International Colloquium on Regional Sciences.: Masarykova Univerzita, Brno, ČR, p. 118
- [10] Lauko V., Križan F., Gurňák D. (2009) XII. mezinárodní kolokvium o regionálních vědách. Masarykova univerzita, Brno, ČR, p. 58
- [11] Databáza regionálnej štatistiky (RegDat). In Štatistický úrad SR [Citované: 3. februára 2013] <<http://pxweb.statistics.sk/pxwebslovak/index.htm>>
- [12] Hamada R., Kasagrandá A. (2012) *Geographia Cassoviensis* 6(2), Univerzita P. J. Šafárika v Košiciach, Košice, SR, p. 28

Vzťah rozloženia snehovej pokrývky a morfometrických parametrov reliéfu vo vybranej časti Žiarskej doliny 27.1.2013

Pavel Krajčí

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyzickej geografie a geoekológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko;
krajci.palo@gmail.com*

Abstrakt

The spatial and temporal distribution of snow accumulation is complex problem and significantly influences the hydrological characteristics of mountain catchments and it is a significant part of hydrological and energy balance. This study is focused on dependency between distribution of snow cover and morphometric parameters of relief in selected part of Žiarska valley. Snow depth measurements were taken 27.1.2013 at 30 points. Morphometric parameters were calculated for all 30 points and compared with snow depth. Application of non-linear regression showed the strongest relation between tangential curvature and snow depth.

KLúčové slová: *snehová pokrývka; morfometria; GIS; nad hornou hranicou lesa*

Úvod a formulácia cieľa

V tomto článku by sme sa chceli upriamiť hlavne na priestorovú diferenciáciu výšky snehovej pokrývky v území so zložitým reliéfom nad hornou hranicou lesa.

Numericky vyčíslit' množstvo transportovaného snehu a určiť miesto jeho akumulácie je veľmi náročná úloha. Transport snehu totiž ovplyvňuje množstvo faktorov počínajúc morfometrickými vlastnosťami reliéfu, ktoré sa v relevantnom čase nemenia, až po meteorologické faktory, ktoré sa môžu meniť vo veľmi krátkych časových intervaloch. Napriek zložitosti tohto problému, je potrebné snažiť sa tieto zákonitosti odhaliť.

Rozmiestnenie snehovej pokrývky, jej trvanie a tiež veľkosť územia pokrytého snehom sú totiž významnými parametrami z hľadiska hydrologickej a energetickej bilancie zeme a sú nutnosťou pri predpovedi odtoku zo snehovej pokrývky. Vzhľadom na to, že počas zimného obdobia sa môže v horských povodiach akumulovať veľké množstvo vody vo forme snehu, je z vodohospodárskeho hľadiska potrebné, čo najpresnejšie odhadovať tieto zásoby. Dostatok či nedostatok vody z topiacej sa snehovej pokrývky môže do veľkej miery ovplyvňovať poľnohospodárstvo, či výrobu elektrickej energie. Pri rýchlom a intenzívnom topení môžu dokonca vzniknúť povodne z topiaceho sa snehu.

Snehová pokrývka zasahuje významne aj do globálneho klimatického systému a to hlavne do radiačnej bilancie zemského povrchu, predovšetkým svojím vysokým albedom.

Akumulácia a prenos snehu je tiež významným faktorom pri predpovedi stupňa lavínového nebezpečenstva. Počas poveternostnej situácie, keď je transportované veľké

množstvo snehu a snehová pokrývka nie je rovnomerne rozmiestnená, môže lavínové riziko výrazne stúpnuť.

Cieľom tohto článku je teda kvantifikovať závislosť výšky snehovej pokrývky na jednotlivých morfometrických parametroch reliéfu 27.1.2013.

Materiál a metódy

Rozmiestnením snehovej pokrývky sa v posledných rokoch zaoberá niekoľko pracovísk. Predovšetkým v horských oblastiach nad hornou hranicou lesa však tento problém stále nie je jednoznačne doriešený v dôsledku toho, že tu vstupuje veľké množstvo ovplyvňujúcich faktorov.

Touto problematikou sa zaoberali viacerí autori ako napríklad Elder a kol. [1]. Molotch et al. [2] modelujú rozmiestnenie snehovej pokrývky metódou rozhodovacích stromov, no zamerali sa aj na vplyv kvality rôznych digitálnych výškových modelov na kvalitu výsledkov. V článku autorov López-Moreno, Nogués-Bravo [3] autori porovnávajú lokálne (Inverse distance Weighted IDW, spline), geoštatistické (cokriging, ordinary kriging) a globálne metódy (regresných stromov, lineárnej regresie a generalized additive models GAM metódy) pri interpolácii výšky snehovej pokrývky v španielskej časti Pyrenej. Najkvalitnejšie výsledky boli dosiahnuté použitím globálnych metód. Metóda nelineárnej regresie, ktorú sme použili my v tejto práci, patrí tiež medzi globálne metódy.

Skúmané územie sa nachádza v severovýchodnej časti Žiarskej doliny v Západných Tatrách, ktorá sa nazýva Malé Závraty. Podľa geomorfologického členenia SSR *Mazúr, Lukniš* [4] sa toto územie nachádza vo Fatransko-Tatranskej oblasti, v celku Tatry, podcelku Západné Tatry. V rámci Západných Tatier je to časť Liptovské Tatry. Skúmané územie je ohraničené vrcholmi Prostredný Grúň (1870 m n.m.), Nohavica (2047 m n.m.), Plačlivé (2125 m n.m.) a hrebeňom tiahnucim sa od Žiarskeho sedla (1917 m n.m.) na Smrek (2072 m n.m.). Rozloha skúmaného územia je 1,38 km². Výškový rozdiel je 574 m. Najnižší bod je v nadmorskej výške 1551 m n. m. Najvyšším bodom je vrchol Plačlivého.

Ako podklad všetkých analýz slúži digitálny model reliéfu (DMR) ktorý sme získali z topografickej mapy 1:10000. Digitalizáciou tejto mapy sme vytvorili vektorovú vrstvu vrstevníc s priradeným atribútom nadmorskej výšky, ktorú sme následne previedli na bodovú vrstvu. Každý bod nadobudol hodnotu nadmorskej výšky. DMR sme interpolovali z tejto bodovej vrstvy v programe Grass GIS, pomocou modulu v.surf.rst s hodnotami tenzie 65. Z výslednej vrstvy sme vypočítali aj mapy sklonu, orientácie, horizontálnej a vertikálnej krivosti reliéfu taktiež v module v.surf.rst.

Z našej analýzy boli vynechané územia s reliéfom skalných stien, pretože na týchto plochách sa výraznejšie snehová pokrývka neakumuluje a tiež bola presnosť topografickej mapy na týchto plochách najnižšia.

Výskumné body boli rozmiestnené, tak aby čo najlepšie reprezentovali georeliéf daného územia. Výskumné body museli byť rozmiestnené aj s ohľadom na dostupnosť a so zreteľom na výskyt lavín v danom území.

Terénne práce prebiehali od septembra 2012, kedy sme uskutočnili rekognoskáciu územia. V priebehu nasledujúcich dvoch mesiacov sme osadili 27 nových výskumných bodov, ako jeden výskumný bod bola použitá snehomerná lata HZS a ako štyri body boli použité tyče zo zimného značenie turistického chodníka do Žiarskeho sedla, na ktoré bola doplnená stupnica. Výskumné body sme zamerali GPS prístrojom s presnosťou do 1m. Následne sme každému bodu priradili hodnoty morfometrických parametrov v programe ArcGIS nástrojom *Extract Multi Values to Points*.

Na základe nelineárnej regresnej analýzy medzi tangenciálnou krivosťou georeliéfu a výškou snehovej pokrývky sme získali rovnicu regresie zobrazenú na obr. 1. Túto rovnicu sme využili pomocou nástroja *Raster Calculator* v programe ArcGIS a extrapolovali výšku snehovej pokrývky do pristoru. Výsledkom je mapa na obr. 2.

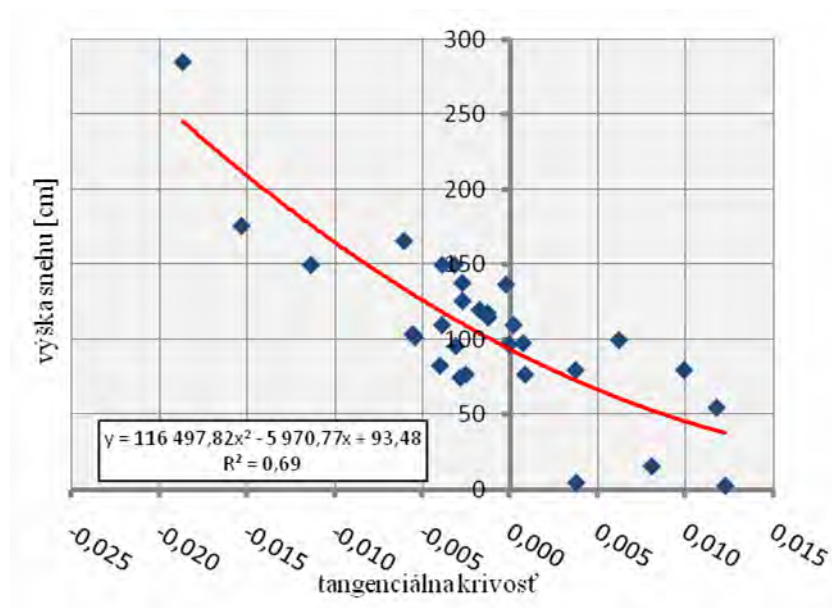
Výsledky a diskusia

Georeliéf zohráva významnú úlohu pri akumulácii snehu, v období, keď sa začína snehová pokrývka topiť, ale aj pri zmenách veľkosti plôch pokrytých snehom a pri ich lokalizácii. Reliéf vplýva na tieto procesy nepriamo, jeho vplyvom na variabilitu dopadajúcich zrážok a slnečného žiarenia, teploty vzduchu a poľa rýchlostí vetra, ktoré iniciuje transport snehu [5]. Vietor často transportuje sneh na veľké vzdialenosti, predtým ako sa sformuje stabilná snehová pokrývka [6]. Už z empirických pozorovaní je zrejmé, že transport snehu vetrom počas zrážok, ako aj v bezzrážkových obdobiach, je v horských oblastiach veľmi významným procesom, ovplyvňujúcim charakter priestorového rozdelenia snehovej pokrývky. Výsledkom je väčšie množstvo snehu naviate v konkávných dnách dolín a žľaboch a odviate plochy na konvexných hrebeňoch a chrbtoch s veľmi nízkou alebo až žiadnou snehovou pokrývkou [5]. Tieto zákonitosti sa potvrdili aj v našom skúmanom území, kde bolo rozloženie snehovej pokrývky výrazne nerovnomerné o čom svedčia aj namerané hodnoty (tab. 1). Vykonali sme regresnú analýzu závislosti jednotlivých parametrov reliéfu a výšky snehu na výskumných bodoch. Najvýraznejšia závislosť sa prejavila pri tangenciálnej krivosti. V tomto prípade dosiahol regresný koeficient pri polynóme druhého

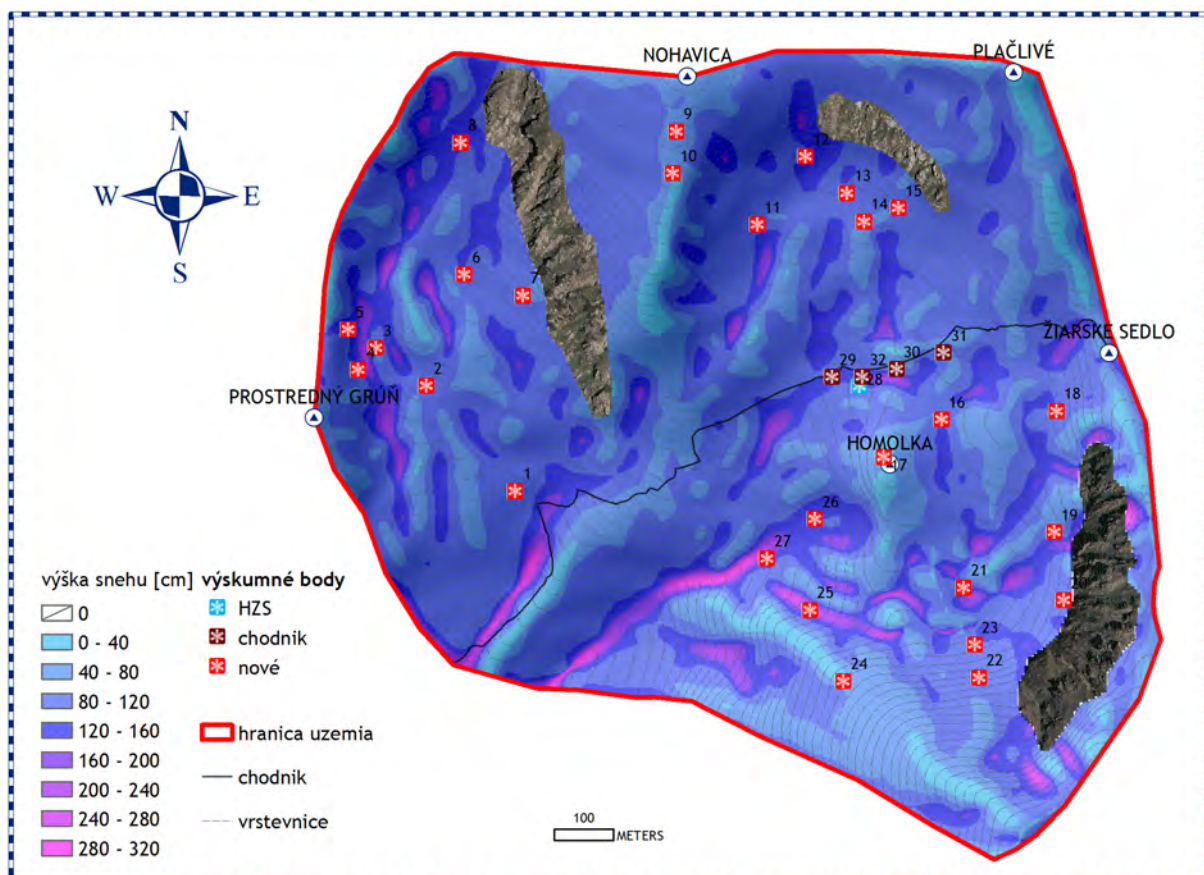
stupňa $R^2 = 0,69$. Táto závislosť je znázornená na obr. 1. Z mapy na obr. 2 je tiež zrejmé, že najvyššie hodnoty hĺbky snehovej pokrývky sú na základe našej analýzy predpokladané v konkávných dnách dolín a žľabov. Rovnicou regresie sme vypočítali späť aj hodnotu výšky snehu na základe tangenciálnej krivosti na výskumných bodoch, aby sme verifikovali správnosť tejto rovnice. Priemerná chyba dosiahla hodnotu 26,47 cm (tab. 1).

Tab. 1 Výška snehovej pokrývky a hodnoty morfolometrických parametrov na výskumných bodoch

Id	výška snehu [cm]	sklon [°]	tangenciál na krivosť	spádnicová krivosť	mean krivosť	nadm. výška [m]	vypočítaná výška snehu [cm]	chyba výpočtu voči meraniu [cm]
1	77	23,7	-0,0025	0,0036	0,0005	1683,2	109,33	32,33
2	110	10,3	0,0002	-0,0037	-0,0017	1744,6	92,31	17,69
3	80	13,6	0,0037	0,0033	0,0035	1762,9	72,86	7,14
4	83	29,2	-0,0040	-0,0145	-0,0092	1761,7	119,20	36,20
5	104	40,7	-0,0055	-0,0044	-0,0050	1784,3	130,18	26,18
6	110	16,3	-0,0039	-0,0025	-0,0032	1792,5	118,40	8,40
7	137	36,1	-0,0002	-0,0035	-0,0019	1805,3	94,91	42,09
8	102	31,8	-0,0054	-0,0009	-0,0032	1891,2	129,31	27,31
9	100	18,3	0,0062	0,0020	0,0041	2028,2	61,00	39,00
10	55	17,2	0,0118	0,0052	0,0085	2009,2	39,40	15,60
11	115	25,3	-0,0013	-0,0006	-0,0009	1891,3	101,14	13,86
12*		38	-0,0046	-0,0008	-0,0027	1918,9		
13*		17,4	-0,0019	-0,0061	-0,0040	1892,5		
14	5	9,9	0,0038	-0,0039	0,0000	1887,3	72,69	67,69
15	98	29,0	0,0007	-0,0042	-0,0017	1905,8	89,22	8,78
16	138	2,2	-0,0027	0,0023	-0,0002	1836,3	110,62	27,38
17	16	14,0	0,0080	0,0238	0,0159	1845,6	52,97	36,97
18	126	28,8	-0,0027	-0,0124	-0,0076	1865,2	110,54	15,46
19	118	24,5	-0,0013	-0,0029	-0,0021	1829,6	101,32	16,68
20	77	29,7	0,0008	0,0056	0,0032	1839,9	88,51	11,51
21	285	4,5	-0,0186	-0,0026	-0,0106	1790,0	245,20	39,80
22	120	45,1	-0,0017	-0,0006	-0,0012	1844,5	104,23	15,77
23	150	30,4	-0,0032	-0,0039	-0,0035	1804,6	113,56	36,44
24	3	24,8	0,0122	0,0013	0,0068	1820,0	37,84	34,84
25	176	25,9	-0,0153	0,0003	-0,0075	1739,7	212,06	36,06
26	166	28,2	-0,0060	-0,0046	-0,0053	1734,3	133,79	32,21
27	150	21,9	-0,0113	-0,0042	-0,0078	1696,9	176,14	26,14
28	75	17,8	-0,0028	-0,0015	-0,0022	1822,3	111,37	36,37
29	96	19,3	-0,0031	-0,0061	-0,0046	1813,1	113,06	17,06
30	80	9,5	0,0099	0,0010	0,0055	1844,3	45,81	34,19
31	97	7,6	-0,0001	0,0057	0,0028	1853,1	93,87	3,13
32	150	20,0	-0,0039	-0,0089	-0,0064	1827,8	118,28	31,72
*výskumné body zničené lavínou						priemerná chyba [cm]		26,47



Obr. 1 Závislosť výšky snehovej pokrývky od tangenciálnej krivosti



Obr. 2 Výška snehovej pokrývky 27.1.2013, extrapolovaná na základe závislosti výšky snehovej pokrývky od tangenciálnej krivosti.

Záver

Na základe vypracovanej analýzy sa predpoklad vplyvu tvarov reliéfu na rozmiestnenie snehovej pokrývky preukázal v signifikantnej miere. Najvýraznejšie sa prejavil vplyv tangenciálnej krivosti reliéfu. Na základe zistených výsledkov však nevieme vysvetliť pomerne veľkú časť variability výšky snehovej pokrývky v priestore. Existuje viacero príčin, ktoré to môžu spôsobovať. Môžeme ich rozdeliť dvoch skupín, prvou sú nedostatky vstupných údajov ako je presnosť DMR, presnosť zamerania výskumných bodov a nízky počet výskumných bodov. Do druhej skupiny by sme mohli zaradiť vplyv meteorologických faktorov a to hlavne smer a rýchlosť vetra, ktoré asi najmarkantnejšie vplývajú na transport a akumuláciu snehu. V neposlednom rade treba brať do úvahy aj vplyv slnečnej radiácie, ktorá tiež nepôsobí rovnomerne, obzvlášť v takom členitom území ako je naše.

Pre využitie týchto výsledkov pri modelovaní odtoku zo snehovej pokrývky je teda potrebné zamerať sa na spresnenie vstupných dát a na zohľadnenie meteorologických faktorov.

Pod'akovanie

Moje poďakovanie patrí môjmu bratovi Ing. Jánovi Krajčímu PhD., otcovi Jánovi Krajčímu a Jakubovi Mikulášovi za pomoc a podporu.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Elder K., Dozier J., Michaelsen J. (1991) *Water Resour. Res.* 27, p. 1541
- [2] Molotch N., Pcolee M. T., Bales R. C., Dozier J. (2005) *Hydrol. Processes* 19, p. 1459
- [3] López-Moreno J. I., Nogués-Bravo D. (2006) *Hydrol. Processes* 20, p. 2217
- [4] Mazúr E., Lukniš M. (1978) *Geografický časopis* 30, p. 101
- [5] Kostka Z. (2001) *Acta Hydrologica Slovaca* 1, p. 1
- [6] DeWalle D. R., Rango A. (2008) *Principles of snow hydrology*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 29

Podpora cestovného ruchu vo vybranom regióne s využitím GIS

Veronika Madleňáková

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra kartografie
a geoinformatiky a DPZ, Mlynská dolina 842 15 Bratislava, Slovensko,
veronika.madlenakova@gmail.com*

Abstrakt

Submitted work deals with support of tourism in Orava region with using geographic information systems. It provides information about attractive tourist objects in the region and on the basis of this information provides insight into the use of possibilities of tourism in the region. Using ArcGIS software and network analysis, we created a network dataset which was created by combining layers of points of tourist objects and roads. With using the function of network analysis, we create required routes that were made from time availability and attractiveness of cultural and historical buildings in the region. The first route, passing through all of the tourist objects, is time consuming and therefore is divided into two days. The second route passes through only the most interesting objects and takes one day. These routes are supplemented by a specific timetable for examinations and maps graphically illustrate this fact.

Key words: network analysis; travel guide; time availability; tourist attraction

Úvod a formulácia cieľa

Vybraná oblasť- región Orava je turisticky atraktívna a to z viacerých stránok. Z prírodného hľadiska má Orava veľký potenciál hlavne kvôli nádhernej a chránenej prírode. Nachádza sa tu Chránená krajinná oblasť Horná Orava. Orava nie je zaujímavá len kvôli prírode, ale je bohatá aj na stavebné pamiatky, s ktorými sa môžeme stretnúť vo viacerých obciach. Najcennejšou pamiatkou je určite Oravský hrad, ale zaujímavé sú aj pamiatky ľudovej architektúry či drevené kostoly. Ako už bolo spomenuté nachádza sa tu množstvo prírodných aj kultúrnych pamiatok. Avšak tento región ich dostatočne nevyužíva. Preto som sa rozhodla tento región zviditeľniť.

Hlavným cieľom je vytvorenie trás, prechádzajúcich cez turisticky atraktívne objekty, ktoré sú obohatené aj o prehliadky, pri ktorých je zohľadnený čas potrebný na presun medzi lokalitami a takisto aj čas potrebný na prehliadky jednotlivých objektov. Podpora cestovného ruchu regiónu spočíva v priblížení regiónu a jeho predností ale hlavne dosiahnutím hlavného cieľa.

Materiál a metódy

Región Orava leží na severozápade Slovenska a hraničí s Poľskom. Tento región patrí do Žilinského kraja a tvoria ho tri okresy: Námestovo, Dolný Kubín a Tvrdošín. Tieto okresy tvorí 63 samosprávnych obcí, z toho sú 4 mestá. Orava má približne 133 700 (2010) obyvateľov a hustota zaľudnenia je približne 80 obyvateľov/km². Najväčšie mesto je Dolný

Kubín (19 775 obyvateľov), nasleduje Tvrdošín (9402), Námestovo (8096) a Trstená (7530) [1].

Vytvoreniu počítačového experimentu predchádzalo vykonanie viacerých úloh. Potrebné úlohy môžem rozdeliť do viacerých fáz. Prvá fáza bola úprava vektorových vrstiev, uskutočnená v Qgise. V tejto časti som vyseletovala potrebné okresy a na základe tohto kroku som orezala cestnú sieť. Základnou úlohou ďalšej fázy bolo oboznámenie sa s turistickými lokalitami v skúmanej oblasti a následne ich lokalizovanie. Toto sa stalo za pomoci viacerých stránok [2, 3] a aplikácie Google Earth. Prezentované sú všetky lokality regiónu, ktoré bolo možné vyhľadať.

Tab.1 Turistické objekty s ich súradnicami

Turistický objekt	Súradnice (°)	
	φ	λ
Oravský hrad	49.2625	19.3606
Oravská priehrada	49.3984	19.5433
Ostrov umenia	49.4003	19.5139
Múzeum Oravskej dediny	49.2614	19.6614
drevený kostolík Tvrdošín	49.3367	19.5592
drevený kostolík Leštiny	49.1895	19.3488
drevený kostolík Istebné	49.2167	19.2208
Bobrova raľa	49.3050	19.2208
Františkova huta	49.2975	19.5063
Oravské múzeum P.O.H.	49.2066	19.2975
Oravská lesná železnica	49.3798	19.1604
Oravice	49.2992	19.7463
Hviezdoslavova hájovňa	49.5414	19.5002
Galéria Márie Medveckej	49.3328	19.5510
Socha Ježiša Krista	49.4414	19.4816
Florinov dom	49.2078	19.2947
Pamätná izba M.Hamuljaka	49.3885	19.4362

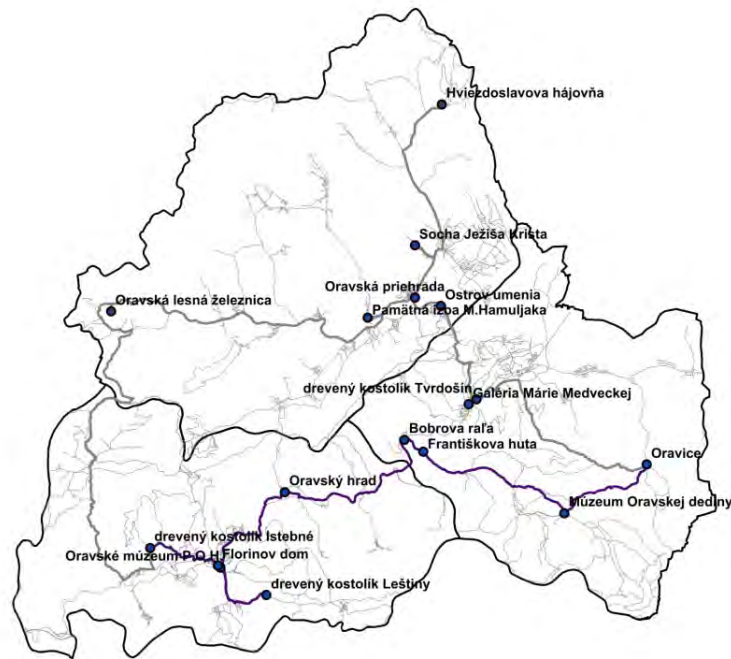
Ďalšou úlohou bolo vytvorenie bodovej vrstvy už spomínaných turistických lokalít. V ďalšej fáze som sa zaoberala vytvorením sieťového datasetu a vytvorením dvoch trás. Trasy boli určené na základe dvoch kritérií. Prvá trasa bola určená na základe časovej náročnosti t.j. bola nájdená najrýchlejšia cesta a sú v nej zahrnuté všetky turistické lokality. Druhá trasa bola vyhľadávaná podľa atraktivity a pozostáva len z najzaujímavejších objektov. Vypočítaná bola aj časová náročnosť oboch trás, kde som zohľadňovala povolenú rýchlosť a vzdialenosť. Túto fázu som uskutočnila v prostredí ArcGIS.

Výsledky

Výsledkami tejto práce sú vytvorené trasy, na základe empirického výskumu uskutočneného v technologických prostrediach uvedených v metodike práce a opis ich časovej náročnosti, kde zohľadňujem čas potrebný na presun medzi lokalitami a takisto čas potrebný na prehliadku jednotlivých objektov. Tieto prehliadky budú dve. Prvá prehliadka bude prechádzať všetkými objektmi, ale keďže táto prehliadka je časovo náročná bude rozdelená na dva dni. A druhá prehliadka sa týka iba piatich najzaujímavejších lokalít, táto prehliadka je už jednodňová. Obidve tieto prehliadky budú doplnené aj o mapy, ktoré znázorňujú trasy prehliadok. Presun medzi lokalitami je vypočítaný pre automobilový prostriedok. Uvedený čas na presun je vypočítaný na základe vzdialenosti a povolenej rýchlosti. Čas potrebný na prehliadky bol zistený z dostupných zdrojov [2, 3] alebo odhadnutý z vlastnej skúsenosti. Avšak k týmto časom je pripočítaná rezerva, preto sa netreba znepokojovať nedodržaním časového harmonogramu.

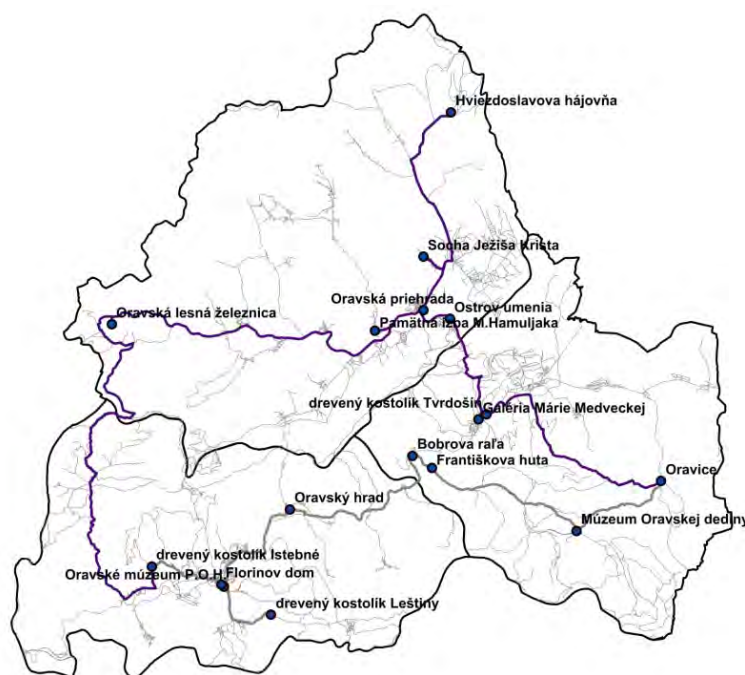
- **Dvojdňová prehliadka regiónu Orava všetkými turistickými objektmi**

1.deň: Turistický sprievodca regiónom Oravy začína prehliadkou o 10:00 ráno v drevenom artikulórnom kostolíku v Istebnom, približný čas potrebný na prehliadku tejto pamiatky je 20 minút. Ďalej sa presunieme o približne 7 km, čo predstavuje približný čas 14 minút a dostaneme sa k ďalšej zastávke s názvom Florinov dom, tu sa zdržíme asi 15 minút. Nasleduje Múzeum Pavla Orzságha Hviezdoslava, ktoré je vzdialené len 700 metrov a dĺžka presunu je teda iba 2 minúty. Tu a pri nasledujúcej pamiatke sa zdržíme tiež 20 minút. Už spomínaná zastávka – drevený kostol v Leštínách je vzdialená 6 kilometrov a teda 10 minút. Ďalej budeme pokračovať v ceste na Oravský hrad, kde budeme o 20 minút (16 km). Prehliadka hradu bude trvať jeden a pol hodiny. O skoro 17 kilometrov (21 minút) sa nachádza komplex ľudovej architektúry – Bobrova raľa, kde strávime najviac hodinu. O 2 kilometre (4 minúty) sa nachádza železiareň Františkova Huta, kde nám bude stačiť 15 minút. Nasledujúcou zastávkou, vzdialenou 15 km (19 minút), je Múzeum Oravskej dediny, kde sa zdržíme 1 hodinu. Poslednou zastávkou v prvý deň je termalpark Oravice vzdialený 16 km (19 min.). Zo zohľadnením potrebného času na prehliadky pamiatok, času potrebného na presun medzi pamiatkami a pol hodiny na obed by sme sa mali dostať na poslednú zastávku o 17:30. Ak by sa nám prehliadku podarilo ukončiť skôr o to dlhšie môžeme stráviť príjemné chvíle v termálnych vodách parku Oravice. Keďže areál sa zatvára o 20:00 navrhovala by som ukončiť prehliadku v tejto lokalite, a využiť možnosť ubytovania sa na noc v tomto areáli.



Obr.1 Trasa prvého dňa prehliadky

2. deň: Druhý deň budeme pokračovať o 9:30, keďže nasledujúci bod našej trasy – drevený kostol v Tvrdosíne otvárajú o 10:00 a na presun potrebujeme najmenej 25 minút. Na prehliadku tohto areálu budeme potrebovať 20 minút. Pokračujeme v trase a o 2 minúty sa dostaneme ku ďalšej zastávke Galéria Márie Medveckej a takisto nám bude stačiť 20 minút. O ďalších 17 minút sa budeme nachádzať na Prístave pri Oravskej priehrade, odkiaľ sa loďou dostaneme na Ostrov Umenia. Plavba loďou a prehliadka ostrova bude trvať 80 minút. Po ukončení tejto prehliadky nasleduje zastávka na nábřeží Oravskej priehrady. Keďže tú sme mohli pozorovať počas plavby navrhovala by som využiť čas strávený pri priehrade ako obedňajšiu prestávku. V blízkosti nábřežia je viacero reštaurácií s priamym výhľadom na túto vodnú nádrž. Pretože zastávok bude ešte viac, môžeme tu ostať najdlhšie 35 minút. V susednej obci – Klin o 14 minút ďalej je situovaná Socha Ježiša Krista a na prehliadku je vyhradený čas 15 minút. O niečo ďalej približne 25 minút sa nachádza Hviezdoslavova Hájovňa, kde sa zdržíme 20 minút. Nasledovne sa budeme musieť vrátiť a dostať sa do obce Oravská Jasenica vzdialenej 32 minút, kde sa nachádza Pamätná izba Martina Hamuljaka a Múzeum obce Oravská Jasenica, keďže táto expozícia nie je veľká na prehliadku nám postačí 15 minút. Úplne poslednou zastávkou tejto dvojdnovej prehliadky je Oravská lesná železnica, ktorá je vzdialená 31 minút. Keďže posledná jazda začína o 15:30, musíme striktné dodržať tento časový plán, aby sme na železnicu dostali včas. Jazda Oravskou lesnou železnicou trvá 45 minút. Keď sa chceme dostať na začiatok našej prehliadky, stane sa tak o hodinu a to znamená, že do Istebného sa dostaneme o 17:15.

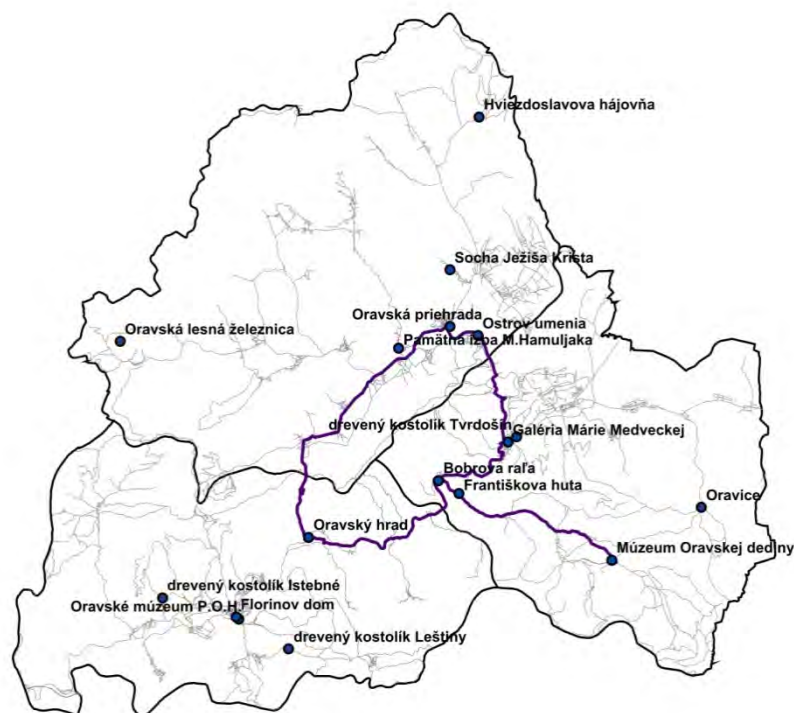


Obr. 2 Trasa druhého dňa prehliadky

- **Jednodňová prehliadka regiónu Orava najatraktívnejšími turistickými objektmi**

Trasa prehliadky je vedená najatraktívnejšími turistickými objektmi Oravy ako sú: Oravský hrad, Bobrova raľa, Múzeum Oravskej dediny, Oravská priehrada a Ostrov Umenia. Túto prehliadku začneme o 9:00, keď otvárajú Oravský hrad. Na prehliadku Oravského hradu potrebujeme 1 a pol hodiny. Ďalšou zastávkou vzdialenou 20 minút je komplex ľudovej architektúry – Bobrova raľa, kde strávime hodinu. O ďalšiu hodinu sa budeme nachádzať v Múzeu Oravskej dediny, kde budeme takisto potrebovať jednu hodinu. Ďalšou zastávkou vzdialenou 40 minút je Prístav, z ktorého sa dostaneme na Ostrov Umenia. Plavba loďou a prehliadka ostrova trvá 80 minút. Z prístavu na nábrežie Oravskej priehrady sa dostaneme za 4 minúty. A keďže toto je posledná zastávka našej prehliadky, môžeme využiť viaceré atraktivity na Oravskej priehrade. Ak budeme počítat', že tu strávime hodinu a pol a presun na náš začiatkový bod trvá 21 minút, tak tento okruh ukončíme približne o 17- tej hodine.

Obidve tieto prehliadky navrhujem uskutočniť počas pracovných dní, okrem pondelka keďže niektoré lokality sú cez víkend a v pondelky zatvorené a počas letnej sezóny. A takisto navrhujem skontrolovať či, sa nezmenil čas otváracích hodín.



Obr.3 Trasa jednodňovej prehliadky

Záver

Cestovný ruch je dôležitá sféra v oblasti rozvoja regiónov. Niektoré regióny vedia svoje či už prírodné pomery, alebo kultúrne pamiatky veľmi dobre využiť a cestovný ruch sa pre ne stáva najdôležitejšou oblasťou príjmov. Nanešťastie región Orava, medzi tieto regióny nepatrí. Napriek tomu, že sa môže pyšiť prírodnými krásami ako je napríklad Oravská priehrada, či Ostrov umenia, alebo významnými kultúrnymi pamiatkami ako je Oravský hrad, nevyužíva ich dostatočne. Problém nie je len v nedostatočnej propagácii, ale sčasti aj poskytovaním kvalitných služieb za primeranú cenu. Tieto problémy vyriešiť nemôžem, ale aspoň som sa pokúsila priblížiť turisticky atraktívne objekty, ktoré sa v tomto regióne nachádzajú. Vďaka vytvoreniu trás s ich popisom môže byť tento región pre návštevníka zaujímavejší a preto sa rozhodne navštíviť ho.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Senčák R. 2010. *Vzťah chudoby a životných stratégií v regióne Orava*. [online], [Citované 1.3.2013]. Dostupné na internete: <http://www.humannageografia.sk/projekt1/download/sencak_DP.pdf>
- [2] www.slovakia.travel, 2013. *Kultúra a pamiatky*. [online], [Citované 1.3.2013]. Dostupné na internete: <<http://www.slovakia.travel/portal.aspx?!=1&smi=8038&ami=8038>>
- [3] www.volnycas.sk, 2013. *Výlety*. [online], [Citované 1.3.2013]. Dostupné na internete: <<http://www.volnycas.sk/system/search/index.html?search=1>>

Priestorové aspekty záujmu USA o Afriku

Anna Máriašsyová

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra regionálnej geografie, ochrany a plánovania krajiny, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko;
anna.mariassyova@gmail.com*

Abstrakt

The paper deals with the relationship of the United States and Africa in the political, military-strategic and economic terms. It look over the spatial aspects of cooperation and examine its relation to intra-African and international context. It also focuses on the manifestations of American influence in the second half of the twentieth century, and the result is the allocation of areas of American interest in Africa.

KLúčové slová: *Afrika; USA; medzinárodné vzťahy; ekonomické väzby; bezpečnostná situácia*

Úvod a formulácia cieľa

Počiatky záujmu Spojených štátov o Afriku siahajú do roku 1822, kedy pre svojich prepustených otrokov založili Libériu. V dvadsiatom storočí sa zapojili do dekolonizačného procesu, v ktorom vystupovali proti imperiálnemu systému, no nové nezávislé štáty sa čoskoro dostali do sféry vplyvu jednej z nastupujúcich veľmocí – USA a ZSSR. Počas studenej vojny začala byť Afrika chápaná ako strategické územie, na ktorom bolo treba zastaviť šírenie komunizmu. Spojené štáty ako supervel'moc získali možnosť priamo či nepriamo ovplyvňovať dianie na kontinente [1]. Nárast ich vplyvu v Afrike symbolizuje zmenu mocenského postavenia Európy po druhej svetovej vojne. Cieľom tohto príspevku je preskúmať rôzne formy spolupráce USA s africkými krajinami a identifikovať priestorové aspekty týchto vzťahov. Tiež budeme zisťovať, či sú Spojené štáty ochotné v záujme svojich cieľov zasahovať do vnútorných záležitostí krajín a pokúsime sa identifikovať regióny vplyvu a strategického záujmu, ktoré si Spojené štáty v Afrike vytvorili.

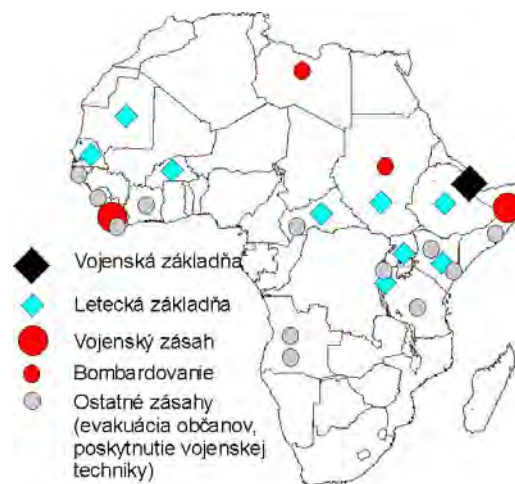
Materiál a metódy

Práca je založená na spracovaní štatistických ukazovateľov z oblasti hospodárstva (zahraničný obchod, investície, rozvojová pomoc) a bezpečnosti do mapových výstupov. Na základe týchto čiastkových výsledkov sme sa pokúsili empiricky vyčleniť oblasti zvýšeného vplyvu USA v Afrike a výsledok kartograficky vyjadriť. Ukazovatele sme vybrali na základe uváženia najdôležitejších oblastí medzinárodných vzťahov USA. Štatistické údaje z ekonomickej oblasti boli získané z databáz OSN a OECD a údaje o vojenskej prítomnosti

z internetovej stránky amerického vojenského velenia v Afrike.

Výsledky a diskusia

Priame vojenské zásahy zo strany USA boli v Afrike dlho problematické, vzhľadom na prebiehajúcu studenú vojnu. V prvých rokoch po dekolonizácii sa skôr zameriavali na nepriame zásahy v krajinách, kde hrozil nástup socialistických vodcov. Príkladom je financovanie prevratu proti ghanskému prezidentovi Nkrumahovi v roku 1966 alebo počas občianskej vojny v Kongo podpora zavraždenia socialistického lídra Mobutuho [2]. Postupne začali Spojené štáty bojujúce strany aj vyzbrojovať, napríklad stranu UNITA v Angole a Etiópiu za vlády Haileho Selassieho. V Etiópii mali v tom čase aj najväčšiu vojenskú základňu mimo vlastného územia a hoci sa neskôr výrazne priklonila k ZSSR, kvôli jej strategickej polohe s ňou nikdy neprerušili styky [3]. Po opustení základne v Etiópii v osemdesiatych rokoch nemali Spojené štáty v Afrike trvalé vojenské zastúpenie až do roku 2001, kedy po 11. septembri okamžite reagovali a okamžite presunuli svojich vojakov do priestorov francúzskej základne v Džibuti na zabezpečenie protiteroristických operácií v Africkom rohu. V súčasnosti tu pôsobí 2500 vojakov a v prevádzke je aj niekoľko leteckých vojenských základní (obr. 1). Priame vojenské intervencie sa v minulosti sústredili hlavne na Líbyu ako hlavného ideologického nepriateľa na území Afriky. Viackrát došlo k bombardovaniu jej územia alebo zostreleniu lietadiel nad líbyjskými vodami.

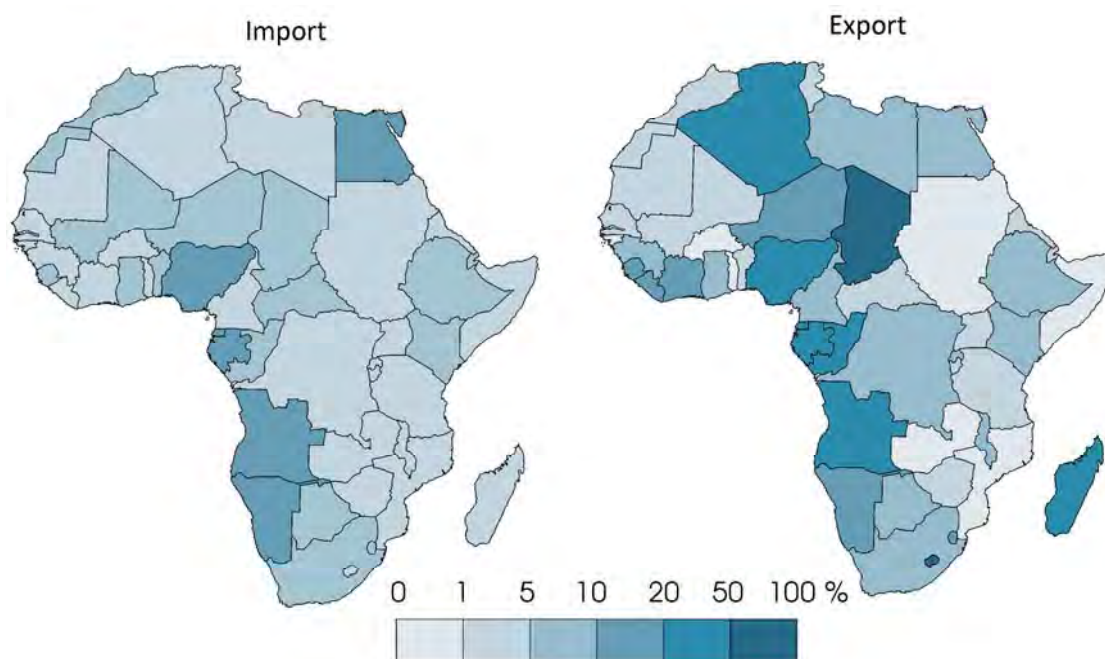


Obr. 1 Americká vojenská prítomnosť v Afrike od roku 1990 [4]

Najväčšou pozemnou operáciou bolo vedenie operácií misie OSN v Somálsku v roku 1993, kde mali dislokovaných až 25 000 vojakov. Neskôr sa jej rozsahom čiastočne priblížila operácia v Libérii v roku 2003, kedy v reakcii na vnútropolitický vývoj vyslali Spojené štáty 3500 vojakov, aby hliadkovali v libérijských teritoriálnych vodách. Pri ostatných operáciách

išlo väčšinou iba o posilnenie ochrany ambasad alebo evakuáciu amerických občanov. V súčasnosti je pre USA prioritou boj proti terorizmu, čomu prispôsobujú aj svoje pôsobenie v Afrike. Hovorí sa o budovaní malých tajných základní po celom kontinente a v dvadsiatich piatich štátoch prebehli výcviky zamerané na mierové misie a protiteroristické akcie [4].

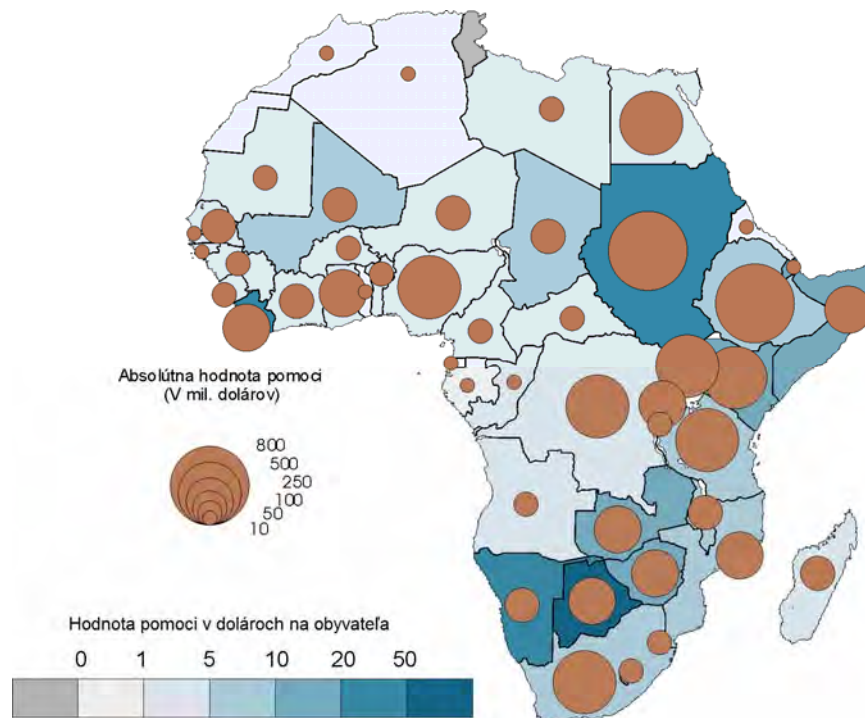
Ďalším aspektom spolupráce USA a Afriky je zahraničný obchod. Dôležitá je najmä jeho komoditná štruktúra, pretože Spojené štáty sa zameriavajú hlavne na vývoz ropy a vo väčšine ropných štátov sú hlavným odberateľom. Dominujú v Alžírsku, Kongu, Rovníkovej Guinei, Gabone a Nigérii. Ropu dovážajú aj z krajín, kde sa jej produkuje relatívne málo a ostatné vyspelé štáty z nich exportujú niečo iné, napríklad z DR Kongo, Mauritánie a Nigeru. Zo štátov, kde ich podiel na exporte prekračuje 20 %, iba z dvoch vyváža inú komoditu – z Madagaskaru a Lesotha textil. Najvyšší podiel (83 %) dosahuje v Čade, kde pred desiatimi rokmi začala americká spoločnosť ExxonMobil budovať ropovod na prepravu čadskej ropy z Kamerunu do Guinejského zálivu. V absolútnych hodnotách Spojené štáty najviac dovážajú z Nigérie (viac ako polovica celkového dovozu z Afriky a 7,5 % celkového dovozu ropy do USA), Alžírsku a Angoly (17, resp. 14%) Podiel na celkovom importe hlavne v oblasti západnej Afriky kopíruje rozloženie exportu. Najväčší podiel majú USA v Rovníkovej Guinei (15 %), ale až štvrtina ich tovaru smeruje do Egypta, ide hlavne o obilniny a lietadlá, nasleduje Juhoafrická republika a Nigéria (19 a 15 %) Spojené štáty sú takmer výhradným dovozcom zbraní do Egypta a Libérie [5].



Obr. 2 Podiel zahraničného obchodu s USA na celkovom importe a exporte, priemer za roky 2006-2010 [5]
 Hodnotenie investičnej aktivity USA v Afrike je pomerne náročné, pretože číselné

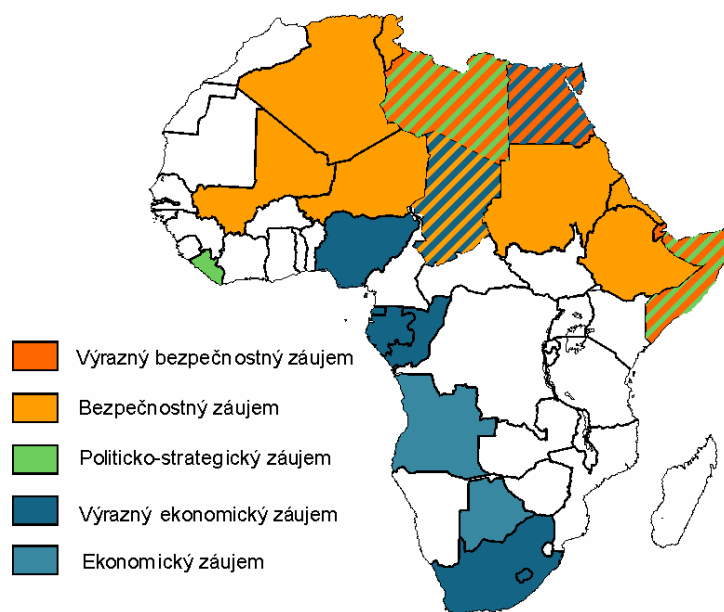
hodnoty ukazovateľa môžu byť aj záporné. Z tohto dôvodu tiež nie je ukazovateľ prezentovaný v mapovom výstupe, lebo jeho priemer za dlhšie obdobie neodráža skutočný stav. Z pohľadu USA je investovanie v Afrike zatiaľ marginálnou záležitosťou, keďže jej podiel na celkových investíciách je len 1,5 %. Až tri štvrtiny všetkých amerických investícií smerujú v Afrike do ťažobného sektora, najmä do ťažby ropy, v oblasti priemyselnej výroby to je len 10 % [6]. Z toho vyplýva aj priestorové rozloženie investícií, jednoznačne najviac ich v roku 2010 smerovalo do Nigérie a Egypta (6 mld. dolárov) a DR Kongo, Konga, Ghany a Sudánu (nad 2 mld. dolárov). Relatívne zastúpenie USA je najvyššie v Gabone a Rovníkovej Guinei [7]. V poslednom období sa Spojené štáty snažia podporovať investície svojich firiem v Afrike a je badateľný odklon od jej tradičného chápania ako poberateľa finančnej pomoci – na jej území sa nachádza 7 z 10 najrýchlejšie rastúcich ekonomík na svete.

Rozvojová pomoc sa často považuje za politický nástroj a aj v správaní USA možno pozorovať takéto znaky. Pri porovnaní obrázku 3 s mapou HDP na obyvateľa, prípadne indexu ľudského rozvoja, je zrejmé, že peniaze nejdú do najchudobnejších oblastí. Príkladom je Botswana, jedna z najbohatších afrických krajín, do ktorej v prepočte na obyvateľa prúdi najviac peňazí. Libéria je síce jedna z najchudobnejších krajín, ale dlhý čas bola de facto kolóniou USA a pravdepodobne aj preto je dodnes výrazne podporovaná. Ďalším viditeľným rysom poskytovania pomoci je preferencia anglofónnych krajín.



Obr. 3 Rozvojová pomoc USA, priemer za roky 2006-2010 [8]

Na základe spomenutých ukazovateľov môžeme vyčleniť oblasti zvýšeného amerického záujmu. V oblasti bezpečnosti je v súčasnosti najdôležitejšia otázka boja proti terorizmu a skupine Al-Káida, ktorá rozširuje svoje pôsobenie v saharských štátoch. Hoci sa už Spojené štáty vyhýbajú otvoreným konfliktom, ako naposledy v prípade Mali, situáciu v celom regióne sa snažia kontrolovať pomocou spojencov a ich protiteroristické akcie sú pre verejnosť čoraz menej nápadné. V súvislosti s arabskou jarou 2011 sa dovtedy stabilná oblasť Maghrebu stala rizikovou, a v Líbyi a Egypte dodnes nie je jasné budúce politické smerovanie. Líbya bola dlhé roky ideologickým nepriateľom USA, ale dnes sa snažia o udržanie stability v regióne s obrovskými zásobami ropy. Problémom Egypta je susedstvo s Izraelom a prípadný nástup islamistov k moci, ktorý by mohol viesť ku konfliktu. Oblasť Afrického rohu je dlhodobo problémová kvôli pirátstvu a anarchii v Somálsku. Svojim zásahom v deväťdesiatych rokoch Spojené štáty do určitej miery prebrali zodpovednosť za jeho budúci vývoj. Na rozdiel od minulosti sa nechcú zapájať do vnútropolitického vývoja krajín, pretože medzinárodné spoločenstvo je na to v prípade svetovej veľmoci veľmi citlivé a neospravedlnil by to ani boj proti terorizmu. Špecifické postavenie v rámci Afriky má Libéria, ktorá je Spojenými štátmi rôznymi spôsobmi podporovaná nad rámec bežných vzťahov. Ekonomický záujem USA o africké štáty je v drvivej väčšine určený ťažbou ropy. Najdôležitejšími exportérmi do USA sú Alžírsko, Angola, Rovníková Guinea, Gabon a Kongo; Juhoafrická republika je najdôležitejším zdrojom platiny a pokrýva polovicu americkej spotreby. Tieto krajiny spolu tvoria 90 % celkového afrického exportu do USA.



Obr. 4 Záujmové oblasti USA v Afrike

Záver

Vyčlenené oblasti vplyvu neznamenujú, že iných krajinách sa vplyv Spojených štátov neprejavuje alebo že ho nemajú. Ich podstata je vo význame pre USA, nie vo význame USA pre Afriku. Spojené štáty sú v pozícii, v ktorej si môžu vyberať partnerov a v súčasnej postupne sa rozvíjajúcej Afrike s rastúcou kúpnu silou a počtom obyvateľov bude čoraz dôležitejšie udržiavať dobré vzťahy. Severovýchod kontinentu pravdepodobne ešte zvýši svoj význam v oblasti medzinárodnej bezpečnosti a pokiaľ budú Spojené štáty naďalej obmedzovať ťažbu ropy na vlastnom území, budú nútené naďalej ju dovážať aj z afrického kontinentu.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Reid R. J (2011) Dějiny moderní Afriky. Grada, Praha, Česká republika
- [2] Shillington K. (2005) History of Africa. Palgrave Macmillan, New York, USA
- [3] Gibbs D. N (2008) Cold war. In: Middleton J. (eds.) New Encyclopedia of Africa, Vol. 1. Thomson Gale, New York, USA, p. 29
- [4] AFRICOM [Citované: 6. marec 2013]
<<http://www.africom.mil/NEWSROOM/Article/6220/fact-sheet-history-of-us-military-involvement-in-a>>
- [5] UN Comtrade [Citované: 6. marec 2013]
<<http://comtrade.un.org/db/dqQuickQuery.aspx>>
- [6] Jones C. V. (2010) US Trade and Investment Relationship with Sub-Saharan Africa: The African Growth and Opportunity Act. [Citované: 7. marec 2013]
<<http://www.fas.org/sgp/crs/row/RL31772.pdf>>
- [7] OECD [Citované: 7. marec 2013]
<http://stats.oecd.org/Index.aspx?DatasetCode=FDI_FLOW_PARTNER>
- [8] OECD [Citované: 7. marec 2013]
<<http://stats.oecd.org/qwids/>>

Charakterizácia riadnych volieb starostov/primátorov obecných a mestských zastupiteľstiev na Slovensku v rokoch 2002-2010

Roman Mikuš

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra regionálnej geografie, ochrany a plánovania krajiny, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko; mikusr@fns.uniba.sk

Abstract

The aim of this work is to fill an empty space within geographic electoral works, specifically on the municipal level of elections. The main focus is on characterization of the representation at the level of the heads of the municipal councils, regardless of their political affiliation. Characterization of free and fair elections will take place at the municipal level, but also at the level of hierarchically larger units (districts). We also want to point out the differences in the changes in voting preferences of cities and countryside. The above is compared with the national average as well. We also characterize the changes of the election period of mayors. The aim is also to point out various geographic specifics of municipal elections in Slovakia. Informational base of this work is composed of municipal elections 2002, 2006 and 2010.

Kľúčové slová: Slovensko; volebná geografia; komunálne voľby; starosta/primátor; zmena zastúpenia

Úvod a formulácia cieľa

Obecné/komunálne voľby predstavujú jednu z najdôležitejších vymožeností súčasnej demokracie. Ľudia si v nich volia zástupcov, ktorí ovplyvňujú priamo cez nariadenia život v lokálnych komunitách. Výraznejší doraz na lokálnu úroveň možno badať so stupňujúcou sa decentralizáciou štátnej moci a verejnej správy v prospech miestnej samosprávy, ku ktorej v zvýraznenej miere dochádza na Slovensku od obdobia prvej Dzurindovej vlády. Najvýznamnejším bolo presadenie *Zákona č. 416/2001 Z. z.*. Celkovo týmto zákonom rámcovo prešlo pod krídla samospráv 63 nových pôsobností, z čoho je 49 originálne samosprávnych pôsobností a 14 prenesených pôsobností výkonu štátnej správy.[1] Ďalšími významnejšími právnymi úpravami bol zákon č. 447/2001 Z. z. a zákon č. 453/2001 Z. z.. Vyššie spomenuté zákony preniesli kompetencie na obecnú úroveň. Výskum ISSP 2008 SK[4] zistil, že obyvatelia silne vnímajú komunálne dianie a označili za najdôležitejšie práve voľby do obecných zastupiteľstiev.

Volebnej problematike sa v súčasnosti venuje na Slovensku čoraz väčšia pozornosť. V 90tych rokoch, kedy sa objavujú prvé práce zaoberajúce sa touto problematikou sa na Slovensku jednalo prevažne o práce formovania základných volebných vzorcov správania a rozloženia podpory politických subjektov: Mariot[5,6] či Blažek a Kostelecký[7]. Hodnotenie podpory politických subjektov v rôznych skupinách obcí riešili Krivý[8] či Mariot[9]. Identifikáciu príčinnosti voľby na základe rôznych ukazovateľov pre spektrum

regiónov riešil Plešivčák[10], poprípade komplexná charakterizácia v rámci určitých regiónov Madleňák[11]. Bol to práve Madleňák, ktorý upozornil na to, že väčšina volebných prác sa zaoberá voľbami vo väčších mierkach. Vo svojej práci sa ako prvý zaoberá parlamentnými voľbami na regionálnej úrovni, kde analyzuje voľby do NR SR a volebné charakteristiky regiónu Oravy. [11] U všetkých vyššie spomenutých autorov a prác ide o hodnotenie charakteru a následne analýzy podpory strán pri voľbách do najvyššieho zastupiteľského orgánu. I keď sa objavujú práce zapodievané sa inými úrovňami volieb Madleňák[12]-prezidentské či Macháček[13] – europarlamentné, stále je väčšina geografických či politologických prác orientovaná na parlamentné voľby. Vzhľadom na vyššie spomenuté by bolo na mieste skúmať tú úroveň reprezentácie, ktorá je najbližšie k občanovi. [4]

Cieľom tejto práce je zaplniť prázdne miesto v okruhu volebných prác týkajúcich sa komunálnej úrovne volieb. Hlavným prvkom bude charakterizácia reprezentácie na úrovni jednotlivých predsedov obecných a mestských zastupiteľstiev bez ohľadu na ich politickú príslušnosť a charakterizácia zmien volebných období jednotlivých starostov. Charakterizácia prebehne pre riadne voľby na komunálnej úrovni, a ich interpretácia na úrovni vyšších celkov (okresy) v komparácii s priemerom SR. Taktiež poukážeme na odlišnosti v rámci zmien volebných preferencií v meste a na vidieku. Cieľom je taktiež poukázať na rôzne špecifiká komunálnych volieb. Štatistickú bázu tvoria komunálne voľby 2002, 2006 a 2010.

Materiál a metódy

Počas sledovaného obdobia 2002-2010 prebehli troje riadne komunálne voľby. Nastali **4 varianty (kategórie)** zmien na poste predsedu obecného alebo mestského zastupiteľstva: *1) nedošlo k žiadnej zmene a na poste, ostal jeden a ten istý starosta/primátor; 2) došlo k jednej zmene starostu/primátora, pričom jeden z nich bol behom sledovaného obdobia volený 2x v spojitom volebnom období, pričom k zmene na starostovskom/primátorskom poste dochádza buď vo voľbách 2006 alebo 2010; 3) došlo k zmene vo všetkých sledovaných voľbách; 4) došlo k zvoleniu 2 starostov, pričom starosta, ktorý bol zvolený 2x mal funkčné obdobie na jedno volebné obdobie prerušené.*

Hlavnou metódou bude **percentuálne zastúpenie jednotlivých volebných zmien** (výmena reprezentácie) a **komparácia** zistených výsledkov na základe **priemeru SR**. Práca vychádza z metodiky, ktorú využil Mariot[5] ako dvojstupňové hodnotenie nad/pod celoslovenský priemer. Podobnú metodiku využil Madleňák[11], ktorý upravil túto škálu na štvorstupňovú. My sme upravili túto škálu na tri stupne nadpriemer, priemer a podpriemer

celoslovenských ukazovateľov, pričom priemernú hodnotu sme zvolili 5% nad a pod hodnotu priemeru SR. Účelom je poukázať na oblasti, ktoré môžu odrážať alebo predikovať celoslovenské charakteristiky. Metóda je aplikovaná pre Kategórie 1,2,3 ako aj pre celkové volebné zmeny starostov/primátorov v komparácií priemeru SR v rokoch 2006 a 2010.

Analýza sa týka celkovo 2926 územných celkov, v rámci nich sú zahrnuté voľby do obcí, miest a mestských častí, ako aj miest Bratislavy a Košíc. Naopak nerátame do analýzy vojenské obvody, ktoré nemajú obecné zastupiteľstvá a nemalo by tak význam ich analyzovať.

Výsledky a diskusia

Pred zhodnotením získaných informácií je nutné informovať o základných charakteristikách jednotlivých volieb. Vo voľbách 2001 bolo celkovo zvolených 2913 starostov a primátorov z celkového počtu 2926. Celoslovenská volebná účasť sa pohybovala na úrovni 49,51% s výrazným rozdielom medzi mestom a vidiekom (36,33% vs. 66,94%).[14] Z celkového počtu 13 obcí, v ktorých sa nepodarilo zvoliť starostu, až v 4 prípadoch nedošlo ani len k voľbe starostu Dolný Kalník(Martin), Bystrá (Stropkov) a Prikra a Šarbov (Svidník). Pri posledných dvoch zmienených prípadoch nedošlo ani k zorganizovaniu volieb zastupiteľstva. Vo všetkých 4 obciach ide o obce do 50 obyvateľov s výrazne prestarnutou populáciou. Pre všetkých 13 obcí platí to, že sa jedná o obce do 200 obyvateľov s vyšším ako celoslovenským priemerom zastúpenia obyvateľstva 65+ ročných.

Vo voľbách 2006 sa zvolilo celkovo 2905 starostov z celkového počtu 2926. Celoslovenská volebná účasť sa pohybovala na úrovni 47,65% s podobným rozdielom medzi mestom a vidiekom ako v predošlom období (36,76% vs. 61,93%).[14] Z celkového počtu 21 obcí, v ktorých sa nepodarilo zvoliť starostu, až v 9 prípadoch sa nekonali voľby starostu. V 4 prípadoch nedošlo ani k voľbe zastupiteľstva: Ležiachov, Ratkovo (obe Martin), Lipová (Bardejov). Týchto 21 obcí je oproti roku 2002 omnoho homogénnejších, nejedná sa o prestarnuté obce a i keď sú to prevažne obce do 300 obyvateľov nájdú sa tu aj výnimky, z najextrémnejších Štvrtok na Ostrove (Dunajská streda) a Čereňany (Prievidza) s počtom obyvateľov cez 1500. Zaujímavosťou je, že až 5 z týchto 21 obcí je z Martinského okresu.

Vo voľbách 2010 sa zvolilo 2909 z celkového počtu 2926 územných jednotiek. Celoslovenská volebná účasť bola na úrovni 49,69% s mierne zníženým rozdielom medzi vidiekom a mestom oproti predošlým voľbám (39,78% vs 62,9%). Z celkového počtu 17 obcí, v ktorých sa nepodarilo zvoliť starostu, v 3 prípadoch nedošlo k voľbe starostu: Harakovce

(Levoča), Legnava (Stará Ľubovňa), Soľník (Stropkov). V posledných dvoch nedošlo ani k voľbe zastupiteľstva. Opäť ide prevažne o obce do 200 obyvateľov a až na Legnavu nejde o obce výrazne prestarnuté.

Ani v jednej obci sa behom sledovaného obdobia nestalo, aby sa nepodarilo zvoliť starostu/primátora vo viac ako jedných voľbách.

Z celkového počtu 2926 územných jednotiek bol v sledovanom období zvolený jeden a ten istý starosta v 1202 prípadoch, čo predstavuje 41,08% všetkých jednotiek. K zmene vo všetkých sledovaných voľbách došlo v 236 jednotkách (8,07%). Najväčšou skupinou 1488 obcí (50,85%) sa stávajú obce s voľbou 2 starostov (Obr.1). K výraznejšej obmene dochádza u jednotiek kategórie 2 v roku 2010 so 759 jednotkami (51%) oproti 692 jednotkám (46,5%) roku 2006. V 37 prípadoch (2,49%) dochádza k znovu zvoleniu starostu/primátora v roku 2010 ob-jedno volebné obdobie. Celkovo sa tak v roku 2006 zmenilo 32,98% starostov/primátorov a v roku 2010 sa zmenilo 35,27% starostov/primátorov.

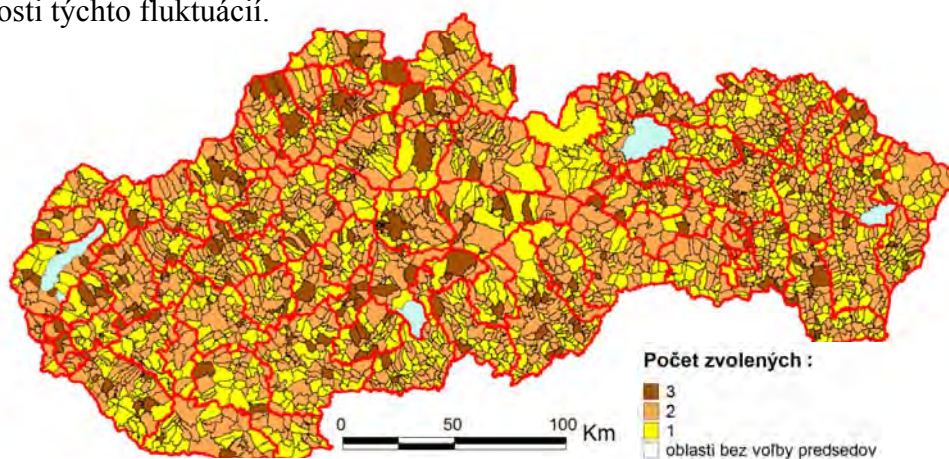
Pri volebnej účasti medzi mestom a vidiekom je veľmi výrazný rozdiel charakteru voľby. V mestách vrátane mestských častí Bratislavy a Košíc (55,07%), ako aj na vidieku (50,65%) prevláda kategória 2: voľba 2 starostov/primátorov. Výraznejší rozdiel prináša kategória 1: bez zmeny starostu/primátora, ako aj kategória 3: zmeny vo všetkých sledovaných voľbách. V prvom prípade výrazne prevyšuje vidiek (41,94%) nad mestom (27,68%), naopak v druhom prípade dochádza k prevahe mesta (14,68%) nad vidiekom (7,64%). V mestách je politická súťaž často spojená priamo s podporou politických subjektov, naopak na vidieku je často politická príslušnosť len „pozlátkou“, ktorá nemá vplyv na voľbu v obci. V mnohých prípadoch sa na vidieku jedná o osobnosti „zakopané vo svojej funkcii“, poprípade sa v obciach vytvárajú dokonca až rodinné klany. Výrazný rozdiel je pri porovnaní volebnej obmeny starostov/primátorov medzi rokmi 2006 a 2010, pri pripočítaní kategórií 3 a 4, ktoré predstavujú volebné zmeny v oboch rokoch. V mestách je výraznejšia obmena primátorov 47,46% roku 2006, oproti 37,85% roku 2010. Rozdiel zmeny na vidieku je menší, pričom mierne prevládajú zmeny v roku 2010 (35,10%) oproti roku 2006 (32,05%).

Porovnanie na úrovni okresov s celoslovenským priemerom prináša zopár pozoruhodností. Oblasti s nadpriemerným zastúpením obcí kategórie 1 sú v oblasti Podunajskej nížiny a oblasti Spiša (Obr.2). Oblasti kategórie 2 s nadpriemerným zastúpením sa vyskytujú v spojitom území Žilinského a Banskobystrického kraja (Obr.3). Oblasti kategórie 3 sú mozaikovito rozložené, s celistvým územím na Západnom Slovensku, taktiež vidno značnú diferencovanosť s absenciou stredových hodnôt (Obr.4). Pri porovnaní

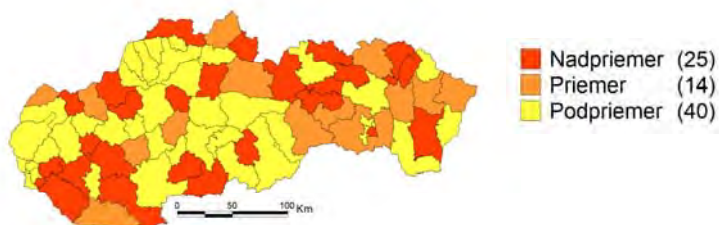
celkových volebných zmien rokov 2006 a 2010 k priemeru SR, možno badať troje oblasti, s obmenou v oboch volebných rokoch: Bratislava a širšie okolie, Žilina a okolie a Zvolen a okolie. Najvýraznejší rozdiel medzi rokmi je na Orave, Kysuciach, Liptove či v okresoch v okolí Košíc, kde k výraznej obmene dochádza v roku 2006. (Obr.5,Obr.6)

Záver

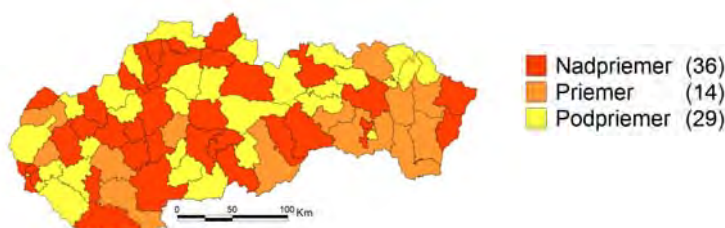
Záverom možno potvrdiť výrazný rozdiel voľby v meste a na vidieku, čo už charakterizovali aj iní autori na národnej úrovni volieb. Aj napriek tomu, že sa zdá štruktúra volebných kategórií na mape Slovenska značne fragmentovaná, je možné vyčleniť špecifické regióny (mimo stanovených hraníc) na ďalšiu podrobnejšiu analýzu. Špecifickým príkladom sa stáva okres Poprad, kde sa takmer v celom okrese nemenilo zastúpenie. V rámci už vyššie spomenutých hodnotení kategórií k celoslovenskému priemeru možno ešte podotknúť, najmä pri hodnotení volebných zmien, že nám umožňuje identifikovať regióny s najvyššou fluktuáciou starostovských pozícií. Tieto charakteristiky tak môžu slúžiť ako podklad pri hľadaní príčinnosti týchto fluktuácií.

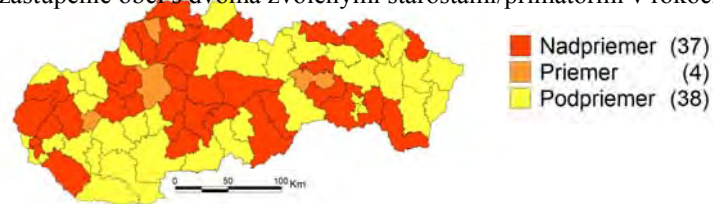
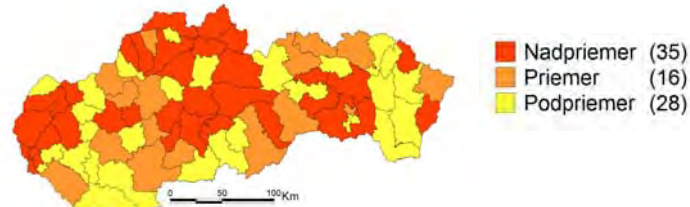
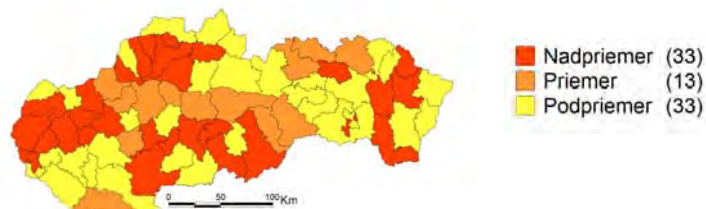


Obr. 1 Počty zvolených starostov v jednotlivých obciach Slovenska v rokoch 2002,2006 a 2010



Obr. 2 Priemerné zastúpenie obcí s jedným zvoleným starostom/primátorom v rokoch 2002,2006 a 2010



Obr. 3 Priemerné zastúpenie obcí s dvoma zvolenými starostami/primátormi v rokoch 2002,2006 a 2010**Obr. 4** Priemerné zastúpenie obcí s tromi zvolenými starostami/primátormi v rokoch 2002,2006 a 2010**Obr. 5** Priemerné volebné obmeny starostov/primátorov v obciach v roku 2006**Obr. 6** Priemerné volebné obmeny starostov/primátorov v obciach v roku 2010

Pod'akovanie

Príspevok vznikol vďaka finančnej podpore grantu VEGA č. 1/1143/12 Regióny: vývoj transformácia a regionálna diferenciacia.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Zákon NR SR č. 416/2001 Z. z. o prechode niektorých pôsobností z orgánov štátnej správy na obce a na vyššie územné celky
- [2] Tlačová správa sociologického ústavu SAV k ISSP 2008 SK[Citované: 20. Február 2013] < <http://www.sociologia.sav.sk/podujatia.php?id=1197&o=0> >
- [3] Mariot P. (1991) Geografický časopis 43(3), p. 231
- [4] Mariot P. (1994) Geographica Slovaca 7, p. 103
- [5] Blažek J., Kostelický T.(1991) Zborník československej geografickej spoločnosti.96(1), p. 1
- [6] Krivý P. (1999) Sociológia 31, p. 51
- [7] Mariot P. (1999) Geografický časopis 51(2), p. 153
- [8] Plešivčák P. (2011) Acta Geographica Universitas Comenianae 56(1), p. 99
- [9] Madleňák T. (2006) Geografická revue 2(2), p. 630
- [10] Madleňák T. (2010) Zborník českej geografickej spoločnosti 115, p. 789
- [11] Macháček L. (2009) Slovenská politologická revue 3, p. 73
- [12] Štatistický úrad Slovenskej republiky

Demogeografická analýza územia mesta Žarnovica

Ján Morvic

Univerzita Konštantína Filozofa, Fakulta prírodných vied, Katedra geografie a regionálneho rozvoja, Trieda Andreja Hlinku 1, 949 74 Nitra, Slovensko; jan.morvic@student.ukf.sk

Abstract

The aim of the paper is an demogeographic analysis of the Žarnovica. We have analyzed human geographical conditions of Žarnovica. The Human geographical elements were analyzed in terms of population development, dynamics and structure. In the development we monitored the number of inhabitants from 1869 to 2011 (the latest census). In the second part of paper we analyzed the dynamics of the population (natality, mortality, increase), migration and the number of total movement and associated demographical and economical problems. The last part was aimed to the structure of inhabitants by biological, economic and cultural characteristics with links to other population processes.

Key words: *Žarnovica; the number of inhabitants; demogeographical characteristics; migration; natality; mortality*

Úvod

Cieľom príspevku je analyzovať vybrané demogeografické charakteristiky (vývoj počtu obyvateľov, prirodzený, migračný a celkový pohyb resp. štruktúry podľa jednotlivých znakov) na území mesta Žarnovica, poukázať na ich negatívny vývoj a definovať príčiny. Vývoj počtu obyvateľov bol sledovaný od roku 1869 do, zatiaľ posledného sčítania v roku 2011. Analýza pohybov a štruktúr obyvateľstva bola zhodnotená v rokoch medzi dvoma poslednými sčítaniami (2001-2011).

Vymedzenie územia

Mesto Žarnovica je centrom okresu. So súradnicami 48° 29' 18'' s. g. š a 18° 42' 28'' v. g. d. leží na strednom toku rieky Hron, ktorý prechádza územím okresu od severovýchodnej hranice s okresom Žiar nad Hronom až po juhozápadnú hranicu s okresom Levice [2].

Geografický stred mesta má výšku 230 m n. m. a najvyššie miesto dosahuje 252 m n. m.. S výmerou 30,4 km² malo mesto k 31. 12. 2011 6 476 obyvateľov s hustotou zaľudnenia 213 obyv. / km² [1].

Územie mesta je zložené zo štyroch mestských častí Lukavica, Revištské Podzámčie, Žarnovica a Žarnovická Huta.

Metodika

V článku bolo použitých niekoľko metód získavania a spracovávania informácií:

Metódou vysvetľujúceho opisu sme charakterizovali obyvateľstvo ako hlavný predmet výskumu demogeografie. Táto metóda bola použitá pri výbere témy ako vstupná fáza geografického poznávania daných problémov.

Kartografická metóda bola potrebná na vytvorenie mapového výstupu administratívneho vymedzenia mesta Žarnovica, zhotovená v programe Arc View 9.3 ©.

Matematické a štatistické metódy boli využité pri získavaní údajov zo Štatistického úradu Slovenskej republiky, ktoré boli následne spracované do tabuliek resp. grafov.

Na zmeny vo vývoji dynamiky a štruktúry obyvateľstva bolo poukázané prostredníctvom historicko-geografickej metódy.

Terénne metódy práce zahŕňajú mapovanie, pozorovanie, interview, zber štatistického materiálu v inštitúciách a fotodokumentáciu [2].

Demogeografické pomery

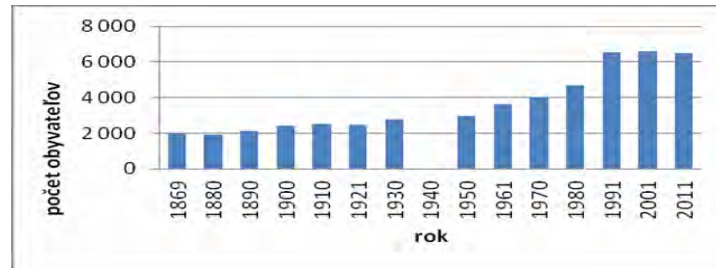
1 Vývoj počtu obyvateľov

Pravidelné sčítania ľudu podľa obcí boli na Slovensku uskutočňované pravidelne až od roku 1869, dovtedy sa počty obyvateľov odhadovali resp. boli sčítané celé župy [3].

Obdobie rokov 1869-1921 je charakteristické veľmi pomalým vzostupom početnosti obyvateľstva. V tomto časovom období pribudlo v meste len približne 500 obyvateľov.

Nasledujúce obdobie rokov 1921-1950 malo spočiatku pozitívny charakter vzostupu, neskôr však z dôvodu vojnového konfliktu (absencia údajov o početnosti obyvateľstva z roku 1940) došlo k poklesu. Napriek tomu aj toto obdobie 29 rokov zaznamenalo rast obyvateľstva v meste Žarnovica približne o 500. Najvyšší rast obyvateľstva charakterizuje obdobie rokov 1950-1991 a vzostup počtu z 3 000 v roku 1950 až na 6 300 v roku 1991.

Druhé obdobie (1921-1950) malo najprv pozitívny charakter rastu mestského obyvateľstva, pretože vidiecke sa začalo sťahovať do mesta. Hospodárska kríza v roku 1930 spôsobila pokles počtu obyvateľstva. Po 1. svetovej vojne v Žarnovici stúpila miera sobášnosti aj pôrodnosti. Ku koncu obdobia mali na vývoj počtu obyvateľov negatívny vplyv najmä hromadné deportácie nemeckého obyvateľstva, ktoré bývalo v okrajových častiach Žarnovice (obr. 1).



Obr. 1 Vývoj počtu obyvateľov mesta Žarnovica v rokoch 1869-2011

Obdobie rokov 1950-1991 predstavuje vlna industrializácie a presun obyvateľov z okolitých roztratených sídel do mesta. Počas tohto obdobia stúpol počet obyvateľov o viac ako 100 %.

Po roku 1991 dochádza k stagnácii počtu v dôsledku neustáleho zvyšovania nezamestnanosti, sociálnej neistoty a teda poklesu pôrodnosti. Stagnujúci počet trval do roku 2001.

Obyvateľstvo v období 2001 – 2011 charakterizujú pokračujúce negatívne vplyvy z obdobia predtým. Rastúca nezamestnanosť a spomínaná sociálna neistota sa prehĺbujú a spôsobujú u ľudí uprednostňovanie kariéry pred trvalým rodičovstvom, čo sa negatívne prejavuje v podobe ukazovateľov pôrodnosti, sobášnosti, rozvodovosti a mnohých ďalších [4].

2 Dynamika obyvateľstva

2.1 Prirodzený pohyb

Z hľadiska analýzy a definície príčin resp. dôsledkov súčasných demogeografických pomerov mesta bola venovaná pozornosť štatistickým údajom z posledných 2 sčítaní v rokoch 2001 a 2011 resp. obdobia medzi nimi.

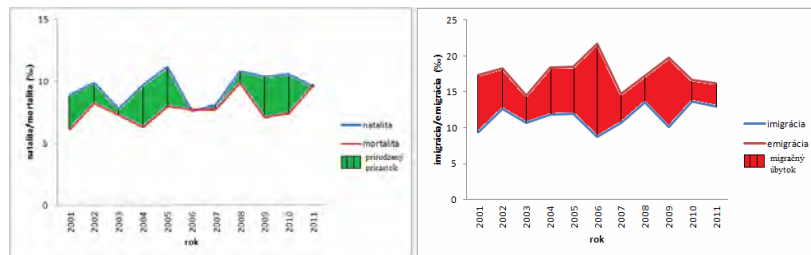
Mesto Žarnovica pre obdobie rokov 2001-2011 dosiahlo zápornú hodnotu rozdielu medzi natalitou a mortalitou, teda prirodzený úbytok, len v rokoch 2006 a 2011 so zanedbateľnou hodnotou -0,1 ‰ resp. -0,2 ‰, čo predstavovalo o 1 úmrtie obyvateľa viac ako bol počet narodených. V ostatných rokoch bola situácia priaznivá, maximum v roku 2005, kedy sa pri 52 úmrtiach narodilo až 73 obyvateľov (obr. 2).

Nízky prirodzený prírastok mesta je spôsobený už spomínaným uprednostňovaním kariérnych a pracovných postupov pred trvalým rodičovstvom z čoho pramení najmä vysoká rozvodovosť. Takisto absencia príležitostí, ktoré by skvalitnili život mladých obyvateľov mesta (nedostatočné kultúrne vyžitie, absencia bytov pre rodiny s deťmi a pod.).

2.2 Migračný pohyb

Celý interval rokov 2001-2011 je pre mesto Žarnovica charakteristický migračným

úbytkom obyvateľstva. Maximum migračného úbytku bolo dosiahnuté v roku 2006 s hodnotou -6,6 ‰, čo predstavovalo odsťahovanie 84 obyvateľov, minimum dosiahla táto hodnota v roku 2010, kedy pri prisťahovaní sa 87 ľudí odišlo len 105 (-18), čo predstavuje -2,8 ‰ (obr. 2).



Obr. 2 Prirodzený (vľavo) a migračný pohyb (vpravo) obyvateľov mesta Žarnovica v rokoch 2001-2011

Ukazovatele súvisiace s problematikou migrácie udávajú, že v meste nie je dostatočná sociálna a ekonomická základňa v podobe stabilných pracovných miest a bytov pre sociálne slabšie rodiny s deťmi, ktorá by znížila početnosť emigrácií a rast imigrácií.

2.3 Celkový pohyb

Tento ukazovateľ je výsledkom súčtu prirodzeného a migračného pohybu obyvateľstva mesta Žarnovica, ktorý je v celom období rokov záporný, okrem roku 2010 (+0,4 ‰). Najvyšší celkový úbytok bol zaznamenaný v roku 2006 s hodnotou -13,1 ‰ (prirodzený úbytok -0,1 ‰, migračný úbytok -13 ‰). Celkový prírastok reprezentuje už spomínaný rok 2010.

Zo všetkých ukazovateľov dynamiky populácie zahrnutých v celkovom pohybe obyvateľov Žarnovice vyplýva, že mesto každoročne stráca v priemere 20 obyvateľov. Prestarnuté obyvateľstvo postupne vymiera a novorodenecká základňa je málo početná [4].

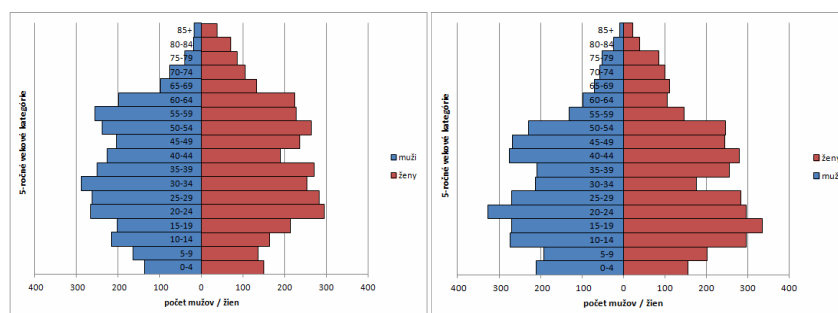
3 Štruktúra obyvateľstva

3.1 Štruktúra obyvateľstva podľa biologických znakov

Štruktúra podľa pohlavia sme sledovali v meste Žarnovica v období rokov 2001 a 2011. V roku 2001 predstavoval percentuálny podiel žien 51,6 ‰ (3 402 žien) a v roku 2011 sa tento podiel nepatrne znížil na hodnotu 51,2 ‰ (3 252 žien). Z týchto údajov vyplýva, že muži predstavujú menšinu (2001 – 3 194, 2011 – 3 164), ktorej početnosť mierne klesá (-30 mužov / 10 rokov).

Štruktúra podľa veku. Rok 2001 je z hľadiska typu vekovej pyramídy menej regresívny ako v roku 2011. V porovnaní rokov možno povedať, že najvýraznejšou negatívnou zmenou je pokles počtu obyvateľov vekových kategórií 0-4 (rok 2001 – 366, rok 2011 – 285), resp. nárast počtov v skupinách 30 – 34 (2001 – 388 a 2011 – 542) a 35-39

(2001 – 463, 2011 – 521). Obyvateľstvo mesta vymiera z dôvodu neustále sa zužujúcej novorodeneckej základne (obr. 3).



Obr. 3 5 ročná veková štruktúra obyvateľov mesta Žarnovica v rokoch 2001 (vpravo) a 2011 (vľavo)

Súčasná veková štruktúra obyvateľov mesta je výsledkom populačných procesov za posledných 60-100 rokov a ovplyvňuje budúce demografické procesy a formovania štruktúr s dôležitosťou pri populačnom plánovaní a prognózach. Obyvateľstvo staršie a novorodenecká základňa postupne nestačí dosahovať hodnoty početnosti zomretých.

3.3 Štruktúra obyvateľstva podľa kultúrnych znakov

Štruktúra podľa vzdelania je jednou z pozitívnejších ukazovateľov mesta Žarnovica, pretože v roku 2011 malo najväčší podiel vzdelanie vysokoškolské (24, 3 %), čo predstavuje nárast oproti roku 2001 až o 10, 5 % (2001 - 13, 8 %). V roku 2001 dominovalo vzdelanie učňovské (bez maturity) s 23 %, ktoré má dnes už len 13, 4 % zastúpenie.

Rok 2001 z hľadiska vzdelanostnej štruktúry reprezentovala dominancia vzdelania učňovského (bez maturity) pretože v minulosti či už práca v baniach, v najväčšom kovospracujúcom závode Sandrik a. s. (Hodruša - Hámre) alebo v Preglejke Žarnovica (drevospracujúci závod) nevyžadovali vyššie vzdelanie a zamestnávali viac ako 2/3 obyvateľstva. Zvyšovanie početnosti pracovných miest v terciárnej sfére spôsobilo povinnosť zvyšovania kvalifikácie aj prostredníctvom vysokoškolského vzdelania (2011 – 24, 3 %).

Štruktúra podľa náboženstva. V roku 2001 sa 79 % obyvateľov hlásilo k rímskokatolíckemu vierovyznaniu, druhou najpočetnejšou skupinou bola skupina bez vyznania (15 %). Rok 2011 charakterizuje 68 % obyvateľov, ktorí sa hlásia k rímskokatolíckemu a 14 % bez vyznania.

Religiózná štruktúra vykazuje jednostrannosť v podobe dominancie rímskokatolíckeho vierovyznania, druhá najpočetnejšia skupina sú obyvatelia bez vyznania ako dôsledok uprednostňovania iných záujmov mladej generácie pred náboženstvom.

Štruktúra podľa národnosti. Obyvateľstvo je homogénne, prevažuje národnosť slovenská (96 % - 2001, 88 % - 2011). Oproti roku 2011 pribudla národnosť moravská (4

obyvatelia) a nik sa už nehlási k rusínskej národnosti.

V národnostnej štruktúre prevládajú Slováci, čo vyplýva najmä z geografickej polohy mesta nachádzajúceho sa v Slovenskom stredohorí a teda vzdialeného od hraničných oblastí, kde žije viac príslušníkov menšín [4].

Záver

Cieľom, ktorý bol stanovený v úvode bola demogeografická analýza územia mesta Žarnovica. Charakterizovali sme vývoj počtu obyvateľov, prirodzený, migračný a celkový pohyb ako aj štruktúru na základe biologických a kultúrnych znakov. Okrem vývoja počtu obyvateľov, kde sme použili štatistické údaje od roku 1869 išlo vždy o komparácie dát obdobia rokov 2001-2011. Na základe údajov boli analyzované príčiny a dôsledky daných problémov a ich vplyv na ostatné populačné procesy.

Tento príspevok môže v budúcnosti slúžiť ako podkladový materiál pre ďalší výskum súvisiaci s tvorbou plánu hospodárskeho a sociálneho rozvoja mesta pozostávajúceho z komplexnej geografickej charakteristiky mesta. Ďalej ako podklad pri tvorbe projektov a ďalších aktivít týkajúcich sa regionálneho rozvoja. V blízkej budúcnosti bude v meste prebiehať dotazníkový výskum s otázkami zameranými na regionálny rozvoj Žarnovice, ktorého výsledky budú zverejnené v diplomovej práci a použité na tvorbu a realizáciu projektu.

Pod'akovanie

V tomto pod'akovaní sa chcem odvd'áciť konzultantovi, RNDr. Lucii Šolcovej, PhD. za pomoc pri tvorbe článku.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Štatistický úrad Slovenskej republiky. [Citované: 28. február 2013]
<<http://portal.statistics.sk/showdoc.do?docid=4>>
- [2] Korec P. a kol. (1989) Ekonomická geografia I. Univerzita Komenského, Bratislava, SR, p. 6
- [3] Geografia Slovenska. [Citované: 28. február 2013]
<<http://www.kgrr.fpv.ukf.sk/GSR/vyvoj.htm>>
- [4] Morvic J. (2012) Komplexná geografická charakteristika mesta Žarnovica. Univerzita Konštantína Filozofa, Nitra, p. 7

Zmeny využitia zeme v kopaničiarskom osídlení na príklade obcí Krajné a Podkylava v kontexte prebiehajúcich transformačných procesov

Miriama Mramúchová

*Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra regionálnej geografie, ochrany a plánovania krajiny, Mlynská dolina B-1, 842 15, Bratislava, Slovenská republika;
m.mramuchova@gmail.com*

Abstract

Scattered settlement is one of the well-preserved historical landscape structures in Slovakia, therefore we will focus on this area. The basis of this paper will be a municipalities Krajné and Podkylava and it's history connected with agriculture and its gradual transformation after year 1989. Using the aggregate value of land types and previous researches in this area, we want to point out the changes in land use.

KLúčové slová: kopaničiarske osídlenie; využitie zeme; transformácia poľnohospodárstva

Úvod a formulácia cieľa

Tak, ako všetko vo svete má svoj čas zániku, tak ani súčasná situácia v obciach so vzácnym kopaničiarskym osídlením nemá večné trvanie. Preto treba zachytiť blízku minulosť zo spomienok ľudí a zistiť, ako súčasnosť formujú deje minulé a ako sa transformuje obyvateľstvo žijúce na kopaničiach. Ako tvrdí Huba [1], na základe poznania vlastností súčasného stavu rozptýleného osídlenia na Slovensku je potrebné skúmať tento jav celostne. Vzhľadom na obmedzenú obšírnosť nášho príspevku sme si za základný cieľ zvolili vývoj poľnohospodárstva, ktoré vďaka združstevňovaniu a zakladaniu JRD v 50-tych rokoch prešlo veľkým rozmachom, a s tým spojenými zmenami týkajúcich sa kolektivizácie pôdy. Ďalej zhodnotenie zmien vo využívaní zeme na príklade obcí Krajné a Podkylava v kontexte prebiehajúcich transformačných procesov. Pomocou úhrnných hodnôt druhov zeme, dostupných za roky 2001-2012, si vyhodnotíme nárasty a naopak poklesy za jednotlivé druhy zeme a určíme si ich príčiny. V závere výskumu vám predstavíme aktuálnu situáciu využívania potenciálu pôdy v obciach.

Materiál a metódy

Materiál na tento príspevok sme čerpali z viacerých zdrojov (bakalárska práca, odborné články, knižné publikácie) a to predovšetkým od slovenských autorov (Bodnár, 1911; Huba, 1989, 1990; Labuda 2006, 2009, 2011; Lauko 1984; Lukačka 1992; Solín, Cebecauer 1998; Spišiak 1994, 2005; Stankoviánsky 1977 a i.), zaoberajúcich sa danou

problematikou. Dáta týkajúce sa využitia zeme (úhrnné hodnoty druhov pozemkov) za roky 2001-2012 pochádzajú z portálu www.katasterportal.sk. Významná časť príspevku bola zostavená na báze terénneho výskumu, rozhovorov so starostami, obyvateľmi. Mimoriadne cenné informácie sme získali priamo z obecných kroník a interných materiálov. Z metód výskumu v regionálnej geografii sme využili prvky z kamerálnych metód, kauzálnu a funkčnú analýzu, v neposlednom rade genetickú. Základom boli terénne metódy a na záver generalizácia.

Vymedzenie územia

Skúmané obce Krajné a Podkylava sa nachádzajú na západnom Slovensku, v regióne Myjavy. Z hľadiska tohto regiónu ich lokalizujeme na JV, kde už hraničia so susednými okresmi (obr. 1). Spoločným menovateľom pre obe vidiecke obce sú kopanice. J. Hromádka [3] tvrdí, že kopaničiarske sídla vznikli kolonizáciou zalesnených plôch ako pôvodne pastierske osady, ktoré až neskôr, keď sa delili majetky, prechádzali k roľníctvu.



Obr. 1 Poloha obcí Krajné a Podkylava; Zdroj [2]

Výsledky a diskusia

V 2. pol. 19. st. patril okres Myjava medzi územia s najväčšou rozdrobenosťou pôdy (priemerná rozloha parcely bola 0,25 ha). Príznačnou črtou územi obcí a príslušných kopanic tak bola mozaika malých, úzkych poličiek, orientovaných zvyčajne po vrstevnici, menej po spádnici a lineárnych krajinných prvkov ako medze, poľné cesty a chodníky, ktoré tieto polička oddeľovali. Posledný zásah do využívania zeme v oblasti Myjavskej pahorkatiny má na svedomí kolektivizácia poľnohospodárstva, ku ktorej došlo po spoločenských zmenách

v bývalej ČSR v roku 1948 [4]. Stáročiami budovaný vzťah roľníkov k pôde sa lámal veľmi ťažko. Socializácia dediny sa musela previesť, aby sa pozdvihla životná úroveň ľudu.

V r. 1969 došlo k zlúčeniu dovtedy samostatne hospodáriacich družstiev - Krajné, Podkylava, Babulicov vrch a Matejovec do jedného veľkého ekonomického celku [5]. Družstvo sa vypracovalo zo začiatkových 93,5 ha (1952), na 2200 ha po zlúčení s JRD Matejovec a Babulicov vrch [6]. S cieľom získať ďalšiu ornú pôdu v rámci rekultivácií a meliorácií dochádzalo v tomto období opätovne k významným zásahom do krajiny [4]. Využitiu zeme pred kolektivizácie a po roku 1990 na príklade obce Krajné sa vo svojej práci venovali Solín, Cebecauer (1998). Z ich diela môžeme získať dobrú predstavu o výrazných zmenách, ktoré sa v krajine udiali za pomerne krátke časové obdobie. Labuda, Pavličková [7] zisťujú, že pre obdobie pred kolektivizácie poľnohospodárstva je typická heterogenita vytvorená striedaním malých pásov rozdielnych plodín, ktorými majú obsiate role súkromníci. Vnútoraná štruktúra jednotiek po kolektivizácii je už homogénna, čo bolo spôsobené scelením a obsiatím veľkých družstevných lánov monokultúrnou plodinou.

V rokoch 1990-1993 boli schválené zákony o reštitúcii, privatizácii a transformácii. Družstvá prešli do formy podielnických družstiev. V roľníckom podielnickom družstve Krajné bola situácia veľmi nepriaznivá, družstvo svojím spôsobom skrachovalo. Niekoľko bývalých členov však založilo nové družstvo, ktoré má svoj podnikateľský plán a je podporované tiež z financií európskych fondov. Družstvo identifikuje majiteľov parciel, vymieňa ich s vlastníkmi a skupuje ich, aby mohlo hospodáriť na veľkých plochách. Taktiež obnovuje vozový park a živočíšnu výrobu. Budovy hospodárskeho dvora sa prenajímajú súkromným firmám, keďže často nie sú dostatočne využívané. 58 ha slivkový sad sa omladzuje a každoročne produkuje približne 50 ton ovocia na veľkopredaj. Ďalšiu aktivitu, ktorú v družstve zaviedli, je chov oviec a koní.

V Podkylave sa podarilo získať dostatok finančných prostriedkov a od roku 2008 tu prebieha sceľovanie pozemkov, tzv. komasácia - sceľovanie pozemkov rozptýlených v chotári obce do kompaktného pozemkového celku s cieľom hospodárnejšie ovládať a využívať pôdu [8]. Avšak najväčší krok v modernom hospodárení sa udial v založení ekologickej farmy – biofarmu. Cieľom bolo využiť pasienky na ekologický chov dojčiacich kráv v prírodných podmienkach, voľne v prírode a „bez hraníc“ za účelom realizácie myšlienky trvalo udržateľného regiónu, ochrany pôdy a životného prostredia. Konečným cieľom bolo zapojenie všetkých zložiek do agroturistického projektu s využitím prírodných jedinečností [9]. Zámer sa podaril a v súčasnosti má podnikateľ skúpené takmer všetky pasienky v k.ú. Podkylava o rozlohe viac ako 300 ha. Orientuje sa na americké plemeno hovädzieho dobytká

Charolais chované na mäso, zriedkavé plemeno ošípaných Mangalice, kone a využíva ich na agroturistiku. Dobytok sa pasie v prirodzených podmienkach, bez akéhokoľvek použitia priemyselných hnojív, chemických prostriedkov a umelého prikrmovania. Podkylava predstavuje dôkaz, ako z malej, neznámej a vymierajúcej obce spraviť lákadlo pre cestovný ruch, ktorý dokáže stimulovať rozvoj celého regiónu a životnej úrovne svojich obyvateľov. V neposlednom rade je vhodným príkladom, aké výhody prináša aplikácia ekologického poľnohospodárstva a agroturistiky ako dynamicky sa rozvíjajúceho segmentu cestovného ruchu.

Aby sme demonštrovali aj súčasnú situáciu a zmeny spojené s využívaním zeme za posledných 10 rokov, spracovali sme dáta ÚHDP v rozmedzí rokov 2001 – 2012 (tab. 1). Na základe výpočtu indexu rastu môžeme vypočorovať nárast alebo pokles vo výmere plôch. Ak si vzájomne porovnáme skúmané obce a najmä celkovú výmeru, vidíme nárast v prípade Krajného a naopak pokles pri Podkylave, čo nepochybne súvisí so vzájomným odstúpením časti územia Zbehy.

Obec Krajné zaznamenala v skúmanom období (2001-2012) najväčší nárast v rámci TTP a to z 259 ha na 318,7 ha. Spôsobené je to najmä súčasným trendom zatrávňovania a využívaním plôch ako lúk a pasienkov. Ďalším faktorom tento zmeny je neobrábanie, keďže množstvo pozemkov je lokalizovaných na ťažko dostupných miestach. V neposlednom rade je to tiež nevyriešené vlastníctvo pôdy alebo nezáujem o aktívne zúrodňovanie. Snahy RPD Krajné o úpravy pozemkov, ktoré sme spomínali vyššie (spájanie a zamieňanie, aby sa mohla osievať pôda veľkých výmerov), sa pozitívne prejavujú na náraste výmery ornej pôdy, ktorý sa bude pravdepodobne ešte zvyšovať.

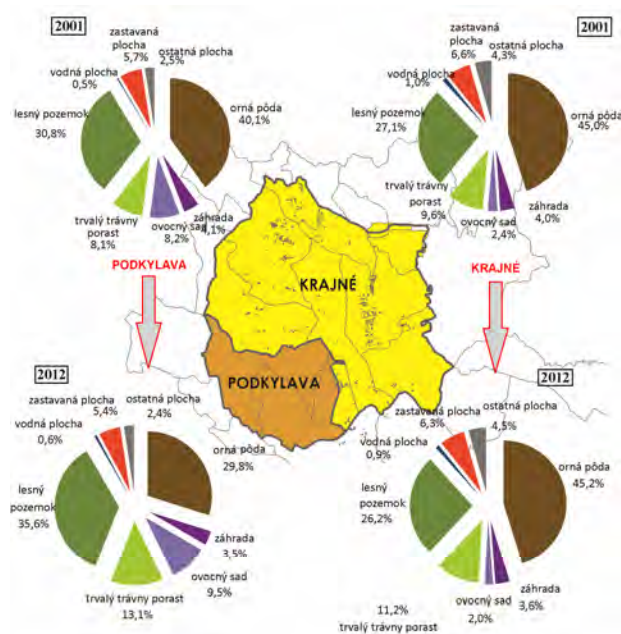
V obci Podkylava je situácia pri ornej pôde presne opačná - z pôvodného podielu 40,1% klesla na 29,8%. Je však zrejmé, že tento pokles súvisí aj so zmenou výmery katastra. Z tabuľky je však dobre zreteľná iná výrazná zmena - TTP sa z pôvodných 81 ha v 2001 pretransformovali až na 111,3 ha v roku 2012. Zásluhu na tom má Agrofarma v Podkylave, ktorá tieto pozemky využíva na spásanie pre hovädzí dobytok a kone. Pri terénnom výskume sú tieto obrovské plochy ľahko identifikovateľné. Z ďalších trvalých kultúr sem zaradujeme i ovocné sady, záhrady a sadové lúky.

Percentuálne zobrazenia jednotlivých kategórií sú zobrazené na obr. 2 ako porovnanie začiatočného a koncového roku sledovaného obdobia (2001 a 2012).

Tab. 1 Úhrnné hodnoty druhov pozemkov v obciach Krajné a Podkylava v rokoch 2001-2012 (v ha)

	rok	celková výmera v m ²	poľnohospodárska pôda				lesný pozemok	vodná plocha	zastavaná plocha	ostatná plocha
			orná pôda	záhrada	ovocný sad	trvalý trávny porast				
Krajné	2001	2698,22	1214,55	107,61	63,67	258,95	732,08	27,07	177,70	116,60
	2002	2698,22	1214,50	107,41	63,67	259,16	732,08	27,07	170,53	123,81
	2003	2698,22	1214,30	107,52	63,34	259,53	732,08	27,07	170,98	123,42
	2004	2698,22	1193,75	107,00	63,33	280,59	732,08	27,08	171,20	123,20
	2005	2698,22	1189,24	106,81	63,33	285,21	732,08	27,08	171,24	123,23
	2006	2698,22	1189,19	102,06	63,33	289,90	732,01	27,11	172,00	122,62
	2007	2698,22	1180,14	101,48	63,33	299,46	732,01	27,11	172,09	122,61
	2008	2698,22	1179,34	101,09	63,33	300,64	731,43	27,11	172,24	123,04
	2009	2846,66	1282,78	107,88	64,64	315,93	738,95	27,24	181,70	127,55
	2012	2846,66	1290,26	103,83	103,83	58,10	318,80	749,53	27,08	181,36
index rastu (2012/2001)			106,23	96,49	91,24	123,11	102,38	100,04	102,06	109,52
Podkylava	2001	995,51	398,85	40,64	81,19	80,94	306,89	4,98	56,82	25,19
	2002	995,51	362,02	40,43	81,19	117,89	308,95	4,98	54,85	25,20
	2003	995,51	362,02	40,43	81,19	117,89	308,95	4,92	54,85	25,25
	2004	995,51	388,01	40,13	81,19	92,17	308,95	4,92	54,84	25,30
	2005	995,51	388,01	40,18	81,19	92,23	308,95	4,91	54,69	25,35
	2006	995,51	359,72	39,58	81,19	121,27	308,95	4,90	54,58	25,32
	2007	995,51	359,72	39,56	81,19	121,27	308,95	4,90	54,60	25,32
	2008	995,51	359,42	39,56	81,19	121,45	308,95	4,90	54,72	25,32
	2009	847,07	256,03	30,70	79,50	108,55	301,36	4,76	45,54	20,62
	2012	847,07	252,79	29,77	80,59	111,27	301,36	4,76	45,83	20,69
index rastu (2012/2001)			63,38	73,25	99,25	137,47	98,20	95,63	80,66	82,15

Zdroj: [10]

**Obr. 2** Zmeny vo využití zeme podľa ÚHDP v obciach Krajné a Podkylava v rokoch 2001-2012 (v %); Zdroj: [10]

Záver

Naším krátkym príspevkom sme sa pokúsili priblížiť významnú úlohu, ktorú zohralo poľnohospodárstvo vo vidieckych obciach kopaničiarskeho regiónu. Snažili sme sa zhodnotiť, ako sa vybrané obce dokázali prispôbiť závažným ekonomickým zmenám, ktoré nastali po roku 1989. Nové politicko-spoločenské usporiadanie znamenalo pre obce s jednostrannou orientáciou na poľnohospodárstvo takmer istú záhubu. V dnešnej dobe treba hľadať riešenia na maximálne využitie prírodného potenciálu tejto malebnej oblasti a pomocou alternatívnych foriem hospodárenia zabezpečiť trvalú udržateľnosť vidieka a zlepšiť tak environmentálny a ekonomický stav regiónu.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Huba M. (1990) Geografický časopis 42(2), p. 113
- [2] Hromádka J. (1943) Všeobecný zemepis Slovenska, *Slovenská vlastiveda I.* Bratislava, SAVU, p. 256
- [3] Podkladová mapa SVM 1:50000
- [4] Stankoviansky M. (2003) Geomorfologická odozva enviromentálnych zmien na území Myjavskej pahorkatiny. UK Bratislava, Bratislava, p. 152
- [5] Lukačka J. (1992) Krajné 1392-1992. Bratislavské tlačiarne, Bratislava, p. 114
- [6] Interné zdroje RPD Krajné
- [7] Labuda M., Pavličková K. (2006) AFRNUC 14(1), p. 65
- [8] Spišiak P. a kol. (2005) Agrorurálne štruktúry Slovenska po roku 1989. 1.vyd. Bratislava: Geo-grafika, Bratislava, p. 186
- [9] Tíčík V. Budúcnosť očami minulosti. PB Desing
- [10] Katastrálny portál [Citované: 26. apríl 2012]
<<https://www.katasterportal.sk/kapor/uhdpFormInit.do>>

Participativní mapování vodních zdrojů – Koffiekraal, Jihoafrická republika

Jiří Pánek

Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra rozvojových studií, tř. 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Česká republika; jirkapanek@gmail.com

Abstrakt

Participatory Mapping and Participatory GIS (PGIS) are new trends that have arisen in the last three decades among those who criticize classical GIS as rigid and disembodied, too objective and focused on technical “solutions” while forgetting about the human stories behind the data. These new approaches are context- and issue-driven and seek community empowerment rather than technology usage.

In this article, I will outline the methodologies applied during community mapping initiatives in Koffiekraal — a rural village in the North-West Province of South Africa with special attention given to the water resources mapping and management. Secondly I will present the differences in calculating the water points coverage area and its implication for the community water resources management.

Klíčová slova: *participativní mapování; Koffiekraal; participativní GIS; správa vodních zdrojů*

Úvod a formulace cíle

Participativní mapování¹ se jako samostatná disciplína historicky vyvinula z přístupu participativního hodnocení venkova (Participatory Rural Appraisal – PRA) a je ze všech jeho vizuálních metod nejrozšířenější. Jeho popularita vychází především z univerzálnosti a jednoduchosti, ale i z pocitů zadostiučinění a zábavy, které celý proces účastníkům (komunitě) přináší. Přestože jedny z prvních případů využívání místních prostorových znalostí v rozhodovacím procesu sahají až do dob před americkou občanskou válkou, byl to až posun v rozvojové spolupráci v 70. letech 20. století, který přinesl větší využití mapování v komunitním rozvoji [1, 2].

Již od prvních mapovacích pokusů na africkém kontinentě bylo jasné, že mapy jsou a budou nástrojem technologické nadvlády evropských koloniálních mocností/kolonizátorů. Mapování v koloniální Africe probíhalo na základě potřeb třech hlavních odvětví – obchodu, správy a armády. Komerční mapování probíhalo například v Německé jihozápadní Africe², a to pod vedením organizací jako *Deutsche Kolonialgesellschaft für Südwestafrika* či *Deutsche Diamanten-Gesellschaft*. Velká Británie mapovala své kolonie především s ohledem na následnou jednodušší správu a jejím hlavním cílem bylo skrze podrobné katastrální mapování zvednout výběr daní v jednotlivých koloniích za pomoci hlavního mapovacího orgánu,

¹ Občas se také používá termín komunitní mapování.

² Toto území se v roce 1990 osamostatnilo a nyní se jedná o Namibii.

kterým byl *Ordnance Survey*. Toto však platilo především pro Indii, kde britská Východoindická společnost založila samostatnou složku pod názvem *Survey of India* (SoI). Tento model katastrálního mapování pro jednodušší výběr daní byl později převeden i do afrických kolonií pod správou Velké Británie. Ve francouzských koloniích měla mapování na starosti *le Service Géographique de l'Armée* (SGA) a, jak již název napovídá, jednalo se především o vojenské mapování jednotlivých oblastí [3–5].

Zkušenosti původních obyvatel s mapováním, nejen v Jihoafrické republice, jsou tedy především negativní, stejně jako jejich postoj k využívání map v rozvojových projektech v 60. a 70. letech 20. století. Tato situace se začala měnit až v 70. letech 20. století. Participativní mapování v kombinaci s komunitním empowermentem³ a udržitelným rozvojem jsou hlavní pilíře metodologie CAMP (Community Asset Mapping Programme), která prostřednictvím komunitní práce bojuje s vesnickou chudobou.

Empowerment v oblasti rozvojových studií je přístup, na jehož základě dochází k posilování cílových skupin nebo jednotlivců účastnících se procesu rozvoje či začleněných do konkrétních rozvojových projektů. Jedná se také o schopnost samostatně se rozhodovat a taková rozhodnutí realizovat. Empowerment může být také chápán jako prostředek kolektivní mobilizace marginalizovaných sociálních skupin proti systému [6, 7].

Udržitelným rozvojem je chápán rozvoj, který uspokojuje potřeby současnosti bez ohrožení potřeb budoucnosti. Klíčovým principem je princip předběžné opatrnosti a tím pádem se jedná o rozvoj, který nesmí ohrozit rozvoj budoucí, nebo nesmí zapříčinit úpadek v budoucnosti [7, 8].

Cílem článku je prezentovat metody participativního mapování jako jednoho z možných nástrojů pro komunitní správu a řízení zdrojů na příkladě vodních zdrojů ve vesnici Koffiekraal v Jihoafrické republice.

Metodologie

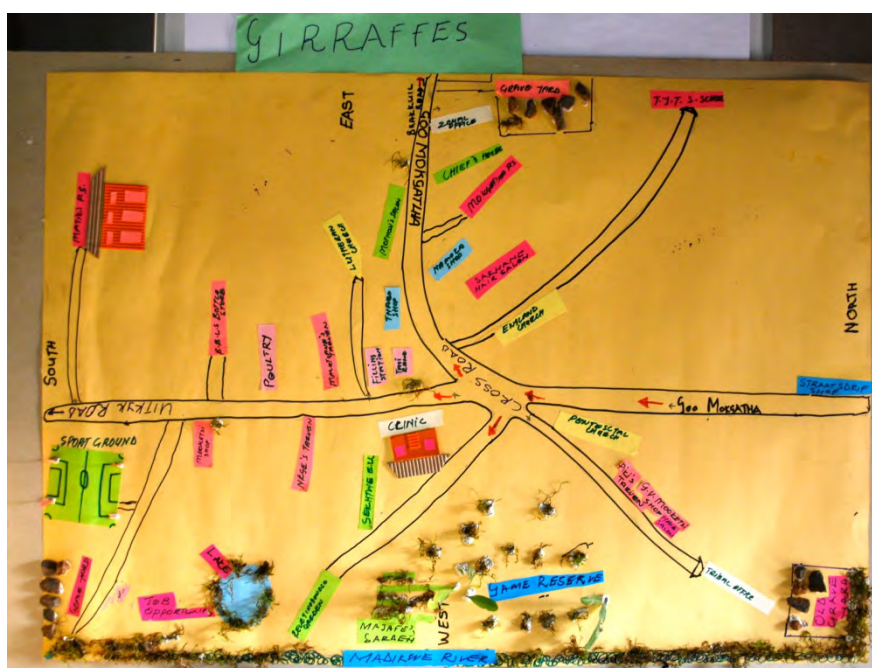
Informace o lokalizaci vodních zdrojů byly získány z map, které vznikly jako výstup komunitního mapování v Koffiekraal v srpnu 2012. Proces komunitního mapování se skládal z následujících kroků:

- tvorba mentální mapy,

³ Jasný překlad tohoto slova do češtiny neexistuje. V některých případech se používá slovo „posílení“, které však nedostatečně vystihuje význam anglického termínu „empowerment“. Z tohoto důvodu se autor práce rozhodl používat anglický termín s vědomím, že se může občas jednat o komplikaci pro čtenáře.

- metoda Transect walk⁴,
- interpretace leteckých snímků oblasti,
- tvorba komunitní mapy.

Výsledky mapování byly následně prezentovány ostatním členům komunity a v případě Koffiekraal byly importovány do OpenStreetMap (OSM), která bude v budoucnu sloužit jako nástroj vizualizace místních prostorových znalostí v online prostředí. Místní prostorové znalosti (local spatial knowledge – LSK) jsou pro většinu komunit mnohem přirozenější, a proto může OpenStreetMap skrze body, linie a polygony sloužit jako prostor pro začlenění LSK s karteziánskou reprezentací prostoru [9]. Platforma OpenStreetMap byla vybrána, přestože Hakley [10] tvrdí, že existují místa, která „prostě nikdo mapovat nechce“. Na druhou stranu Pánek [11] vidí silné stránky ve využívání OpenStreetMap pro projekty komunitního mapování, na rozdíl například od konkurenčního nástroje Google Map Maker.



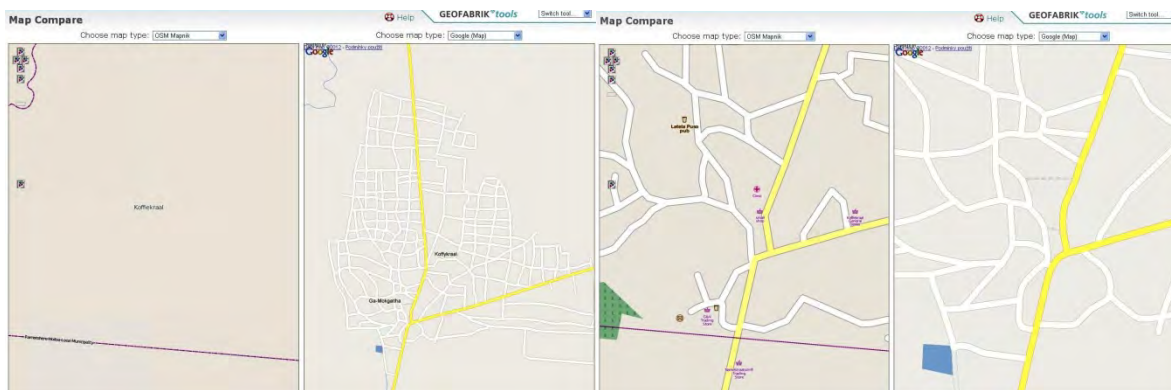
Obr. 1 Ukázka komunitní mapy vesnice Koffiekraal

Komunitní mapy sloužily jako základní referenční zdroj informací pro následné mapování zdrojů pitné vody v Koffiekraal. Celkem bylo zaměřeno 66 veřejných zdrojů pitné vody a 68 domů s vlastním zdrojem pitné vody. Podle zákonů Jihoafrické republiky by občan neměl docházet k nejbližšímu zdroji pitné vody více než 200 metrů a v oblastech s členitým terénem by tato vzdálenost měla být ještě kratší [12].

Silniční síť, která byla posléze využita pro síťovou analýzu, byla získána z mapového

⁴ Občas také nazýváno *Transect mapping*

podkladu Koffiekraal na OpenStreetMap. Rozdíl mezi kvalitou pokrytí vesnice před a po komunitním mapování ilustrují Obr. 2 a 3.



Obr. 2 a 3 Srovnání Koffiekraal na OpenStreetMap a Google Maps před (21. 8. 2012) a po (2. 11. 2012) komunitním mapování v Koffiekraal

Výsledky a diskuze

Bodová vrstva vodních zdrojů společně s liniovou vrstvou silnic a leteckým snímkem oblasti znamenaly základní vstupní data pro následující analýzy. Vzhledem k nesprávné topologii dat z OSM bylo nejprve potřeba upravit liniovou vrstvu pomocí příkazu *Split Line At Vertices* v prostředí ArcMap 10.0.

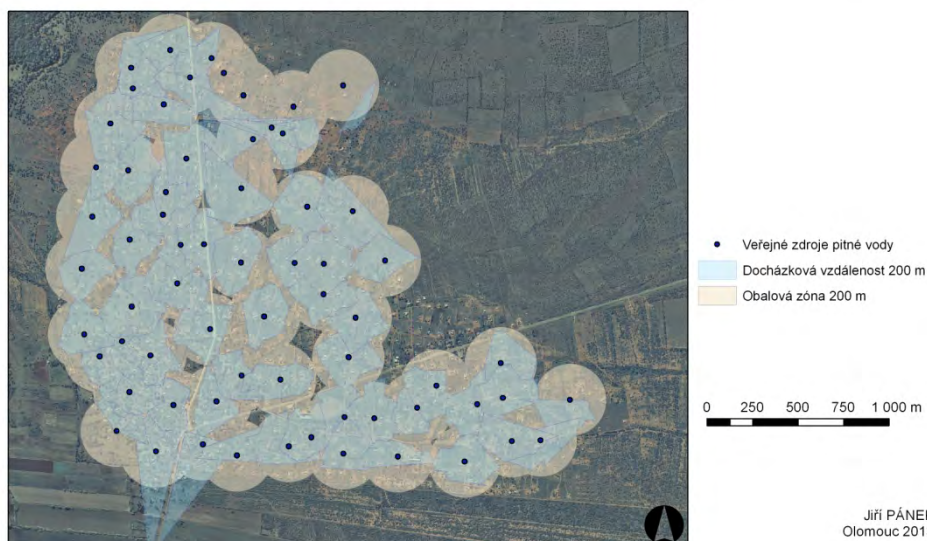
Okolo bodové vrstvy byl vytvořen buffer s hodnotou 200 metrů, který byl posléze porovnán s 200metrovou vzdáleností v síťové analýze. Zde autor využil funkci *Service Area* z extenze *Network Analyst*. Srovnání výsledků z bufferu a obslužných ploch ze síťové analýzy naleznete v Tab. 1 a Obr. 4. Buffer zóny pokrývají 89 % rozlohy Koffiekraal, avšak při využití síťové analýzy je zjištěno, že v dočázkové vzdálenosti 200 metrů je pokryto pouze 60 % Koffiekraal.

Tab. 1 Srovnání výsledků přístupnosti k jednotlivým zdrojům vody

Buffer zóny (200 m)	Service Area (200 m)	Celková rozloha Koffiekraal
4,84 km ²	3,27 km ²	5,45 km ²

Srovnání metod Buffer a Service Area pro vizualizaci dostupnosti vodních zdrojů

Koffiekraal, Jižní Afrika v roce 2012



Obr. 4 Srovnání metod Buffer a Service Area pro vizualizaci dostupnosti vodních zdrojů v Koffiekraal

Závěr

Výsledky analýzy ukazují, že oblast na východě obce Koffiekraal, která leží severně od hlavní silnice, je nedostatečně pokryta veřejnými vodními zdroji. V této oblasti se také nachází pouze jeden dům s vlastním zdrojem pitné vody. Ostatní obyvatelé jsou nuceni docházet k nejbližšímu zdroji pitné vody dále, než je zákonem stanovených 200 metrů. Autor si je vědom, že kvalita silniční sítě v Koffiekraal není dostatečná pro analýzu, která by měla jasnou vypovídající hodnotu, ale i při současném stavu je možné pozorovat určité trendy v hustotě a množství vodních zdrojů v jednotlivých částech vesnice.

Vytváření vlastní mapy a její následné využití v prostorových analýzách, které se přímo týkají jejich tvůrců, má silný efekt empowermentu. Členové komunity mají možnost nejen myslet v prostorových souvislostech, ale také nově vnímat jejich komunitu v jiném světle a doslova umístit jejich problém na mapu. Proces tvorby dat a jejich analýzy zintenzivňují pocity příslušnosti ke komunitě a k vesnici, zvyšují pocit sounáležitosti a zapojení do celého procesu rozvoje vesnice. Tímto způsobem lze docílit udržitelného rozvoje komunity, který bude řízen a iniciován zespodu⁵ [13].

Poděkování

Autor práce by rád poděkoval pracovníkům Katedry geografie *University of South*

⁵ Z anglického termínu bottom-up development nebo také community driven development

Africa (UNISA) a pracovníkům nevládní neziskové organizace *Greater Rustenburg Community Foundation* za jejich pomoc a podporu během výzkumu. Speciální dík patří panu A. C. Vlokoví z UNISA za odborné vedení a cenné rady.

Seznam použité literatury

- [1] Chambers R. (2006) *The Electronic Journal of Information Systems in Developing Countries* 25
- [2] Turnbull D., Watson H. (1993) *Maps are territories: Science is an atlas: a portfolio of exhibits*. Chicago: University of Chicago Press, USA
- [3] Moser J. (2005) *International Cartographic Conference, A Coruña 2005.*,
- [4] Moser J. (2006) *International Symposium on "Old Worlds-New Worlds": The History of Colonial Cartography 1750 -1950*, no. August.
- [5] P. Collier, "How shall africa be mapped? French and british responses to the needs of colonial mapping," in *International Cartographic Conference, A Coruña 2005.*, 2005.
- [6] Friedmann J. (1992) *Empowerment: the politics of alternative development*. Blackwell, Malden, USA
- [7] Dušková L., Harmáček J., Krylová P., Z. Opršal Z., Syrovátka M., Šafaříková S. (2011) *Encyklopedie rozvojových studií*. Univerzita Palckého v Olomouci, Olomouc, p. 422
- [8] UNWCED (1987) *Our Common Future*. Oxford University Press, USA , p. 400
- [9] Weiner D., Warner T.A., Harris T. M., Levin R. M. (1995) *Cartography and Geographic Information Science* 22(1), p. 30
- [10] Haklay M. (2010) *Environment and planning. B, Planning & design* 37(4), p. 682
- [11] Pánek J. (2012) *GISSA Ukubuzana 2012 Conference Proceedings*, Johannesburg, JAR, p. 78
- [12] Department of Water Affairs and Forestry (1994) *White Paper: Water Supply and Sanitation Policy*. Cape Town, JAR, p. 38
- [13] Vlok C., Pánek J. (2012) *GISSA Ukubuzana 2012 Conference Proceedings*, Johannesburg, JAR, p. 38

Výpočet kartografického pólu pre valcové zobrazenia

Vladimír Pelech

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra kartografie, geoinformatiky a diaľkového prieskumu Zeme, Mlynská Dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko; v.pelech@centrum.sk

Abstrakt

Article is about the optimization of calculation of the cartographical pole for cylindrical projection. Article describes the algorithm, which was applied to writing source code of the computer program for automatic calculation of the cartographical pole. For cylindrical projection applies, that the distortions only depends on values of the cartographical latitude. The objective of this algorithm is achieved minimum range of cartographical latitude to decrease values of distortions. The thesis moreover compares the result of the manual calculation of the cartographical pole with the computing result of the algorithmic ones' calculation. The output of the thesis is computer program for calculation of the cartographical pole.

Kľúčové slová: *kartografický pól; valcové zobrazenie; konvexný obal; optimalizácia*

Úvod a formulácia cieľa

Reálny povrch Zeme je zakrivený a charakteristický svojimi nerovnosťami (pohoria, doliny). Kvôli tomu nie je možné ho presne matematicky definovať a v našom prípade sme ho nahradili referenčnou guľou. [1]

Na určovanie polohy na referenčnej guľovej ploche môžeme využívať tri súradnicové systémy. Geografický súradnicový systém definuje zemepisné súradnice ako uhly - v stupňoch. Ide o geografickú šírku φ a geografickú dĺžku λ . Priestorový pravouhlý súradnicový systém, inak nazývaný aj karteziánsky, definujú štyri parametre, počiatok a osi X,Y,Z. Osi X a Y ležia v rovine rovníka a os Z je kolmá na predchádzajúce osi a splýva s osou referenčného telesa. Pravouhlé súradnice x, y, z sú potom vo vzťahu ku geografickým φ, λ podľa [2]:

$$\begin{aligned}x &= \cos \varphi \cos \lambda \\y &= \cos \varphi \sin \lambda \\z &= \sin \varphi\end{aligned} \quad [I.]$$

Okrem už spomínaných súradnicových systémov poznáme ešte kartografický súradnicový systém, ktorý je definovaný analogicky k svetovému súradnicovému systému a viaže sa na kartografický pól. Kartografickým pólom môže byť ľubovoľný bod na zemskom povrchu. Pojem kartografické zobrazenie predstavuje matematický vzťah na základe ktorého je možné jednoznačne priradiť súradniciam bodu na referenčnom telese (guľa, elipsoid) jeho súradnice v zobrazovacej rovinnej plochy, mapy. Každé kartografické zobrazenie je

matematicky presne vyjadrené vzťahom na prevod súradníc bodu z jednej súradnicovej sústavy do druhej. Tieto vzťahy poznáme pod názvom zobrazovacie rovnice. Ide o prevod súradníc na referenčnej guli (U, V) do rovinných pravouhlých súradníc (x, y). Kartografické zobrazenia sa delia podľa viacerých kritérií. Jedným z týchto kritérií je plocha, na akú sa dané územie zobrazuje. Môže ísť o plášť valca, kužeľa alebo rovinu a podľa toho hovoríme o valcovom, kužeľovom alebo azimutálnom zobrazení. Tieto zobrazovacie plochy sa využívajú kvôli ich rozvinuteľnosti do roviny bez ich ďalšieho skreslenia. [1]

Vo svojej práci využívame jednoduché valcové zobrazenia, ktoré využívajú ako zobrazovaciu plochu plášť valca. Pre valcové zobrazenia platí, že sa neskresľujú iba body ležiace na kartografickom rovníku, alebo pri sečnom valci body na sečných rovnobežkách. Ako referenčné teleso budeme uvažovať guľu, pre ktorú sú všeobecné zobrazovacie rovnice definované podľa [3]:

$$x = f(U) \quad \text{[II.]}$$

$$y = nV \quad \text{[III.]}$$

Podľa [2] je konštanta n určená z neskreslenej rovnobežky U_0 :

$$n = R \cos U_0 \quad \text{[IV.]}$$

Valcové zobrazenie je vhodné využiť pri územiach, ktoré sa nachádzajú v okolí rovníka, prípadne kartografického rovníka, keďže smerom od týchto rovnobežiek hodnoty skreslenia stúpajú rovnomerne oboma smermi a najviac sú skreslené oblasti okolo pólů.

Kvôli čo najvernejšiemu zobrazeniu územia na zobrazovaciu plochu je potrebné, aby sa rozvinuteľná plocha, v našom prípade plášť valca, čo možno najviac dotýkala referenčného telesa v mieste, ktoré chceme zobrazovať v mape. Význam uvedeného spočíva v tom, že os zobrazovacej plochy nebude vždy totožná s osou Zeme. Preto je nutné vyjadriť polohu na referenčnej ploche vzhľadom na nový pól, ktorého súradnice sme za vyššie spomenutým účelom zvolili. Takto určený pól sa nazýva kartografický. Operácie s kartografickým pólom sú dobre riešiteľné len na referenčnej guli aparátom sférickej trigonometrie.

Pri valcových zobrazeniach je kartografický pól vypočítaný z bodov dotykového rovníka. Na určenie presnej polohy pólu potrebujeme minimálne tri body ležiace na dotykovej rovnobežke daného územia. Pri valcových zobrazeniach postačujú iba dva body A, B na dotykovej rovnobežke, keďže za tretí bod považujeme stred Zeme. Tieto dva body A a B sme určili z najdlhšej ortodrómy bodov konvexného obalu (pojem bude vysvetlený nižšie). Ortodróma je myslená krivka medzi dvoma bodmi na guli, ktorej dĺžka je najmenšou možnou vzdialenosťou medzi týmito bodmi. Jej dĺžku z geografických súradníc A a B

dostanem podľa [1]:

$$\delta = \arccos(\cos\varphi_A \cos\lambda_A \cos\varphi_B \cos\lambda_B + \cos\varphi_A \sin\lambda_A \cos\varphi_B \sin\lambda_B + \sin\varphi_A \sin\varphi_B) \quad [\text{V.}]$$

Kartografický pól Q , ktorého kartéziánske súradnice x_Q, y_Q, z_Q vektora môžeme vypočítať pomocou normovaného vektorového súčinu:

$$\vec{q} = \frac{\vec{A} \times \vec{B}}{|\vec{A} \times \vec{B}|} \quad [\text{VI.}]$$

Z kartéziánskych súradníc x_Q, y_Q, z_Q potom dostaneme geografické φ_Q, λ_Q podľa [I.]:

$$\varphi_Q = \arcsin z_Q$$

$$y_Q \geq 0 \Rightarrow \lambda_Q = \arccos \frac{y_Q}{\cos \varphi_Q} \quad [\text{VII.}]$$

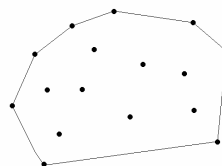
$$y_Q < 0 \Rightarrow \lambda_Q = -\arccos \frac{y_Q}{\cos \varphi_Q}$$

Po výpočte geografických súradníc kartografického pólu φ_Q, λ_Q musíme body zobrazovaného územia transformovať, aby sme dosiahli to, že dotyková rovnobežka sa stane kartografickým rovníkom. Jednotlivé body budeme transformovať vzhľadom na kartografický pól pomocou ich kartéziánskych súradníc x, y, z podľa [4]:

$$\begin{pmatrix} x' \\ y' \\ z' \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \sin\lambda_Q & -\cos\lambda_Q & 0 \\ \sin\varphi_Q \cos\lambda_Q & \sin\varphi_Q \sin\lambda_Q & -\cos\varphi_Q \\ \cos\varphi_Q \cos\lambda_Q & \cos\varphi_Q \sin\lambda_Q & \sin\varphi_Q \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} \quad [\text{VIII.}]$$

Geografické súradnice bodov dostaneme rovnako ako geografické súradnice pólu podľa [VIII.]. Práve tieto súradnice pre nás budú dôležité pri optimalizácii kartografického pólu.

Okrem optimalizácie sme sa rozhodli zredukovať počet vstupných bodov, vstupujúcich do optimalizácie na konvexný obal (ďalej KO). Podľa definície je KO množiny M najmenšia konvexná množina, ktorá obsahuje množinu M . Týmto krokom nám išlo o redukciu vysokého počtu bodov, príklad na obr. 1 (napr. pre Turecko z viac ako 222 000 bodov na 37, pri šiestich desatinných miestach).



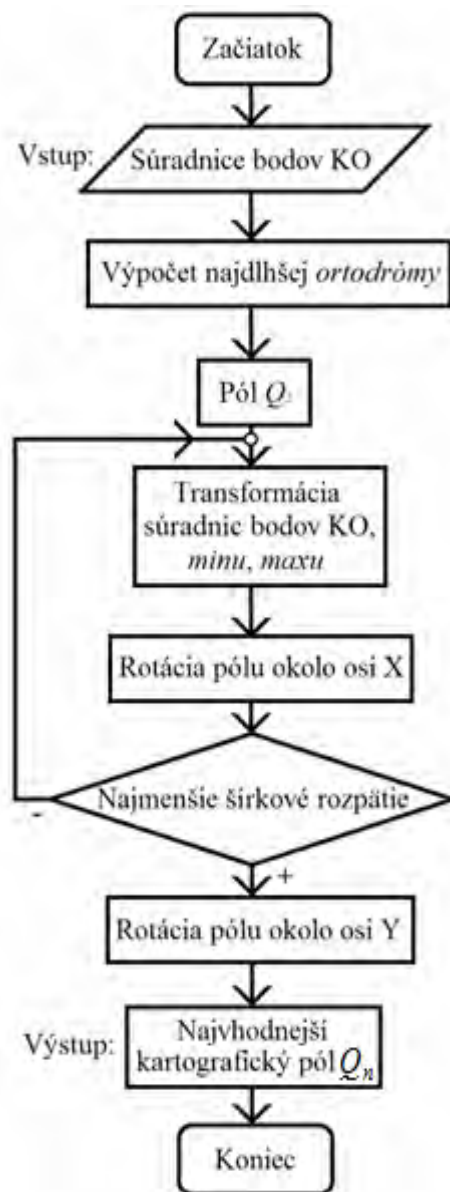
Obr. 1 Množina bodov a z nej vytvorený konvexný obal

Túto redukciu sme si mohli dovoliť, keďže body KO budú zároveň bodmi, ktoré budú od dotykovej rovnobežky vzdialené najviac, a preto práve v nich budú skreslenia dosahovať najvyššie hodnoty. Dosiahli sme tak zníženie nárokov na výpočtovú techniku a kratší

výpočtový čas.

Materiál a metódy

Vstupom programu na výpočet KO je súbor vo formáte *.txt, ktorý obsahuje súradnice geografickej šírky a dĺžky bodov územia štátu (formát: dĺžka šírka). Nutnou podmienkou pre beh programu je, aby sa v súbore každý bod nachádzal iba raz. Výstup z programu na výpočet KO je vstupom programu na výpočet kartografického pólu. Platia preň rovnaké podmienky ako pre vstup do KO, zmena je iba vo formáte: šírka dĺžka.



Obr. 2 Procesný diagram

Optimalizáciu budeme vykonávať s využitím rotácie Q_1 okolo osí X a Y. Najskôr budeme rotovať okolo osi X, aby sme dosiahli čo najmenšie šírkové rozpätie. Kvôli zjednodušeniu úlohy sme stred územia na kartografickom rovníku stotožnili s osou X. Preto nám stačí postupne meniť pozíciu kartografického pólu Q_1 po kartografických poludníkoch $+90^\circ$ a -90° po 1° (neskôr spresnenie na $0,000001^\circ$). Zvolili sme hranice rotovania od 70°

Tento súbor sme dostali z programu Grass 6.4.0. a využili sme na to moduly v.in.ogr, v.out.ascii. Vstupom do Grass-u bol voľne dostupný súbor v súradnicovom systéme WGS84 zo stránky <http://www.gadm.org/countryres>. Výstup bol neskôr ešte upravený na vyššie spomenutý formát.

V prvom kroku načítame a uložíme súradnice bodov KO. Nasleduje určenie najdlhšej ortodrómy medzi dvoma bodmi KO podľa [V.]. Súradnice týchto dvoch bodov nám poslúžia na výpočet prvého kartografického pólu Q_1 , ktorý vypočítame podľa [VI.]. Z výpočtu dostaneme karteziánske súradnice bodu, ktoré je potrebné previesť na geografické podľa [VII.]. Súradnice Q_1 uložíme. Tieto hodnoty neskôr využijeme pri spätných transformáciách ďalších kartografických pólov.

Vzhľadom na Q_1 transformujeme body KO pomocou [VIII.] a vypočítame ich kartografické súradnice, pričom opätovne využijeme [VII.]. Z kartografických súradníc šírky nájdeme tie dve súradnice bodov, ktoré majú minimálnu a maximálnu hodnotu (ďalej *minu*, *maxu*), pričom tieto hodnoty si zapamätáme k pólu, vzhľadom na ktorý sme transformovali.

po 1° (neskôr spresnenie na $0,000001^\circ$). Zvolili sme hranice rotovania od 70° šírky 90° dĺžky po 70° šírky – 90° dĺžky a rotáciu po 1° .

Po každej rotácii kartografického pólu Q_1 transformujeme súradnice bodov KO vzhľadom na tento pól. V ďalšom kroku hľadáme pre zatiaľ posledný kartografický pól hodnoty *minu a maxu*. Podľa pólu, nazvime ho Q_2 , ktorý dosahuje najmenšie šírkové rozpätie, budeme pokračovať v optimalizácii rotáciou okolo osi X, kým nedosiahneme spresnenie súradníc kartografického pólu Q_2 na šesť desatinných miest. Posledným krokom je rotácia okolo osi Y. Podľa posledného Q_2 transformujeme body KO. Po určení polohy posledného a podľa možností najvhodnejšieho pólu Q_n naposledy transformujeme body KO, aby sme určili hodnoty *minu a maxu*.

Výsledky a diskusia

Testovanie programu prebiehalo pre hranice územia troch štátov - Turecka, Toga a Izraela. Tieto štáty boli zvolené pre ich vhodnosť zobrazenia na valec. Pre všetky tri územia sme pre porovnanie vypočítali kartografický pól aj manuálne. V tejto kapitole zhodnotíme rozdiely medzi manuálnym spôsobom výpočtu kartografického pólu Q_m a výpočtom pomocou algoritmu Q_n . Porovnávať budeme rozpätie šírky vo forme tabuliek pre štyri kartografické póly. Prvý pól je manuálne vypočítaný Q_m , ostatné tri sú výsledkom algoritmu. Konkrétne ide o pól vypočítaný ako Q_1 pomocou vektorového súčinu, kartografický pól Q_2 po natočení kartografického rovníka okolo osi X a posledný vypočítaný pól Q_n , považovaný za najvhodnejší. Pre naše potreby budeme pracovať s presnosťou na šesť desatinných miest. Pri výpočtoch skreslení boli uplatňované vzorce platiace pre konformné zobrazenie.

Tab. 1 Porovnanie hodnôt šírkových rozpätí a maximálnych skreslení dĺžok a plôch pre Turecko

Pól	Šírkové rozpätie($^\circ$)	Maximálne skreslenie dĺžky	Maximálne skreslenie plochy
Manuálne vypočítaný Q_m	6,604783	1,001951	1,003905
Q_1	7,475906	1,002221	1,004446
Po rotáciách okolo osi X Q_2	6,228539	1,001551	1,003105
Najvhodnejší Q_n	6,228215	1,001479	1,00296

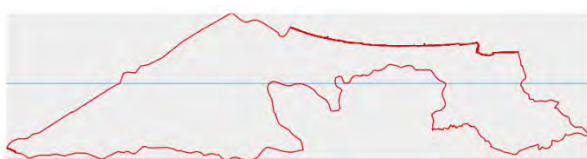
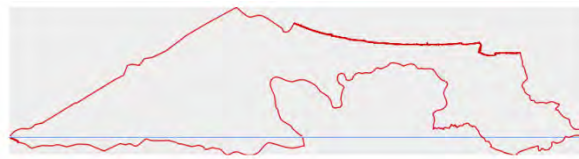
Tab. 2 Porovnanie hodnôt šírkových rozpätí a maximálnych skreslení dĺžok a plôch pre Togo

Pól	Šírkové rozpätie($^\circ$)	Maximálne skreslenie dĺžky	Maximálne skreslenie plochy
Manuálne vypočítaný Q_m	1,470959	1,000105	1,000210
Q_1	1,923258	1,000144	1,000289
Po rotáciách okolo osi X Q_2	1,410213	1,000103	1,000206
Najvhodnejší Q_n	1,410158	1,000076	1,000151

Tab. 3 Porovnanie hodnôt šírkových rozpätí a maximálnych skreslení dĺžok a plôch pre Izrael

Pól	Šírkové rozpätie(°)	Maximálne skreslenie dĺžky	Maximálne skreslenie plochy
Manuálne vypočítaný Q_m	1,019023	1,000043	1,000086
Q_1	1,020473	1,000122	1,000244
Po rotáciách okolo osi X Q_2	1,018257	1,000121	1,000242
Najvhodnejší Q_n	1,018262	1,000039	1,000079

Pre názornejšiu ukážku zmeny pólu uvedieme štyri obrázky Izraela a jeho polohy kartografického rovníka, ide o neskraslenú rovnobežku, vyplývajúcu z polohy kartografického pólu.

**Obr. 3** Manuálne vypočítaný kartografický pól Q_m **Obr. 4** Prvý kartografický pól Q_1 **Obr. 5** Kartografický pól po rotáciách okolo X Q_2 **Obr. 6** Najvhodnejší kartografický pól Q_n

Záver

Z uvedených tabuliek vyplýva, že vytvorený počítačový program skutočne vypočítava kartografický pól vhodnejšie a presnejšie ako klasický manuálny spôsob. Je to vidieť najmä na maximálnych hodnotách skreslení, ktoré dosahujú minimálne hodnoty práve pre najvhodnejší pól Q_n . Výhodou tohto programu je aj časová nenáročnosť a rýchlosť výpočtu.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Pelech V. (2011) Výpočet kartografického pólu pre valcové zobrazenia. (Bakalárska práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p. 14
- [2] Pravda J., Kusendová D. (2007) Aplikovaná kartografia. Geografika, Bratislava, SR, p. 46
- [3] Srnka E. (1977) Matematická kartografie. VAAZ, Brno, ČR, p. 84
- [4] Krcho J. (1986) Geografická kartografia I. Univerzita Komenského, Bratislava, SR, p. 250

Zlučovanie obcí – zvýšenie rozvojového potenciálu obcí?

Ladislav Poliak

*Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Fakulta verejnej správy, Katedra ekonomiky a riadenia verejnej správy, Popradská 66, 041 32 Košice, Slovenská republika;
poliak.ladislav1@gmail.com*

Abstract

The paper deals with problematic of municipality merging. This question is very actual for anybody who deals with theory of public administration, theory of public, respectively municipal finance, municipal policy and development, municipal law, structure of local government, or public administration in European countries. In this article there will be realised an analysis of main factors that have negative impact on municipalities merging in Slovak republic.

Key words: *local development; merging; municipal reform; municipalities.*

Úvod a formulácia cieľa

Slovensko je krajinou s jednou z najfragmentovanejších sídelných štruktúr v Európe. Väčšia fragmentácia je zaznamenaná len v podmienkach Českej republiky, kde počet malých obcí tvorí podiel 80% z celkového počtu obcí, a Francúzska s podielom 77% [1]. Na území Slovenskej republiky sa nachádza 2891 obcí, z ktorých až 67,4% tvoria obce do 1000 obyvateľov, pričom priemerný počet ich obyvateľov je 706 [2]. Najväčšia miera fragmentácie je evidovaná v Prešovskom a Banskobystrickom kraji. Nízky počet obyvateľov determinuje príjmy obce, ktoré sú predpokladom poskytovania verejných statkov, ktorých konečným spotrebiteľom sú samotní obyvatelia. Obce s nízkym počtom obyvateľov nie sú schopné zabezpečovať ani vlastné, rozvojové kompetencie, pričom štát na ne ročne prenáša desiatky ďalších.

Teória vymedzuje dva základné nástroje komunálnej reformy, ktorá by mala riešiť tento stav [1]. Prvý spôsob je združovanie obcí, za účelom spolupráce, spojenou s výkonom kompetencií. Druhým spôsobom je zlučovanie obcí.

Cieľom predkladaného príspevku je analýza druhého, invazívnejšieho spôsobu riešenia problému existencie vysokého počtu malých obcí v podmienkach Slovenskej republiky.

Materiál a metódy

Predkladaný príspevok čerpá jednak z výstupov publikačnej činnosti uznávaných

odborníkov v oblasti miestnej správy, ako aj z výsledkov vlastného výskumu. V texte sa prelinajú a vzájomne dopĺňajú.

Vlastný výskum pozostával z dotazníkového prieskumu v obciach okresov Humenné, Medzilaborce a Snina (115 obcí), s návratnosťou 34,78% (40 obcí). Daný dotazník bol rozčlenený do štyroch základných pilierov, týkajúcich sa (1) súčasného stavu medziobecnej spolupráce, (2) perspektív medziobecnej spolupráce, (3) názorov a návrhov starostov obcí, v súvislosti s potenciálnou realizáciou komunálnej reformy, (4) vybraných ekonomických aspektov. Až 37 (92,5%) z respondentov spadá do kategórie „malá obec“. Tento výskum poskytol veľmi cenné poznatky z praxe. V tomto príspevku budú prezentované výlučne tie, ktoré sú v súlade s jeho cieľom.

Výsledky a diskusia

Zo spracovanie navrátených dotazníkov vyplýva, že až 84,21% obcí odmieta realizáciu komunálnej reformy, založenej výlučne na zlučovaní obcí, pričom takúto formu podporuje len zvyšných 15,79% vzorky. Presne 50% respondentov si predstavuje komunálnu reformu vo forme prehĺbenia a rozšírenia medziobecnej spolupráce, 34,21% preferuje individuálny prístup, založený na kombinácii spolupráce a zlučovania. Z výskumu ďalej vyplýva, že 87,18% obcí by v budúcnosti privítalo zavedenie obligatórnej medziobecnej spolupráce.

Ako je vidieť, na Slovensku panuje relatívne vysoký odpor voči zlučovaniu obcí. Je to možné pripísať štátnym zásahom do vývoja sídelnej štruktúry v období socializmu.

Pokiaľ sa chceme baviť o zlučovaní obcí na národnej úrovni, je potrebné si uvedomiť, že existujú tri základné modely tohto aktu [1].

1. *Centralizačný model* je model najrýchlejšie realizovaný. Iniciátorom zlučovania je centrálna úroveň, čiže vláda, a teda koncepcia, na základe ktorej sa obce zlučujú, je v praxi implementovaná, a obce sú teda zlúčené, ešte pred uplynutím jej funkčného obdobia.
2. *Dobrovoľný model* ponecháva rozhodnutie na jednotlivých obciach. Pokiaľ obec spĺňa kritériá, ktoré určil zastupiteľský zbor, je jej zlúčenie s inou obcou obligatórne. Pokiaľ je mimo týchto kritérií je len na nej, či sa zlúči alebo nie.
3. *Zmiešaný model* v sebe integruje znaky oboch predošlých modelov. Vláda vypracuje koncepciu zlučovania, určí časový limit, v rámci ktorého ju obce musia vyplniť, podľa svojej úvahy, a po jeho uplynutí rozhodne o zlúčení obcí tam, kde je to ešte potrebné.

Za minulého režimu došlo k použitiu centralizačného modelu plošného zlučovania obcí. Hlavnými podmienkami bolo, aby jeden územný obvod bývalých MNV (miestnych národných výborov) pokrýval minimálne 2500-3000 obyvateľov, pričom ani jeden z týchto obyvateľov nesmel dochádzať do MNV viac než 10 kilometrov [6]. Takýmto spôsobom sa počet obcí znížil o 18,5%, čiže z 3344 na 2725. Aj keď boli zlúčené obce vnímané ako relatívne autonómna súčasť novovzniknutej municipality, väčšina z nich po zmene režimu zažiadala o odčlenenie a o navrátenie bývalého statusu samostatnej obce [7].

Rovnaká situácia je aj v Českej republike, kde platí priama úmera medzi veľkosťou obce a ochota ku zlučovaniu [8]. Nižňanský [14] uvádza, že v prípade vzorky obyvateľov ide o 38,2% podporu zlučovania, pričom väčšina je za využitie združovacieho potenciálu obcí. Ako je vidieť, názory obyvateľstva a starostov sa v tomto smere veľmi nelíšia. Túto neochotu podľa Swianiewicza [9] determinujú 4 kľúčové aspekty. Ide o:

1. *Prístup k miestnej správe* – Jedná sa o samotný fyzický prístup, resp. vzdialenosť k obecnému úradu.
2. *Identita miestnej komunity* – Ide o sídelnú identitu, ktorú možno vymedziť ako určitý vzťah obyvateľa, resp. sociálnej skupiny, k určitému územiu, na ktorom strávil určitý čas. Bližšie o tom pojednávajú [10, 11, 12]. Z výsledkov výskumu Šťastného [13] vyplýva, že v malých obciach je miera sídelnej identity vysoká.
3. *Strach z toho, že komunita nebude reprezentovaná* – Súvisí so vzdialenosťou orgánov, ktoré rozhodujú o rozvoji obce.
4. *Konflikty v utvorenej municipalite* – Môže dochádzať ku konfliktom medzi obyvateľmi jadrovej obce/mesta a pripojenej obce.

Ako bolo uvedené, až 87,18% zo vzorky preferuje zavedenie obligatórnej medziobecnej spolupráce v budúcnosti. Je to spôsobené najmä tým, že nedochádza ku žiadnemu, z vymedzených problémov, pretože združenia obcí v rôznych formách sú dobrovoľnou záležitosťou, v ktorej účasť môže byť členskou obcou kedykoľvek odvolaná, zrušená, čo je rovnako možné ponímať ako jednu z celého spektra výhod, vyplývajúcich z realizácie medziobecnej spolupráce.

Pri zlúčení obcí to nie je tak. Združiť sa môžu obce bez ohľadu na vzdialenosť, aj keď, samozrejme, čím nižšia vzájomná vzdialenosť, tým je to pre ne výhodnejšie, avšak zlúčiť možno obce z pochopiteľných dôvodov len za predpokladu rozumnej teritoriálnej blízkosti. Pre potreby riešenia otázky zlučovania obcí možno rozčleniť obce do niekoľkých skupín:

1. *Prímestské obce* – Tieto obce už v súčasnosti tvoria perifériu miest, ktoré obklopujú.

Spravidla sú veľmi silne naviazané na centrálné mesto, jej obyvatelia doňho denne dochádzajú za prácou, do škôl, za účelom lekárskeho ošetrovania, vybavenia úradných záležitostí, nákupu statkov, návštevy kultúrnych a zábavných zariadení a podobne. Prímestské obce sú ekonomicky závislé od mesta. Možno očakávať, že časom zrastú s jadrom tak, ako sa to v minulosti stalo s obcami v okolí Bratislavy, Košíc, Ružomberka, Popradu a ďalších.

2. „*Strediskové*“ obce – Strediskové obce sú obce relatívne vzdialené od najbližšieho mesta, ktoré v danej oblasti parciálne supľujú základné úlohy mesta. Prevažne ide o poskytovanie ambulantnej zdravotnej starostlivosti a ponuku širšieho sortimentu tovarov a služieb, než v okolitých obciach.
3. „*Odlahlé*“ obce – Mnohé obce sú relatívne izolované od svojho okolia a nedostupné z teritoriálneho hľadiska. Ide o izoláciu týkajúcu sa najmä infraštruktúry, ktorá nevytvára dostatočné predpoklady na jej pričlenenie k iným obciam.
4. *Ostatné obce*

Práve prvé dva menované typy obcí by mohli tvoriť zárodok pre municipalizáciu. Zatiaľ čo prímestské obce by boli pohltené mestami, stredisková obec by utvorila centrum municipality, ku ktorej by sa pripojili obce, ktoré sú na ňu naviazané. Samozrejme v prípade ostatných obcí je možná ich amalgamizácia. Rozdielom je to, že municipalizácia je proces pričlenenia obcí ku centru – mestu, či veľkej obci. Amalgamizácia tvorí zlučovanie obcí rovnakého postavenia [15]. Ako je vidieť, rozdielom je, že pri amalgamizácii sa nedodržiava princíp jadro-periféria.

Niektoré obce sa bránia čo i len realizácii medziobecnej spolupráci vo forme združovania sa za účelom výkonu dohodnutých kompetencií [3]. Možno konštatovať, že proces zlučovania obcí ovplyvňujú:

1. *Faktory politické* – Obce si dôsledne strážia svoju autonómiu. Veľkú úlohu tu zohráva moc, ktorú majú starostovia a ktorú si chcú udržať. Vzhľadom na to, že prípadné zlúčenie obcí by malo ísť cestou demokracie a zákon o obecnom zriadení podmieňuje potvrdenie zlúčenia obcí vykonaním komunálneho referenda, starosta, ako autorita v obci, zohráva v tomto prípade veľkú úlohu. Implicitne to vyplýva aj z dotazníkového prieskumu, v ktorom neexistenciu medziobecnej spolupráce danej obce niekoľko starostov odôvodnilo nezáujmom, či legislatívou, ktorá im neukladá takúto povinnosť.
2. *Faktory kultúrne* – Mnohé obce sa bránia zlučovaniu pretože im to pripomína socialistickú éru. Odmietnutie pričlenenia sa k inej obci môže byť chápané ako vec

prestíže. Táto situácia bola napríklad v Dánsku, na ktoré je neustále poukazované, keďže komunálna reforma v tejto krajine spočívala výlučne v procese zlučovania obcí [18], neznáma. V tejto krajine v priebehu necelých štyroch desaťročí došlo ku zlúčeniu viac než 1300 obcí do dnešných 98 municipalít.

3. *Faktory ekonomické* – V malých obciach je vyšší predpoklad eliminácie korupcie a dodržania transparentného hospodárenia než vo veľkých obciach, či mestách. Je to podporené účinnou sociálnou kontrolou. Na druhej strane koeficient, ktorým sa pridelujú obciam do 1000 obyvateľov prostriedky z dane z príjmu fyzických osôb, je 0,89 [17], čo je najnižšia možná hodnota. Zlúčenie aspoň dvoch malých obcí by prinieslo úžitok všetkým zainteresovaným stranám, nehovoriac o zvýšení kvality a rozsahu poskytovaných verejných statkov a pod.

Záver

Z uvedeného textu vyplýva, že otázka zlučovania obcí je síce aktuálna, avšak politicky veľmi neprijemná. Rovnako z neho vyplýva aj to, že predstavy obyvateľstva, ako aj predstaviteľov obcí o komunálnej reforme nepredpokladajú jej efektívnu realizáciu. Najefektívnejší spôsob je zlúčenie obcí, pretože to prinesie najvyššie úspory z rozsahu. Preto by komunálna reforma na Slovensku mala prebiehať ako kombinácia zmiešaného modelu zlučovania obcí a využitia združovacieho potenciálu obcí, ktorý by sa využil len tam, kde neprichádza do úvahy zlučovanie. Prvá fáza by mala byť zahájená čo najskôr, pričom najdôležitejším krokom centrálnej úrovne by malo byť spracovanie potrebnej smernice v čo najkratšom čase, určenie dostatočného času na dobrovoľné zlučovanie a zníženie koeficientov pre pridelovanie výnosov z podielovej dane. To by naštartovalo proces zlučovania obcí, pričom intervencia vlády by prišla až vtedy, keď by vypršala lehota na dobrovoľné zlúčenie a bola by nejaká možnosť racionalizácie výsledkov tohto procesu.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Komunálna reforma – Materiál pre verejnú diskusiu (2004) [Citované: 18. február 2013] <http://www.komunal.eu/subory/komun__lna_reforma.pdf>
- [2] Poliak L. (2011) e-polis.cz, [Citované: 18. február 2013] <<http://www.e-polis.cz/nezarazene-clanky/602-sidelna-struktura-na-slovensku-a-komunalna-refoma.html>>
- [3] Poliak L. (2012) National and Regional Economics IX 26th-27th September 2012, Herľany, SR, p. 407

- [4] Poliak L. (2012) Teoretické a praktické aspekty manažmentu a ekonomiky samosprávy, Herľany 26. September 2012, Košice, SR
- [5] Poliak L. (2012) Medzinárodná Masarykova konferencia pro doktorandy a mladé vědecké pracovníky, ročník III. 10.-14. prosince 2012. Sborník příspěvků z mezinárodní vědecké konference MMK 2012, Hradec Králové, ČR, p.1286
- [6] Lukeš Z. (1981) Československé správní právo - Obecná část. Panorama, Praha, ČR, p. 85
- [7] Klimovský D. (2009) Acta Politologica 1(2), p. 182
- [8] Ryšavý D., Šaradín, P. (2011) Zastupitelé českých měst a obcí v evropské perspektivě. Sociologické nakladatelství /SLON/, Praha, ČR, p. 24.
- [9] Swianiewicz P. (2010) Territorial consolidation reforms in Europe. LGI, Budapest, Maďarsko, p. 10
- [10] Falťan L. (2001) Modernizácia verejnej správy. Zborník príspevkov z vedeckej konferencie organizovanej Fakultou verejnej správy UPJŠ v Košiciach 26.10.-27.10.2001. Košice, SR, p. 122
- [11] Falťan L. (2002) Teória a prax verejnej správy. Zborník príspevkov z vedeckej konferencie organizovanej Fakultou verejnej správy UPJŠ v Košiciach 25.10.-26.10.2001. Košice, SR, p. 261
- [12] Strussová M. (2002) Teória a prax verejnej správy. Zborník príspevkov z vedeckej konferencie organizovanej Fakultou verejnej správy UPJŠ v Košiciach 25.10.-26.10.2001. Košice, SR, p. 268
- [13] Šťastný Z. (2002) Teória a prax verejnej správy. Zborník príspevkov z vedeckej konferencie organizovanej Fakultou verejnej správy UPJŠ v Košiciach 25.10.-26.10.2001. Košice, SR, p. 278
- [14] Nižňanský V. a kol. (2009) Medziobecná spolupráca a zlučovanie obcí na Slovensku. Výskumná štúdia. Komunálne výskumné a poradenské centrum, n. o. Piešťany - Vysoká škola ekonomie a manažmentu verejnej správy v Bratislave, Bratislava, SR, p. 27
- [15] Konečný S. (2012) Verejná správa a spoločnosť 8(1), p. 19
- [16] Zákon č.369/1990 Zb. o obecnom zriadení v znení neskorších predpisov
- [17] Nariadenie vlády Slovenskej republiky č.668/2004 Z.z. o rozdeľovaní výnosu dane z príjmov územnej samosprávy v znení neskorších predpisov
- [18] Čapková S. a kol. (2001) Štruktúra územnej samosprávy vo vybraných štátoch Európy. Porovnávacía štúdia. Nadácia vzdelávania samosprávy SR, Bratislava, SR, p. 33

Kvalita pôd a degradácia pôd vo vybraných archeologických lokalitách v ČR

Štefan Poništiak

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyzické geografie a geoekologie, Albertov 6, 128 43, Praha 2, Česko; stefan.ponistiak@natur.cuni.cz

Abstrakt

This thesis inquires into the quality of the soils at 30 archaeological sites from the periods from Late Bronze Age to Early Bronze Age (1 250 - 400 BC). The aim of the thesis is the general observation of the changes, which could appear from this period until now. These changes are represented by the erosion, researched by various methods. The conclusion of the thesis is that a potential risk of soil erosion is the lowest in onlz few lowland archaeological sites.

Kľúčové slová: kvalita pôd; archeologické lokality; kilometrový periméter; pôdna erózia

Úvod a formulácia cieľa

Prekladaná práca sa zaoberá kvalitou pôdy a jej degradáciou v okolí 30 archeologických lokalít z obdobia mladšej doby bronzovej až staršej doby železnej (cca r. 1 250 – 400 pr. Kr.). Cieľom práce je teda vymedzenie plôch potenciálnej erózie v zázemí archeologických lokalít vybranými metódami a ich vizualizácia v digitálnom prevedení. Plochy, kde potenciálne mohlo dôjsť alebo dôjde k erózii sú vymedzené v perimetri 1 km od sledovaných bodových lokalít. V tomto prípade pracujem s predpokladom, že pôdny kryt sa môže výrazne meniť, často aj v závislosti na lokalite. Od okamžiku vzniku pôdy je treba navyše paralelne s jej vývojom počítať aj s jej rozrušovaním a premiestňovaním [1]. S eróziou pôdy sa strácajú aj záznamy o archeologických lokalitách a preto je erózia častým objektom skúmania aj archeológov. Pôdna erózia a degradácia je dnes s ohľadom na svoje ďalekosiahle ekologické i socioekonomické dôsledky chápaná ako jeden z najaktuálnejších globálnych problémov. Zrýchlená pôdna erózia je zároveň jedným z najvýraznejších procesov meniacich štruktúru pôdneho krytu, pôsobiacich na heterogenitu pôdnych jednotiek a variabilitu pôdnych vlastností. K formulácii vyššie uvedeného predpokladu ma doviedol fakt, že existujú len proxy dáta (nepriame indície) o minulosti, s ktorými by sme mohli porovnávať súčasný stav a preto považujem za nutné aspoň čiastočne kvantifikovať proces erózie, ktorý mohol tieto prírodné podmienky do dnešného obdobia pozmeniť. Práca bola prevedená predovšetkým v prostredí softvérov ArcGIS a Surfer, pričom čiastočným skreslením výsledkov je práve fakt, že výsledky doposiaľ neboli porovnané so skutočnými tvarmi reliéfu priamo v teréne.

Materiál a metódy

Podkladom pre prácu bol zoznam 30 archeologických lokalít (obr. 1) z databázy Archeologického ústavu AV ČR z obdobia mladšej doby bronzovej až staršej doby železnej. (obdobie od 1 250 pr. Kr. – 400 pr. Kr.).



Obr. 1 Spracované archeologické lokality na území ČR

Z archeologického hľadiska je dôležité vedieť, aká je bonita pôd práve v najbližšom okolí danej lokality. Preto som ku každej lokalite pridal podľa vzoru Marshalla [2] aj charakteristiku v území vymedzenom rádiom 1 km. Diskusia o tom, aká vzdialenosť je tá najsprávnejšia sa rôznia [3]. Autori sa domnievajú, že je to maximálna vzdialenosť, ktorú prešiel chôdzou praveký človek s dobytkom za hodinu cesty (porovnaj so [4]), teda oblasť, s ktorou je človek v najužšom spojení a je teda predpoklad, že práve v oblasti predpokladaných pravekých polí, v okolí daných lokalít, svojou činnosťou najviac pozmení vlastnosti krajiny.

Ku každej hodnote BPEJ boli priradené body podľa bodového hodnotenia pôdy vypracovaného VÚMOP. Základnou veličinou pre porovnanie súčasnej bonity sa stal vážený priemer bodov tohto územia (počítaný z poľnohospodárskej, bonitovanej pôdy) vypočítaný podľa vzorca:

$$BH_p = (BH_1 \times A_1 + BH_2 \times A_2 + \dots + BH_n \times A_n) / A_c, \text{ kde} \quad [I.]$$

BH_p je vážený priemer bod. hodnotenia polí pre celé územie v perimetri

BH_1, BH_2, \dots, BH_n je celkové bodové hodnotenie danej BPEJ

A_1, A_2, \dots, A_n je plocha danej BPEJ

A_c je plocha pre celé územie v perimetri 1 km (resp. 3 km).

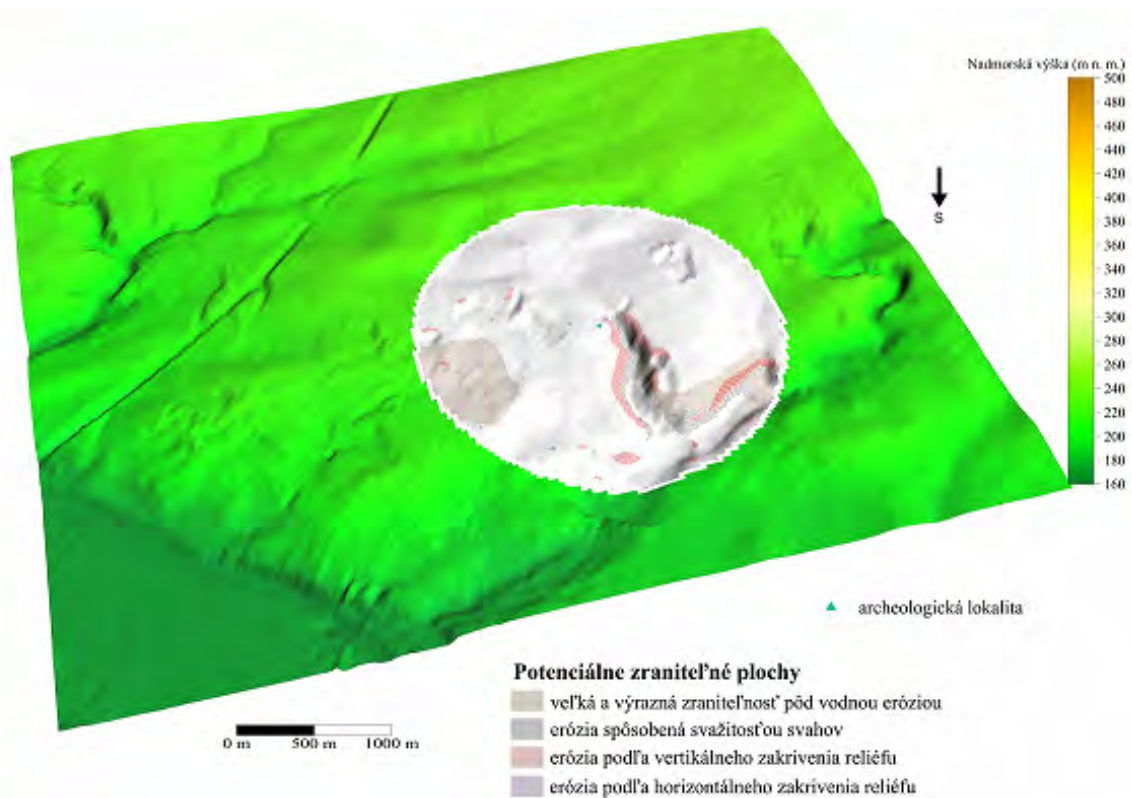
Na vymedzenie potenciálne zraniteľných plôch boli použité viaceré metódy. Prvou bolo vymedzenie plôch na základe sklonitosti svahov. Podkladové dáta boli získané z kódov BPEJ [5]. Rozhodujúcim pre výber týchto plôch bol 4. číselný údaj v kóde BPEJ, ktorý zaznamenáva spoločnú charakteristiku sklonitosti a expozície svahov [6]. Z bonitovaných plôch poľnohospodárskej pôdy boli vybrané konkrétne tie plochy, ktoré majú sklonitosť svahov vyššiu ako 12 °.

Ďalšou metódou, ktorú som využíval bolo vymedzenie potenciálne zraniteľných plôch vodnou a veternou eróziou. Podkladovým materiálom bol Projekt „Systém komplexního hodnocení půd“ [7]. Z hľadiska zraniteľnosti veternou eróziou boli vybrané plochy s výraznou a silnou zraniteľnosťou podľa [7] označované aj ako plochy s funkčným potenciálom I. a II. - pôdy piesčité alebo hlinitopiesčité so zhoršeným, slabým alebo žiadnym štruktúrnym stavom pôdy. Metóda určenia týchto plôch súvisí s plochami BPEJ (resp. im prislúchajúcim HPJ) a tak vyššie uvedené, potenciálne najviac zraniteľné plochy veternou eróziou, sú reprezentované HPJ s kódmi 04, 17, 21, 22, 23, 31, 37, 39 a 55. Potenciálne zraniteľné pôdy vodnou eróziou boli určené ako HPJ s výraznou a veľkou zraniteľnosťou. V tomto prípade ide o HPJ s K-faktorom v rozmedzí hodnôt 0,46 – 0,66. Infiltrácia nezohráva v tomto prípade takú významnú úlohu ako práve K-faktor, takže vymedzené plochy s výraznou a veľkou potenciálnou zraniteľnosťou môžu byť pôdy so strednou až veľmi nízkou rýchlosťou infiltrácie. V prípade vodnej erózie sú to HPJ s kódmi 02, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 19, 24, 26, 42, 47, 49, 62, 63. Ostatnými dvomi metódami boli vymedzované plochy na základe zakrivenia terénu, konkrétne vertikálneho a horizontálneho. Metódy zakrivenia som vytváral v programe Surfer 9, ktorý umožňuje ako vytvorenie vertikálneho zakrivenia, tak aj horizontálneho v DMR. Podkladom pre vytvorenie DMR boli dáta z Českého úřadu zeměměřického a katastrálního a to konkrétne digitálne výškopisné dáta Digitálny model reliéfu 4. generácie (DMR 4G). DMR 4G predstavuje zobrazenie prirodzeného alebo ľudskou činnosťou upraveného zemského povrchu v digitálnom tvare vo forme výšok diskretných bodov v pravidelnej sieti 5x5 m so súradnicami x, y, z, kde z predstavuje nadmorskú výšku vo výškovom referenčnom systéme Balt po vyrovnaní s úplnou strednou chybou výšky 0,3 m v

odkrytom teréne a 1 m v zalesnenom terénu [8]. Doplnujúcimi charakteristikami k hodnoteniu degradácie pôdy sú pufrovitosť a homogénnosť resp. kontrastnosť plôch. Mimoriadny a vysoký potenciál pufrovitosti majú predovšetkým černoze, hnedozeme, rendziny, fluvizeme a černice. Preto lokality, ktoré majú v zázemí plošne zastúpené práve tieto plochy budú mať z tohto hľadiska lepšiu odolnosť voči potenciálnej erózii, teda relatívne nízke ohrozenie. Čo sa týka hodnotenia homogénnosti a kontrastnosti územia, boli použité rozhodovacie pravidlá [9]. Jednotlivé kritéria sú sledované v rámci každej lokality a to tak, že sú vzťahnuté na plošne najviac zastúpené pôdne typy v kilometrovom perimetri. V prípade, že všetky pôdne typy sú hodnotené ako relatívne podobné v rámci konkrétneho kritéria, nie sú taxonomicky vzdialené, teda sú relatívne homogénne (v rámci jednotlivých pravidiel boli zhodné). Naopak, ak sa preukáže taxonomická vzdialenosť, pôdne typy v tomto prípade sú kontrastné (v rámci jednotlivých pravidiel sa pôdne typy nezhodovali). V prípade, že v okolí danej lokality dominujú podmienky kontrastné medzi jednotlivými rozhodovacími pravidlami (jednotlivými pôdnymi typmi), tak aj výsledná charakteristika kilometrového zázemia lokality je označená ako kontrastnosť a naopak (homogénne podmienky – homogénne prostredie). V prípade, že rozdiel medzi kontrastnými a homogénnymi podmienkami v rámci pravidiel nebol výrazný, bolo územie hodnotené ako priemerné.

Výsledky a diskusia

Výsledkom spracovania potenciálnych plôch erózie sú digitálne modely reliéfu s vyznačenými plochami potenciálnej erózie vodnej, veternej, erózie spôsobenej svažitosťou svahov a erózie vymedzenej horizontálnym a vertikálnym zakrivením reliéfu. V rámci modelu sú vybrané plochy, ktoré zo všetkých predstavujú potenciálne najväčšie riziko erózie (napr. obr. 2).



Obr. 2 DMR (5x prevýšený) a potenciálne zraniteľné plochy v okolí lokality Brandýs nad Labem

Toto vymedzenie plôch vedie k tomu, aby som naznačil možný posun pôdných vlastností od praveku do súčasnosti, práve z hľadiska potenciálnej erodovateľnosti, poprípade pufračnej schopnosti. Tieto fenomény sú hodnotené v 3 kategóriách, zahrňujúcich vysoké, stredné (priemerné) a nízke ohrozenie. V lokalitách so silným ohrozením považujem dnešný kryt potenciálne najviac vzdialený od pôvodnému stavu na začiatku poľnohospodárstva (sledovaného obdobia), predovšetkým odlišnosťou zastúpenia pôdných typov a prirodzenou úrodnosťou. Okrem kritéria pufrovitosti a potenciálnych plôch erózie vymedzených vyššie uvedenými spôsobmi je ostatným kritériom hodnotenia pôdneho krytu lokalít homogénnosť resp. kontrastnosť. V území označenom ako kontrastné, sú plochy s geneticky, textúrne, reliéfovo a pedochemicky úplne odlišnými pôdnymi jednotkami. V homogénnom území sú pôdne pomery homogénne a O sú označené plochy priemerné (stredne homogénne / stredne kontrastné). Výsledná tabuľka [9] je prienikom všetkých týchto faktorov (ako aj prihliadnutím na lokálne špecifiká) a jej záverečným hodnotením je stĺpec „celková erózia“, v ktorom sú zahrnuté všetky faktory potenciálnej erózie.

Záver

V nížinných lokalitách je aj potenciálne ohrozenie pôdy eróziou najnižšie. Potenciálna erózia bola hodnotená viacerými faktormi a záverečné hodnotenie je zhrnutím všetkých týchto prístupov. Pri celkovom hodnotení všetkých lokalít však predstavuje podiel najmenej ohrozených lokalít menšinu oproti lokalitám, kde prebehli a pravdepodobne prebehnú najväčšie zmeny vplyvom prirodzenej erózie. Z celkového počtu 30 sledovaných lokalít 13 je hodnotených s vysokým ohrozením oproti 4 lokalitám s nízkym ohrozením. Zvyšné lokality sú na pomedzí týchto kategórií označené ako stredne ohrozené.

To potvrdzuje druhú hypotézu, položenú v tejto práci, o výraznej zmene pôdneho krytu smerom od mladšej doby bronzovej až staršej doby železnej do súčasnosti.

PodĎakovanie

Ďakujem Dagmar Dreslerovej a Jakubovi Langhammrovi za užitočné informácie počas spracovania práce a poskytnuté materiály k naplneniu cieľa tejto práce.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Dreslerová D. (1995) A settlement-economic model for a prehistoric microregion: settlement activities in the Vnoř-stream basin during the Hallstatt period. In: Kuna M., Venclová N. et al. *Whither Archaeology*. Archeologický ústav, Praha, ČR, p. 145
- [2] Marshall A. (1978) *World Archeol. J.* 9(3), p. 347
- [3] Rulf J. (1983) *Památky archeologické 74*. Archeologický ústav, Praha, ČR, p. 35
- [4] Hajnalová M., Dreslerová D. (2010) *Památky archeologické 101*. Archeologický ústav, Praha, ČR, p. 169
- [5] Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy (2010) *Digitálne data BPEJ*, Praha, ČR
- [6] Mašát K. et al. (2002) *Metodika vymezení a mapování bonitovaných půdně ekologických jednotek*. Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy, Praha, ČR, 113 p
- [7] Ministerstvo životního prostředí (1999) *Projekt VaV 640/3/99 - Systém komplexního hodnocení půd*. AOPK, Praha, ČR, 95 p
- [8] Geoportál ČÚZK [Citované: 1.marec 2012] < <http://geoportal.cuzk.cz> >
- [9] Poništiak Š. (2012) *Kvalita půd a degradácia pôd vo vybraných archeologických lokalitách*. (Diplomová práca) Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Praha, ČR, p. 31

Zmeny v cereálnej produkcii v závislosti na environmentálnych podmienkach v mladšej dobe bronzovej až staršej dobe železnej

Štefan Poništiak¹, Dagmar Dreslerová², Petr Kočár², Tomáš Chuman¹, Luděk Šefrna¹

¹Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyzické geografie a geoekologie, Albertov 6, 128 43, Praha 2, Česko; stefan.ponistiak@natur.cuni.cz

²Archeologický ústav AV ČR, Praha, v. v. i., Oddělení archeologie krajiny a archeobiologie, Letenská 4, 118 01 Praha 1, Česko

Abstrakt

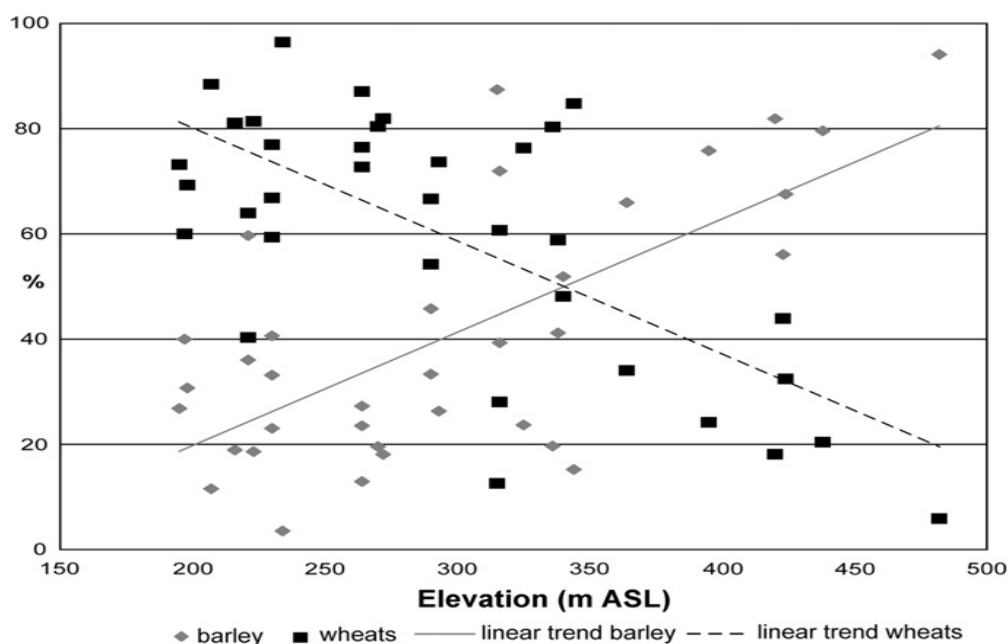
The objective of this paper is to assess the relationship between the cereals cultivated in the Late Bronze and Early Iron Ages (ca. 1250-400 BC) within the area of the present-day Czech Republic, and their environmental settings. The various charred caryopses of cereal species represented in the archaeobotanical assemblages from 35 archaeological sites differ, especially in the proportion of wheat and barley. The cereal assemblages were compared regarding site altitude, weather conditions, soils and soil productivity. The most important environmental variable influencing the choice of a particular crop seemed to be altitude which is correlated with other variables such as the soil quality etc. Although the ecological requirements of cereals cultivated in the Late Bronze and Early Iron Ages are not known, they presumably thrived under similar conditions to present-day species/varieties, and the strategy of past crop husbandry was based on similar principles as today, e.g. flexible adaptation to local environmental conditions, in an effort to achieve optimal yields.

KLúčové slová: pôdy; archeobotanika; environmentálne podmienky; doba bronzová; doba železná

Úvod a formulácia cieľa

Archeologické údaje zaznamenávajú šírenie pravekého osídlenia od nížin do poľnohospodársky menej priaznivých oblastí, v rámci oblasti dnešnej Českej republiky (ČR), toto sa konalo počas doby bronzovej, a najmä v staršej dobe železnej. Toto šírenie vyvoláva otázku, ako boli minulé poľnohospodárske systémy prispôsobené rôznym podmienkam prostredia, ako sú kratšie vegetačné obdobie, vyššie zrážky a nižšia produktivita pôdy. Všeobecne sa predpokladá, že jednou z adaptácií by bol v praxi chov zvierat vo vyšších nadmorských výškach a v oblastiach horšej poľnohospodárskej pôdy. To by mohlo byť vidieť v archeologickom zázname vo forme meniaceho sa osídlenia alebo v rastúcom zastúpení domácich zvierat. Avšak, nie sú žiadne zjavné rozdiely medzi osídlením v nížinách a vyšších polohách v ČR, s tou výnimkou, že osídlenie v nížinách môže byť rozsiahlejšie. Archeozoologické dôkazy chovu zvierat chýbajú vo vyšších oblastiach, kde sa vyskytujú kambizeme, ktoré zaberajú približne 55 % rozlohy ČR, pretože kosti nie je možné zachytiť v tomto pôdnom type. Zuholnatené makrozvyšky preto naďalej takmer výhradne poskytujú jediné dôkazy o poľnohospodárstve v týchto regiónoch.

Prvým impulzom pre túto štúdiu bolo zistenie, že archeobotanické záznamy z mladšej doby bronzovej až staršej doby železnej (LBA/EIA, cca. 1250-400 BC), sa líšia v pomere zastúpenej pšenice a jačmeňa v závislosti na geografických faktoroch. Archaeobotanické nálezy z nížin obsahujú vyššie percento pšenice a nižšie percento jačmeňa. Pomer jačmeňa sa zvyšuje s rastúcou nadmorskou výškou (obr. 1).



Obr. 1 Pomer pestovanej pšenice a jačmeňa v závislosti na nadmorskej výške (v m n. m.)

Počas sledovanej periódy v nížinách dominuje ozimná pšenica a raž. V stredných nadmorských výškach, raž a jarné obilniny, najmä jačmeň a vo vyšších nadmorských výškach sú dominantnými obilninami jarný jačmeň a ovos. Raž a ovos, však, boli kultivované v ČR iba ku koncu prehistórie, napr. v mladšej dobe železnej až v rímskej dobe [1]. Cieľom tejto štúdie bolo testovať hypotézu, že rozdiely medzi makrozvyškami obilnín nájdené v rôznych regiónoch môžu byť spôsobené, okrem časových faktorov, environmentálnymi podmienkami.

Materiál a metódy

Súčasnú premennú prostredia nezodpovedajú tým v praveku. To platí najmä pre pôdy a podnebie. Dlhá a rozmanitá história využívania pôdy zmenila topografiu a pôdny pokryv [2, 3, 4]. V niektorých poľnohospodárskych oblastiach došlo k vyčerpaniu pôdy podzolizáciou [5]. Na druhej strane, je hnojenie všeobecne prijímané a bolo praktizované od neolitu a naďalej v celom praveku [6].

Podnebie je charakterizované priemerným ročným úhrnom zrážok, priemernou ročnou

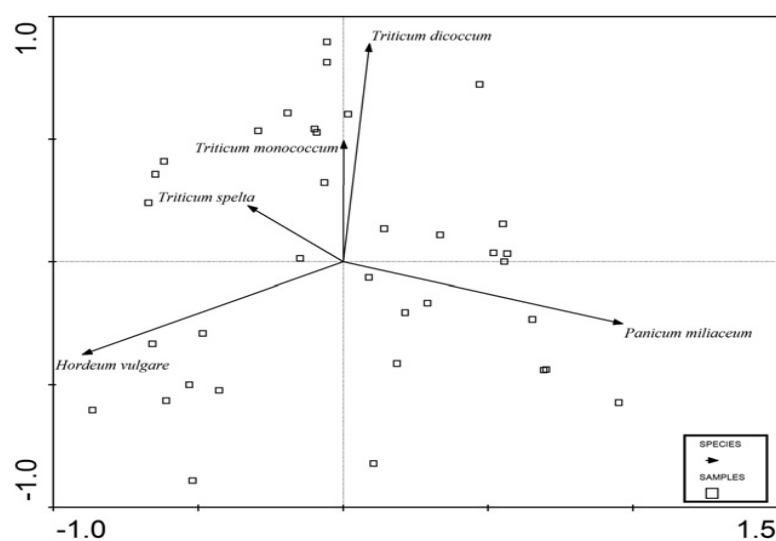
teplotou a dĺžkou vegetačného obdobia. Hodnoty boli prevzaté z Atlasu podnebí Česka [7] a hodnota indexu tepelného pôžitku podľa [8] pochádza z digitálneho modelu terénu s 25m veľkosťou pixlu. Topografia je popísaná strednou nadmorskou výškou, sklonom a topografickým indexom vlhkosti [9] tiež odvodeným z digitálneho modelu terénu s 25m veľkosťou pixlu. Podľa dominancie dnešného pôdneho pokryvu je možné lokality rozdeliť do troch všeobecných skupín: sprašové pôdy (černozeme, hnedozeme, luvizeme), semihydromorfne pôdy (pseudoglej, stagnoglej a gleje) a regolitové pôdy (kambizeme a regozeme). Pôdny pokryv a kvalita pôdy boli odvodené z máp bonitovaných pôdno-ekologických jednotiek spracovaných Výskumným ústavom melioráci a ochrany pôdy [10]. Pôdne charakteristiky boli sledované v perimetri 1 km od lokality (hodina chôdze), teda územia, kde mohli byť s najväčšou pravdepodobnosťou situované praveké polia.

Archeobotanické záznamy pochádzajú z 35 archeologických lokalít. Celkovo bolo sledovaných 1 005 vzorkovaných objektov a 5 349 vzoriek, následne identifikovaných približne 55 000 zuhoľnatených obiliek, ktoré vstúpili do ďalších analýz. Ako základný podklad pre testovanie hypotéz bol použitý percentuálny podiel 7 druhov obilnín v rámci každej archeologickej lokality a to: pšenica jednozrnná (*Triticum monococum*), pšenica dvojrnná (*Triticum dicoccon*), jačmeň siaty (*Hordeum vulgare* – štvorradový, šesťradový, dvojrnný), jačmeň siaty dvojrnný nahý (*Hordeum vulgare* convar. *distichon* var. *nudum*), tiež nazývaný sladovnícky, pšenica špalda (*Triticum spelta*), pšenica nahá (tetraploidné aj hexaploidné - *Triticum aestivum*, *compactum*, *durum*, *turgidum*) a proso siate (*Panicum miliaceum*). Všetky získané hodnoty environmentálnych a archeobotanických faktorov sú uvedené v [11] alebo v [12].

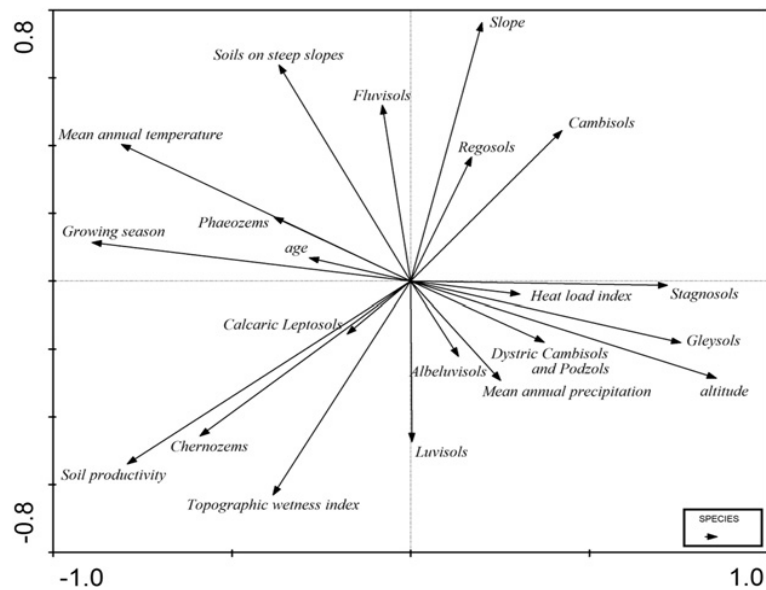
Výsledky a diskusia

Pomocou analýzy hlavných komponentov (PCA) sa vizualizuje multivariačná štruktúra zloženia plodín (obr. 2). Na lokalitách sa spolu vyskytovali pšenica jednozrnná a dvojrnná, a nebol tam ani jačmeň, ani proso. Jačmeň a proso sú negatívne korelované, to znamená, že sa takisto nevyskytujú na rovnakých lokalitách. Podobne špaldu nepestovali tam, kde pestovali proso. Naopak, pozitívne sú korelované pšenica jednozrnná s pšenicou dvojrnnou, takže boli pestované približne v rovnakom území. PCA takisto dobre vysvetľuje závislosť jednotlivých environmentálnych faktorov navzájom (obr. 3). Z obr. 3 je nejasný vzťah nadmorskej výšky a pôdnej produktivity. Výsledky ukazujú, že preferencie pre pestovanie obilnín v mladšej dobe bronzovej až staršej dobe železnej sa menili s časom (obr.

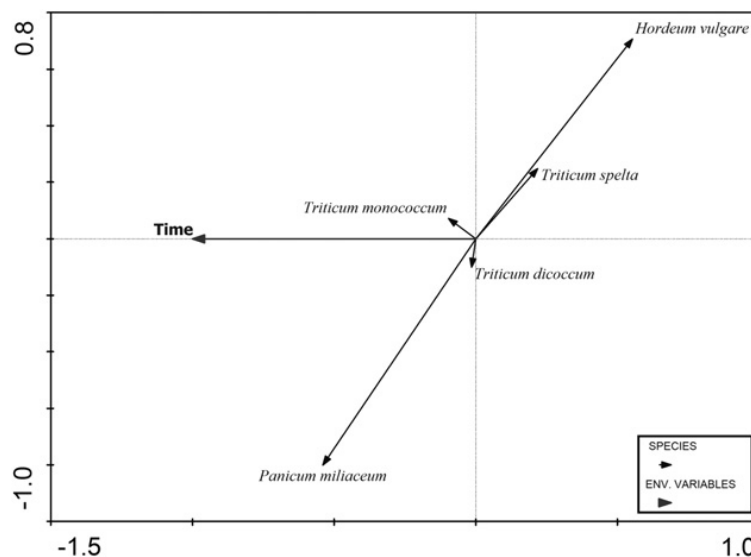
4). Takisto je jasná závislosť podielu plodín na nadmorskej výške, avšak príčina toho, prečo pribúda jačmeňa smerom do vyšších nadmorských výšok oproti ostatným sledovaným plodinám je nejasná. Nadmorská výška, celkom očakávane, ukazuje silnú negatívnu závislosť k teplote a dĺžke vegetačného obdobia. Pozitívna je závislosť k zrážkam. Takisto sa však ukázala negatívna závislosť na kvalite pôdy, avšak nie taká silná, čo môže byť spôsobené relatívne nízkym prevýšením medzi sledovanými lokalitami (do 300 m n. m.). Dokázanie jasného vzťahu medzi pestovanými obilninami a environmentálnymi parametrami sťažuje fakt, že nepoznáme nároky kultivovaných druhov v prehistorickej dobe, hoci existujú údaje o ekologických nárokoch planých („divokých“) prapredkov väčšiny plodín [13]. Hoci výsledky priamej lineárnej závislosti neurčili jasnú závislosť pestovaných druhov obilnín k pôdnej kvalite (resp. určili ju menej významnú oproti závislosti s nadmorskou výškou, od ktorej závisia ostatné podmienky prostredia) je bez diskusie nespochybniteľný fakt, že pšenica dvojzrnná je viazaná na nížiny, pôdy najlepších kvalít a oblasti s najdlhším vegetačným obdobím, rovnako ako pestovanie prosa. Fakt, že ordinačné diagramy v tomto prípade nepreukázali jasnú závislosť môže byť spôsobené tým, že pôdna kvalita je tu reprezentovaná produktivitou pôd vyjadrenou bodovou hodnotou a tak produktivita pôd s inými druhmi plodín vo vyšších nadmorských výškach (na menej prirodzene úrodných pôdach), môže mať rovnaké parametre ako produktivita pšenice dvojzrnej v nížinách na pôdach najkvalitnejších. Otázkou je či v prípade pšenice dvojzrnej a prosa nešlo o prestížne druhy pravekej komunity (ľudská spotreba).



Obr. 2 Ordinačný diagram priestorovej závislosti pestovaných obilnín (metóda PCA);
prvé dve ordinačné osi vysvetľujú 80,2 % variability v pestovaní obilnín



Obr. 3 Ordinačný diagram závislosti environmentálnych faktorov (metóda PCA);
prvé dve ordinačné osi vysvetľujú 40,9 % variability



Obr. 4 Závislosť zastúpenia pestovaných plodín na časovom faktore (metóda RDA);
vek bol testovaný ako kvantitatívna premenná a vysvetľuje 20,8 % variability v pestovaní obilnín pri
95% hladine spoľahlivosti

Záver

Poľnohospodárstvo z doby bronzovej až doby železnej bolo sofistikované, čo dokladá starostlivý výber plodín, ktoré boli vhodné pre určité environmentálne podmienky. Sledované archeobotanické súbory zuhoľnatených makrozvyškov obilnín sa javia zachovávaním originálnej štruktúry sortimentu kultivovaných rastlín v sledovanom období. Zastúpenie pestovaných druhov pšeníc a jačmeňa určitým spôsobom odráža lokálne environmentálne

podmienky, hlavne nadmorskú výšku. Hoci dnešný pôdny kryt neodráža stav v prehistorickej dobe, je možné na základe výsledkov práce vysloviť zrejmy vzťah archeobotanických a pedologických dát. Takže pôvodná hypotéza, že sortiment pestovaných plodín odpovedá pôdnym podmienkam (pšenica na kvalitných pôdach, jačmeň na pôdach horšej kvality) zostáva pravdepodobná, hoci štatisticky sa neukázala ako presvedčujúca.

Pod'akovanie

Autori ďakujú Markovi Bastlovi a Čenkovi Číšeckému za prídavné analýzy a technickú podporu.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Kočár P., Dreslerová D. (2010) Památky archeologické 101, p. 203
- [2] Lang A., Bork H. R. (2006) Past soil erosion in Europe. In: Boardman J., Poesen J. et al. Soil erosion in Europe. John Wiley & Sons, Chichester, Veľká Británia, p. 463
- [3] Leopold M., Völkel J. (2007) Atti Soc. tosc. Sci. nat. 112, p. 95
- [4] Zádorová T., Chuman T., Šefrna L. (2008) J. Soil Water Res. (3), p. 215
- [5] Kristiansen S. M. (2001) Geoderma 103, p. 273
- [6] Bogaard A. (2004) Neolithic Farming in Central Europe. Routledge, London, 209 p.
- [7] Atlas podnebí Česka (2007) Český hydrometeorologický ústav, Praha
- [8] McCune B., Keon D. (2002) J. Veg. Sci. 13(4), p. 603
- [9] Beven K. J., Kirkby M. J. (1979) Hydrol. Sci. J. 24(1), p. 43
- [10] Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy (2010) Digitálne data BPEJ, Praha
- [11] Poništiak Š. (2012) Kvalita pôd a degradácia pôd vo vybraných archeologických lokalitách. (Diplomová práca) Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Praha, p. 38
- [12] Dreslerová D., Kočár P., Chuman T., Šefrna L., Poništiak Š. (in print) J. Archaeolog. Sci. 40, p. 1988
- [13] Zohary D., Hopf M. (2000) Domestication of plants in the old world. Oxford University Press, Oxford, 328 p.

Gated communities a Bratislava

Michal Rosol

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra regionálnej geografie, ochrany a plánovania krajiny, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava; Slovensko; michenko017@gmail.com

Abstrakt

The paper is focused on gated communities, which represent an extreme form of residential separation. The number of gated communities experienced rapid growth in recent decades in the current globalizing world. This type of housing in recent years appeared also in the Slovak capital, Bratislava. The paper briefly discusses the history, the reasons and motivations which stand behind this controversial type of housing. The aim of this paper is to contribute to the general discussion and bring photographic documentation examples of gated communities in Bratislava.

Kľúčové slová: *gated communities; separácia rezidentov; Bratislava; developeri*

Úvod a formulácia cieľa

Milióny ľudí po celom svete sa sťahujú za múry a ploty obopínajúce spoločný rezidenčný priestor. K separácií dochádza keď sa nejaká skupina priestorovo vyčleňuje sama dobrovoľne. Gated communities, ktoré sa stali všadeprítomnou súčasťou urbánneho života, predstavujú v našich podmienkach vcelku nový fenomén, ktorému sa nevenuje na Slovensku dostatočná pozornosť. Cieľom príspevku je teoreticky predstaviť fenomén gated communities, priniesť príklady z prostredia Bratislavy a prispieť do všeobecnej diskusie o nich.

Materiál a metódy

V príspevku používame termín gated community a nie jeho slovenský ekvivalent, ktorý by mohol znieť ako uzatvorená komunita, pretože anglický výraz je už zažitý v odbornej literatúre a zdá sa nám vhodnejší ako preklad. Navyše nevytvára dojem, že ľudia v rámci areálu žijú v nejakej vzájomne previazanej skupine kde sa všetci dobre poznajú. Na spracovanie tejto problematiky sme použili najmä články zahraničných autorov, ktorí sa zaoberali danou problematikou, ktoré sme doplnili o vlastné poznatky a údaje získané prebiehajúcim terénnym výskumom v hlavnom meste. Problematike sa venuje mnoho zahraničných výskumníkov. Za autorov prelomovej publikácie sú označovaní americkí autori Blakely a Snyder [1], z českých výskumníkov je nevyhnutné spomenúť Brabca [2], z maďarských Cséfalvay [3]. Všeobecne sa sociálnemu štátu venuje český sociológ Keller [4].

Fotografická dokumentácia pochádza z vlastného výskumu, doplnená o informácie z internetových stránok [5], [6], [7].

Gated communities

Gated communities boli definované mnohými spôsobmi. Význam a obsah termínu gated communities je pomerne jasný. Rozumejú sa ním objekty s dvomi a viac bytovými jednotkami, ktoré sa od iných bytových objektov líšia hlavne použitím reštriktívnych ochranných prostriedkov, ako sú brány, kamerové systémy a strážne služby, aby zamedzili vstupu cudzím ľuďom do objektu a zároveň si nárokuje aj vlastníctvo verejných priestor, ako sú ulice, parky a detské ihriská. Jednou z najdôležitejších vlastností gated communities nie je brána a obmedzený vstup, ale aj spôsob správy, ktorý si vyžadujú. Zvyčajne sú spravované formou tzv. homeowner association. Asociácia je súkromná entita, ktorá si môže vytvárať vlastné pravidlá, s ktorými rezidenti súhlasia pred nast'ahovaním.

V spoločnosti spolu s tým, ako rastie nerovnosť, dochádza aj k priestorovému oddeľovaniu rôznych skupín obyvateľstva. Vidíme to v štruktúre mesta. Prakticky na všetkých kontinentoch dochádza k tomu, že vrstvy úspešných sa opevňujú vo svojich rezidenčných štvrtiach, zatiaľ čo neúspešní sú vytláčaní do upadajúcich mestských častí, ktoré majú často podobu izolovaných a chátrajúcich ghett. Sťahovanie do gated communities je reakciou na krízu verejného priestoru a zároveň túto krízu ďalej posilňuje a prehľbuje [4].

Niektorí autori [1] datujú históriu výstavby až do antiky a pokladajú staroveké a stredoveké opevnené hrady či paláce za prvé príklady gated communities. V súlade s [2] sme však presvedčení, že opevnené mestá nemožno porovnávať so súčasnými mestami. Hlavnými rozdielmi sú predovšetkým sociálna heterogenita a polyfunkčnosť historického opevneného areálu. Mohli by sme povedať, že jedinou spoločnou vlastnosťou stredovekých opevnených stavieb a dnešných gated communities je prítomnosť fyzickej bariéry [2]. Ako prvá gated community v dnešnom slova zmysle sa uvádza Tuxedo Park, ktorý bol postavený v roku 1885 neďaleko New Yorku a slúži predovšetkým pre lovecké a rybárske aktivity bohatých [1]. Boli to výnimočné miesta pre výnimočných ľudí. Od sedemdesiatych rokov dvadsiateho storočia najskôr v USA, začína dochádzať k nárastu ich počtu, stávajú sa dostupnejšie pre širšie masy, obľúbenými pre stredné vrstvy a začínajú sa rýchlo rozširovať aj do iných krajín a v súčasnosti ich nájdeme prakticky na celom svete.

Delenie gated communities na skupiny môže sledovať rôzne kritéria, spomenuli by sme len najzákladnejšie, napríklad americkí autori [1] rozlišujú tri typy:

- prestige community (komunita prestíže),

- lifestyle community (komunita životného štýlu),
- security zone (bezpečnostná zóna).

Developer stojí za vznikom prvých dvoch typov, pričom komunita životného štýlu je zameraná na bezpečnosť a separáciu za účelom vykonávania voľno časových aktivít v areáli a komunita prestíže je exkluzívne miesto pre bývanie. Za vznikom bezpečnostnej zóny stoja samotní rezidenti, ktorí postavili zábrany okolo svojich bydlísk dodatočne a majú plniť hlavne funkciu ochrany pred kriminalitou. [1]

Iná typológia bola vytvorená [2], ktorý študoval gated communities v Prahe a ktorá vychádza hlavne z fyzických predpokladov daného objektu. Gated communities rozdeľuje na:

- oplotené strážené objekty,
- strážené objekty,
- oplotené objekty.

Bratislava a gated communities

Mestá z bývalého východného bloku nemohli prejsť rovnakou skúsenosťou ako mestá v Anglicku či USA, avšak po páde železnej opony začali okolitý svet rýchlo doháňať. Bratislava ako centrum v systéme politických a administratívnych štruktúr, s najväčšou koncentráciou elít, dobre platených miest v pobočkách nadnárodných spoločností, s nízkou mierou nezamestnanosti, realitným boomom a pozíciou dokumentovanou aj faktom, že hrubý domáci produkt na obyvateľa v parite kúpnej sily je jedným z najvyšších spomedzi nových členských krajín Európskej únie, vytvára predpoklady pre existenciu gated communities.

V terénnom výskume sme za gated communities považovali objekty, ktoré sa skladajú z viac ako štyroch bytových jednotiek, vyhľadávanie prebehlo pomocou analýzy obsahu webových stránok venujúcich sa realitám [5] so zameraním hlavne na novú výstavbu. Vytypované objekty boli v teréne overené či sú to naozaj gated communities. V tomto kroku približne polovica objektov z databázy vypadla, pretože im chýbali niektoré znaky, najčastejšie zahradený vchod. Celkovo na území Bratislavy sme odhalili 19 gated communities, avšak tento stav nie je konečný, objekty stále vznikajú a nikde nie je vedená databáza objektov tohto typu, preto niektoré mohli ostať neobjavené. Prevažujú objekty oplotené s bránou brániacou vjazdu. V porovnaní s tendenciou výstavby v okolitých krajinách sme očakávali vyšší počet, ale mnoho realitných projektov, ktoré ešte nie sú dokončené, majú predpoklady stať sa gated communities dodatočnými stavebnými úpravami.

Nižšie uvádzame vybrané konkrétne príklady gated communities v Bratislave,

rozdelené podľa kategórií, ktoré použili americkí autori [1]. Slovenským podmienkam boli prispôsobené, najmä veľkosťou a inou povahou budov.



Obr. 1 Polyfunkčný dom Bonaparte

Polyfunkčný dom Bonaparte je lokalizovaný na Napoleonovom vršku v blízkosti Bratislavského hradu v mestskej časti Staré mesto. Projekt obsahuje 38 veľkometrážnych bytov vysokého štandardu [5].



Obr. 2 Reziidenčný komplex Parkville

Obytný komplex Parkville sa nachádza na juhovýchodnom svahu Koliby v mestskej časti Nové mesto. Projekt pozostáva z 93 bytov [6].



Obr. 3 Prehradená ulica na Starých Gruntoch

Tretí typ je napríklad uzatvorená ulica lokalizovaná vo vilovej štvrti v mestskej časti Karlova Ves.

Diskusia

Všeobecne možno konštatovať, že ľudia sa sťahujú do GC pretože chcú využívať vybavenie, ktoré poskytujú rezidenčné parky a nie preto, že sa chcú segregovať od spoločnosti. Obyvatelia chcú využívať možnosti komunity a žiť v bezpečnom prostredí a využívať služby a statky za ktoré si platia. Prevažuje tu tržný prístup a je nevyhnutné ďalšie skúmanie motivácií správcovských asociácií, developerov a miestnej samosprávy v procese celosvetového rozvoja gated communities [3]. Tieto motívy nachádzame aj pri ich štúdiu v Bratislave. Relevancia termínu gated communities v našich podmienkach sa môže zdať otázna. Môžeme namietat', že sú americkým konceptom a preto nie je vhodné používať ho aj u nás, avšak to by sme nemohli používať ani iné termíny ako suburbanizácia alebo urban sprawl. Ich definícia je pomerne široká a hodí sa na objekty aj v Bratislave. Globalizačné a transformačné procesy pôsobia aj na Slovensku a je ťažko predstaviteľné, že by im Bratislava odolala, preto počet gated communities bude v nasledujúcich rokoch narastať aj v našom hlavnom meste.

Záver

Rozporupnosť gated communities je znakom sprevádzajúcim ich od samotného vzniku. Nie sú ojedinelým prejavom, ale súčasťou celkovej premeny súčasnej spoločnosti. Najsilnejším aktérom pri výstavbe gated communities v Česku sú developeri [2]. Vzhľadom na spoločnú štyridsaťročnú históriu, podobné podmienky a transformačné obdobie po prechode z centrálne riadeného hospodárstva na tržnú ekonomiku, možno očakávať, že dôvody pre vznik týchto uzatvorených rezidenčných areálov sú rovnaké alebo prinajmenšom veľmi podobné podmienkam v oboch hlavných mestách vzniknutých po rozpade Československa.

V Bratislave sú gated communities najčastejšie lokalizované na úpätí Malých Karpát a v novovzniknutých rezidenčných areáloch v okrajových častiach mesta, kde je dostatok voľnej plochy na výstavbu. Geografická lokalizácia gated communities väčšinou súhlasí so sociopriestorovou štruktúrou danej oblasti, čo sa potvrdzuje aj v Bratislave. Nachádzame tu prevažne objekty vyšších stredných tried spoločnosti. V Spojených štátoch amerických je väčšina gated communities lokalizovaná v suburbánnom zázemí miest, preto by si Bratislava zaslúžila rozsiahlejší terénny výskum, ktorý by zahrňoval aj suburbánne oblasti hlavného mesta, ktoré zažili v posledných rokoch výrazný stavebný boom a kde je veľký priestor aj pre vznik gated communities.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Blakely E. J., Snyder M. G. (1997) Fortress America: Gated communities in the United States. Brookings Institute, Washington DC, USA, p. 30
- [2] Brabec T. (2009) Gated communities: residenční separace a privatizace veřejného prostoru v Česku. (Diplomová práca) Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha, p. 10
- [3] Cséfalvay Z. (2009) The demystification of gating, [Citované: 18. február 2013] <<http://www.nordregio.se/EJSD/debate200902>>
- [4] Keller J. (2010) Tři sociální světy : sociální struktura postindustriální společnosti. Sociologické nakladatelství SLON, Praha, ČR, p.20
- [5] Novostavby v Bratislave [Citované: 18. február 2013] <<http://www.novostavby-bratislava.sk/>>
- [6] Trend reality [Citované: 18. február 2013] <<http://reality.etrend.sk/byvanie/napoleonov-vrsok-sa-meni-na-bonaparte.html>>
- [7] Archiweb [Citované: 18. február 2013] <<http://www.archiweb.cz/buildings.php?action=show&id=2208>>

Segregácia Rómov na príklade vybraných slovenských miest

Martin Šuvada

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra humánnej geografie a demografie, Mlynská dolina, 842 15, Bratislava; suvada@fns.uniba.sk

Abstrakt

Subject matter of our interest is the Romany community in Slovakia, especially the individual Romany civitas who live concentrated, eventually isolated in the town area. We draw attention to Romanies who live in urban concentrated Romany colonisation and to their currently living standards.

Kľúčové slová: *Rómovia; segregácia; mesto; rómska problematika*

Úvod a formulácia cieľa

V období socialistického realizmu bola rómska problematika u nás spoločenské tabu, o ktorom sa otvorene nediskutovalo a aj vtedajšia vládna moc sa snažila pred verejnosťou budiť dojem, že tu rómsky problém neexistuje. Avšak po zmene režimu sa situácia zmenila a rómska otázka sa stále viac dostáva do popredia a v súčasnosti už patrí k jednej z najdiskutovanejších spoločenských tém.

Výskumami je dokázané, že práve miera priestorovej a sociálnej integrácie resp. segregácie je jedným zo základných určujúcich faktorov, ktoré ovplyvňujú spôsob života rómskej komunity v našich mestách. Niektorí autori považujú priestorovú segregáciu chudobných za súčasť procesu urbanizácie a utváranie mestských štvrtí, ktoré sú obývané chudobnejšími rodinami, chápu ako prirodzený proces. V našich mestách je tento segregáčny proces špecifický tým, že „*územia s koncentráciou chudobných ľudí sa začínajú meniť na etnicky homogénne rómske getá*“ [1].

Cieľom tohto príspevku preto bude priblížiť problematiku tej časti rómskej komunity, ktorá žije v našich mestách izolovane, niekedy až segregovane v mestskom priestore. Taktiež sa vynasnažíme zosumarizovať poznatky o segregáčnom procese vo vybraných mestách na Slovensku.

Materiál a metódy

V prvom rade je nutné vymedziť, že za Rómov považujeme ľudí, ktorých ako Rómov definuje ich okolie a majorita na základe ich vonkajších fyzických znakov, teda ľudí, ktorí síce môžu deklarovať odlišnú skupinovú a národnú identitu, ale ich okolie ich považuje za príslušníkov rómskej menšiny. Rozličné spôsoby vzniku segregovaných rómskych komunit

sme hodnotili najmä kvalitatívnym spôsobom a aj keď sme sa snažili poňať rómsku problematiku komplexne a neviazať ju len na určité mesto, naše zistenia sme podporili reálnymi príkladmi z konkrétnych miest.

V časti príspevku, kde sme pracovali s údajmi o počte Rómov v jednotlivých mestách resp. lokalitách sme použili údaje zo sociologického mapovania rómskych komunít z roku 2004, ktoré sú považované v súčasnosti za výrazne presnejšie ako údaje z oficiálnych sčítaní [2]. Na základné črty rómskej problematiky nazeráme z pohľadu teoretickej analýzy, ale aj praxe, kedy opisujeme hlavne skutkový stav v rómskych segregovaných komunitách, pričom sa ale nesnažíme ponúkať riešenia, ale iba charakterizovať a opísať problémy, ktoré sa v takýchto lokalitách vyskytujú. Bližšie sme sa zamerali na mestá, kde je tento problém najvypuklejší resp. najviac medializovaný. Dôležitým faktorom bola aj skutočnosť, že prípadové lokality sú vo všeobecnosti majoritou z daného regiónu brané ako rýdži príklad segregovanej rómskej komunity. Na lepšie dotvorenie obrazu o skutkovom stave rómskych segregovaných lokalít slúžia dokumentačné fotografie z nami realizovaného terénneho výskumu.

Výsledky a diskusia

Vznik mnohých segregovaných rómskych lokalít sa datuje do obdobia rokov 1948 až 1989. Napriek vládnym upozorneniam, že nemá dochádzať k tzv. nežiaducej koncentrácii rómskeho obyvateľstva, národné výbory stavali nové byty pre Rómov zväčša v okrajových častiach miest, prípadne vo zvláštnych, novovytvorených uliciach, čím položili základ dnešným koncentrovaným rómskym zoskupeniam [3]. V rámci technokratického prístupu k rómskej problematike boli hlavne v sedemdesiatych a osemdesiatych rokoch Rómovia bezhlavo sťahovaní do nových panelákových štvrtí, čím v slovenských mestách vzniklo niekoľko čisto rómskych sídlisk [4]. V tomto období vznikol aj známy Luník IX, či rómske sídlisko na Dúžavskej ceste v Rimavskej Sobote (vid'. fotodokumentácia z terénneho výskumu- Obr. 1 a 2).

Je síce pravdou, že úrady mnohokrát nechceli vytvoriť čisto rómske sídliskové geto, čo dokumentuje aj Luník IX, kde bolo rómskym rodinám pridelených 204 bytov, čo bola necelá tretina bytového fondu na tomto sídlisku. Ostatné byty zaplnili nerómske rodiny, no neprispôsobilosť Rómov a čiastočná devastácia bytového fondu viedli k zhoršovaniu interetnických vzťahov a narastaniu dištancie medzi tu žijúcimi Rómami a majoritou [4]. Problematickosť spolužitia viedla Nerómov k snahe odsťahovať sa z tohto sídliska, kde dochádzalo k stále vyššej koncentrácii Rómov, pričom táto tendencia sa ešte zvýšila po roku

1989 [3]. Vtedajší starosta Luníka IX uvádza, že ešte v roku 1992 tvorili Nerómovia 32,5% obyvateľov tohto sídliska [6]. Avšak aj oni sa do polovice 90. rokov odsťahovali a v súčasnosti podľa Atlasu rómskych komunít tvoria Rómovia 98% obyvateľov Luníka IX [2]. Treba však dodať, že z Luníka IX sa stalo čisto rómske sídlisko aj kvôli rozhodnutiu vtedajšieho primátora Košíc a starostov mestských častí, ktorí sa v roku 1992 dohodli, že pre posledných deväťsto Nerómov, vtedy žijúcich na Luníku IX, nájdú byty mimo tohto sídliska a na ich miesto nasťahujú rómskych neplatičov z ostatných častí Košíc [6].



Obr. 1 Sídlisko Luník IX v Košiciach; **Obr. 2** Sídlisko Dúžavská cesta v Rimavskej Sobote [5]

Luník IX je dodnes jedným z najvýraznejších príkladov inštitucionálnej segregácie Rómov, pričom ďalšie podobné návrhy predložilo začiatkom 90. rokov mesto Lučenec a Humenné, ktoré v extraviláne svojho mesta navrhovali vybudovať rómske satelitné mestečko s vlastnou samosprávou. V týchto prípadoch sa však navrhované projekty v predloženej forme nikdy nezrealizovali [7], aj keď rómska osada Podskalka pri Humennom sa od roku 1989 zväčšila niekoľkonásobne a to početne aj rozlohovo (viď. fotodokumentácia z terénneho výskumu- Obr. 3).



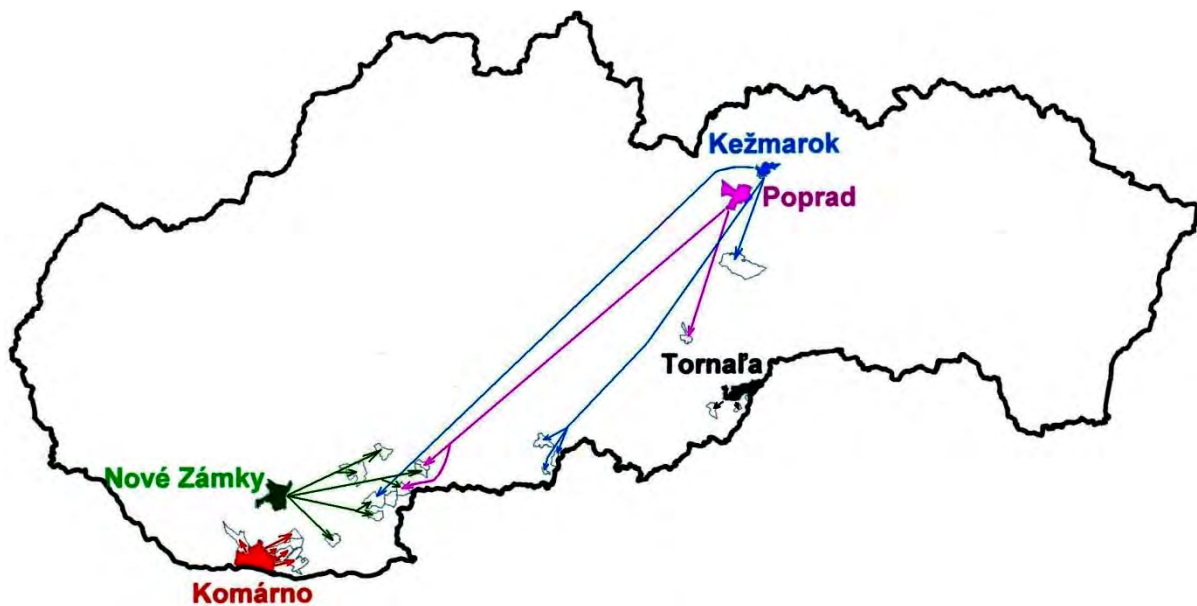
Obr. 3 Osada Podskalka v Humennom [5]

Aj v súčasnosti mnohé orgány územnej samosprávy, pri riešení problému s rómskymi neplatičmi nájomného, zvolili resp. zvažujú alternatívu vyst'ahovania neplatičov do okrajovej časti mesta alebo úplne mimo mesto. Takto pred pár rokmi vyrástla kolónia pre neplatičov za Nitrou, kedy do lokality zvanej Orechov dvor boli vyst'ahovaní neplatiči zo zničenej bytovky na sídlisku Klokočina. Ďalšou alternatívou riešenia problémov so zväčša rómskymi neplatičmi nájomného, je ich vyst'ahovanie úplne mimo mesta, častokrát do iného okresu, dokonca do iného kraja. Jedná sa vlastne o presúvanie problémov s rómskymi neplatičmi z miesta ich vzniku do inej, vzdialenej lokality a práve v posledných rokoch mnohé slovenské mestá, veľakrát po zlyhaní iných riešení začali preferovať takúto možnosť riešenia problémov s neplatičmi [7].

Najrozsiahlejšiu mediálnu pozornosť s následnou celoštátnou diskusiou vyvolalo mesto Nové Zámky, ktoré sa rozhodlo predať dva bytové domy v centre mesta, ktoré obývalo cca 250 Rómov. Nový majiteľ skúpil staré rodinné domy v dedinách novozámockého a levického okresu, kde týchto Rómov presťahoval. V susednom okresnom meste Komárno sa odohral podobný scenár, keď súkromný podnikateľ odkúpil od mesta bytovku aj s dlhmi a dlžníkmi-Rómami. Rómovia odtiaľ boli vyst'ahovaní najmä do dedín v blízkom okolí, čo vyvolalo búrlivé reakcie obyvateľov, ale aj starostov dotknutých obcí, ktorí sa snažili príchodu neprispôsobivých rómskych rodín všemožne brániť. V Tornali zasa dal mestský úrad asanovať zdevastovaný bytový dom na Poštovej ulici, kde bývalo zhruba dvesto Rómov, ktorých potom presťahovali do rodinných domov v okolitých obciach Barca a Kesovce.

Ďalším príkladom je mesto Gelnica, kde Rómovia ešte stále žijú priamo v centre mesta, pričom Gelnica je spolu s Dobšinou jedným z dvoch miest, ktoré sú najviac postihnuté importom cudzích Rómov z iných väčších miest. Do Dobšinej boli sťahovaní hlavne Rómovia z Kežmarku, kedy kežmarská radnica v snahe dostať svojich neplatičov z centra mesta, kúpila v Dobšinej niekoľko lacných domov, do ktorých presťahovali svojich neplatičov. Desiatky kežmarských Rómov sa však do Dobšinej sťahovali aj predtým. Domy im však v tomto prípade kupovali podnikatelia, ktorí chceli získať nehnuteľnosti v centre Kežmarku. V Dobšinej, kde podľa odhadov tvoria Rómovia až tretinu obyvateľov mesta, bolo na základe petičnej akcie, ktorú podpísala viac ako polovica obyvateľov Dobšinej, zrušená výstavba sociálnych bytov, nakoľko medzi obyvateľmi panovala obava, že sem budú nasťahovaní ďalší Rómovia z iných miest [2] [8]. Spomínaný Kežmarok sa neplatičov-Rómov, ktorí žili v centre mesta v troch zdevastovaných, ale historických budovách, zbavil aj sťahovaním do starších domov vo vzdialených dedinách levického a veľkokrtíšskeho okresu (Obr. 4). Podobne

dopadli aj deložovaní Rómovia z Popradu, ktorým mesto zabezpečilo náhradné ubytovanie v dedinách, z ktorých všetky sú minimálne sto kilometrov vzdialené od Popradu (Obr. 4).



Obr. 4 Mestá SR ktoré vysťahovali Rómov-neplatičov +obce kde boli títo Rómovia presťahovaní

V súčasnosti najaktuálnejší prípad plánovaného vysťahovávania Rómov z mesta je z Bánoviec nad Bebravou, kedy by sa mali sťahovať Rómovia žijúci na Ulici k nemocnici, ktorá leží priamo v centre Bánoviec. V troch zdevastovaných bytovkách, v ktorých sa nachádza 58 bytov, je prihlásených na pobyt takmer štyristo Rómov, avšak neoficiálne ich tu žije až šesťsto. Tieto prípady nie sú ojedinelé, pričom ďalšie mestá, kde sa hovorí o sťahovaní Rómov mimo mesto sú napríklad Vráble, Svidník, Dunajská Streda, Kremnica, Čadca, Zlaté Moravce, Lučenec a iné.

Záver

Segregácia a rôzne riadené presuny Rómov, častokrát vedú k výraznejšiemu zhoršeniu interetnických vzťahov. Emócie vyvolávajú aj mnohé mestá, ktoré riešili, riešia alebo plánujú riešiť problematiku Rómov na území ich mesta, jednoducho vysťahovaním týchto ľudí mimo mesto. Takéto, ale aj ďalšie príklady jasne dokazujú, že miera emancipácie Rómov v mestách SR sa vplyvom veľkého množstva problémov dokázateľne znižuje. Kriminalita, častá devastácia obydli a okolia, zlé hygienické návyky, preľudnenosť bytov a obrovská nezamestnanosť sú závažné problémy, s ktorými sa stretávajú tieto Rómami obývané areály miest. A keďže aj majoritného obyvateľstva sa tieto problémy výrazne dotýkajú, už sa

nejedná len o problém Rómov, ale o problém, ktorý ovplyvňuje všetkých občanov Slovenskej republiky.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Vašečka I. (2006) Sociálne potrební Rómovia a sociálna pomoc v Českej republike. [Dizertačná práca]. Masarykova Univerzita v Brne. Fakulta sociálnych štúdií, 2006. 241 p. + 38 p. príloh.
- [2] Radičová I. a kol. (2004). Atlas rómskych komunít na Slovensku. [cit. 25.11.2009]. Dostupné na internete: <<http://romovia.vlada.gov.sk/index.php?ID=3553>>
- [3] Kotvanová A., Szép A. (2002) Migrácia a Rómovia. Historické, sociálne a politické súvislosti. Bratislava : Academic Electronic Press, 2002. 102 p.
- [4] Šebesta M. (2003) Rómovia pod patronátom socialistického štátu (1948 – 1989). In: Kotvanová A., Szép A., Šebesta M. (2003) Vládna politika a Rómovia 1948- 2002. Bratislava : Academic Electronic Press, p. 11
- [5] Šuvada M. Fotodokumentácia z terénnych výskumov (2007-2011).
- [6] Weber A. (1992) Vytvoríme rómske mesto. In: Obecné noviny. 2(15), p. 8.
- [7] Kačáni D. (1995) Odsúdení na spolužitie. In: Obecné noviny. 5(21), p. 14-15.
- [8] Hojsík M., Lajčáková J. (2007) Rómovia. In: Kollár, M. et al. (ed). Slovensko 2007 Súhrnná správa o stave spoločnosti. Bratislava : Inštitút pre verejné otázky, 2007, p. 164

Současný stav hald v Rosicko – oslavanském uhelném revíru a možnosti jejich využití

Martin Svoboda

*Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra rozvojových studií,
17. listopadu, 771 46 Olomouc, Česká republika; martin.svoboda@upol.cz*

Abstrakt

The purpose of the article is to assess the importance of heaps for the land Rosicko – Oslavany coalfield. The heap is an anthropogenic landform resulting from the accumulation of mineral resources extracted from the land. The heap shows as an unusual geomorphological shape, which does not belong to the environment at first glance. In many respects the heap acts as a barrier for the other development because the heap may contain a dangerous material or may be unstable because of wrong storage of the material. The heaps in studied region stem from the black coal mining. The totals of 11 heaps were discovered during the field reconnaissance. While the heap Jindřich has a good potential for the other use, the heap Kukla represents a burden for its nearest surroundings.

***Klíčová slova:** haldy; antropogenní geomorfologie; těžba černého uhlí; rekultivace*

Úvod a formulace cíle

Vliv lidské činnosti na georeliéf se projevuje hlavně třemi základními způsoby: přímým nebo nepřímým ovlivňováním přírodních geomorfologických pochodů, a to jak jejich zrychlováním, tak i zpomalováním; neplánovaným (nezáměrným) vytvářením povrchových tvarů s přispěním přírody (např. pokles povrchu poddolovaných území); plánovitým (záměrným) vytvářením nových antropogenních tvarů antropogenními pochody, tj. antropogenní degradací, planací, akumulací a rekultivací [1].

Vznik hald se tedy řadí do třetí skupiny, to znamená, že haldy vznikly antropogenními pochody a to jako důsledek těžby nerostných zdrojů. Tento antropogenní tvar má významný vliv na okolní reliéf a celkovou geomorfologii krajiny. Velké haldy se stávají významným a dobře viditelným prvkem krajiny. Propojení s okolním prostředím by vyžadovalo velmi dlouhé časové období a i v takovém případě by nebylo úplné. Proto je nutné, aby za pomoci odborníků došlo k trvalému propojení hald s přirozeným okolím v co nejpříjemnější podobě. K tomuto kroku slouží plánovité zakládání hald a jejich následná technická a biologická rekultivace. Haldy jsou zakládány v místech povrchové nebo hlubinné těžby a jsou výsledkem antropogenních těžebních pochodů. Těžebními pochody vznikají těžební antropogenní tvary nového georeliéfu.

Halda je antropogenní útvar trvalého charakteru, vzniklý nahromaděním hlušiny při těžbě a mechanické úpravě nerostných surovin a při činnostech prováděných horníky,

nebo hornickým způsobem [2]. Těžební haldy jsou konvexní antropogenní tvary, které vznikají při těžbě, při úpravě vytěženého nerostu nebo při průzkumu [1]. Cílem práce bude v modelové lokalitě Rosicko – oslavanského uhelného revíru provést inventarizaci hald a detailně zmapovat současný stav hald podle předem stanovených kritérií. Na základě zjištěných dat zhodnotím možné využití hald a jejich roli v rozvoji regionu.

Materiál a metody

Problematika hald je velice specifická oblast, ke které neexistují ucelené publikace. K dispozici jsou práce zabývající se obecně antropogenními tvary reliéfu, jejichž součástí jsou základní informace o haldách. Organizace řešící problematiku hald vydávají technické zprávy o stavu a průběhu sanačních a rekultivačních prací, z kterých lze čerpat informace o způsobu provedení těchto prací. Řadu užitečných informací lze získat z odborných článků a z diskuzí s pracovníky odštěpného závodu GEAM Dolní Rožínka.

Základní typologii a genezi hald jako antropogenního tvaru reliéfu řeší ve svých pracích Demek [1] a Horčíčka [2]. Podle polohy rozlišujeme haldy rovinné umístěné na rovině nebo plošině, svahové umístěné na svahu a vyrovnávací umístěné ve sníženinách a pohřbívací tuto sníženinu. Podle tvaru rozlišujeme kuželovité, hřebenovité a tabulovité haldy. Svahy hald mohou být plynulé nebo stupňovité [1].

Základním zdrojem informací se mi stalo vlastní terénní mapování, při kterém jsem zjišťoval aktuální stav hald a provedl jsem jejich inventarizaci. Jako podkladový materiál pro lokalizaci hald mi posloužila technická zpráva DIAMO s. p. [3]. Pro potřeby terénního mapování jsem si vytvořil skupinu základních charakteristik, které jsem u každé haldy zjišťoval. Výběr charakteristik vycházel z předpokladu co nejdříveji popsat současný stav haldy a zjistit její aktuální využití. Vedl jsem si průběžnou dokumentaci, kde jsem zaznamenával zjištěné skutečnosti a pro lepší představu o současném stavu sledovaných hald jsem pořizoval fotografie. Zde uvádím zjišťované charakteristiky: typ haldové stavby, složení haldy, stabilizace svahů, úprava a charakteristika povrchu haldy, umělé odtěžení, vyhoření haldy, přechod do rostlého terénu, charakteristika biologického oživení. Po kompletní revizi všech hald, jsem si vybral dvě největší haldy (Jindřich, Kukla) a ty jsem podrobil detailnějšímu mapování. Zjišťoval jsem strukturu vegetačního pokryvu, sklony svahu, horninové složení, možnosti výskytu erozních a ronových rýh, sesuvů, stupňů hald, stezek a možnosti využití haldy.

Výsledky a diskuze

V Rosicko-oslavanském uhelném revíru se nachází celkem 11 hald, které eviduje DIAMO s. p. a dalších 35 deponií pod správou ČGS – Geofondu [4]. Veškeré haldy v území vznikly při těžbě černého uhlí. Všechny haldy prošly různými způsoby technické rekultivace a byly předány příslušné obci. S výjimkou haldy Kukla, kde je nařízena nová rekultivace a tudíž je stále v majetku státního podniku DIAMO. Haldy se převážně vyskytují v těsné blízkosti dříve fungujících dolů a jam a ve většině případů plně zapadly do okolní krajiny. Nejvíce hald, celkem 4, se vyskytují v katastru obce Oslavany a zaujímají rozlohu 7 ha, což je přibližně 0,4 % rozlohy katastru. V k. ú. Zbýšov se nacházejí 3 haldy o celkové rozloze 15 ha (2,5 % rozlohy katastru). V k. ú. Babice u Rosic se vyskytují 2 haldy o celkové rozloze 5,4 ha (1 % rozlohy katastru), v k. ú. Zastávka se nachází 1 halda o rozloze 2,5 ha (2,1 % rozlohy katastru) a v k. ú. Rosice se vyskytuje 1 halda o rozloze 0,3 ha, což je zanedbatelné procento rozlohy katastru.

Haldy jsem rozdělil do dvou skupin podle typu haldové stavby a její následné dominance v krajině. První skupinu tvoří haldy, které jsou částečně nebo úplně srovnány a nejsou pouhým okem viditelné a dominantní v krajině. Tyto haldy vznikly přímým sypáním z důlních vozů a jejich plocha nepřesahuje 3 ha. Do druhé skupiny patří haldy nesrovnané, kuželovitého a tabulovitého tvaru, které jsou viditelným až dominantním prvkem v krajině. Tyto haldy vznikly nasypáváním z lanovky či pásového dopravníku a díky tomu získaly tento tvar. Oproti haldám z první skupiny jsou většinou vyšší, obsahují více uloženého materiálu a zaujímají větší plochu.

Tab. 1 Přehled hald v Rosicko – oslavanském uhelném revíru [3]

název haldy	ploc ha (ha)	stav rekultivace	katastrální území	typ haldy
Ferdinand - Pionýr	0,3	vegetační porost – smíšený les	Rosice	nesrovnaná
Zastávka (Červený vrch)	2,5	upraven a předán obci	Zastávka	srovnaná
Zastávka (U myslivny)	0,4	přirozené zahlazení	Babice u Rosic	srovnaná
Ferdinand	5,0	částečně porostlý náletovými dřevinami	Babice u Rosic	nesrovnaná
Jindřich	12,0	rekultivován, předán obci	Zbýšov	nesrovnaná
Simson	1,0	upraven a předán obci	Zbýšov	srovnaná
Anna	2,0	zatravněn, částečně využíván jako skládka	Zbýšov	srovnaná
Mašinka	0,4	zalesněn náletovými dřevinami	Oslavany	nesrovnaná
Františka	0,7	technicky rekultivován srovnáním	Oslavany	srovnaná
Charlota	0,4	zalesněn, splynutí s okolím	Oslavany	srovnaná
Kukla	5,5	částečně rekultivován	Oslavany	nesrovnaná



Obr. 1 Lokalizace hald v Rosicko – oslavanském uhelném revíru

Halda Kukla se nachází v severovýchodní části obce Oslavany a byla založena u dolu Kukla. Halda se skládá z vytěžené horniny a suťového materiálu. Vyhoření haldy deklaruje do červena zabarvená hornina. Teplota uvnitř haldy se stále pohybuje okolo 30°C. Přechod do rostlého terénu je vyřešen sypáním. Halda byla v minulosti rekultivována, ale rekultivace nebyla dokončena. Nyní na haldě probíhá těžba kameniva a haldovina se využívá pro zasypávání důlních děl ústíích na povrch. Povrch je tedy velice členitý a různorodý. V místech, kde se netěží je halda porostlá náletovými dřevinami- osika obecná, bříza

bělokorá. Zbytek povrchu je tvořen horninou a rozemletými částicemi, které vznikají při těžbě. Momentální stav haldové stavby je nevyhovující. Obecně můžeme hovořit o nedostatečném vegetačním pokryvu, destabilizovaných svazích, nevyřešeném přechodu do rostlého terénu a o celkově špatném splynutí s okolní krajinou. Z těchto důvodů lze haldu prozatím využít pouze k těžebním účelům.

Halda Jindřich je největší haldou v Rosicko-oslavanském uhelném revíru a rozkládá se severovýchodně od obce Zbýšov vedle dolu Jindřich I. Na haldu byla zprvu navážena hornina a popel, později už jen vytěžená hornina. Část hlušiny byla v minulosti odtěžena. Vnitřní vyhoření nám dokazuje nálezy do červena zbarvené horniny. Svahy jsou stabilizované opěrnými lavicemi. Přejít do rostlého terénu je vyřešen sypaním. Povrch haldy byl částečně biologicky rekultivován výsadbou osiky obecné, břízy bělokoré a borovice černé. Z poloviny je povrch tvořen náletovými dřevinami - osika obecná, bříza bělokorá, smrk ztepilý, borovice černá. Nejzajímavější částí haldy je jižní svah. Zde se vlivem antropogenních a klimatických podmínek vytvořila křovinatá step. Step se nachází ve střední části jižního svahu a zaujímá přibližně 100 m². Vznik křovinaté stepi zapříčinila orientace svahu na jih, což znamená, že sem dopadá více slunečního záření než na ostatní svahy a dochází k většímu vypařování vody. Dalším významným činitelem je sklon svahu, který osciluje mezi 30 - 35°. Tudíž srážková voda rychle odtéká a svah trpí nedostatkem vody. Odtok srážkové vody dokazují ronové rýhy na povrchu. Vegetační pokryv tvoří z velké části teplomilné traviny dále náletové dřeviny - bříza bělokorá, borovice černá, osika obecná. U paty svahu roste růže šípková a bez černý. Na svahu se vyskytují místa bez vegetačního krytu, pokrytá zvětralým uloženým materiálem. Celý jižní svah i s křovinatou stepí můžeme označit za částečně nestabilní. Důkazem jsou opilé stromy a také lokální sesuvy půdy.

Halda Jindřich se díky své velikosti a zasazením do okolní krajiny stala dominantní součástí přírodního prostředí obce Zbýšov, a proto má velký potenciál k dalšímu využití. Nabízí se vytvoření oddychové a relaxační zóny pro obyvatele okolních vesnic i návštěvníků kraje. Lze zde vybudovat značenou vycházkovou trasu po jednotlivých stupních haldy až na samotný vrchol haldy, z kterého je dostatečná viditelnost na přilehlou obec Zbýšov, nedaleké město Oslavany, jadernou elektrárnu Dukovany a krajinu Boskovické brázdy a Bobravské vrchoviny. Svahy haldy je ale nutno zabezpečit proti sesuvům a na tato nebezpečná místa zakázat vstup. Výstavba rozhledny není možná z důvodu nestability a stálého sesedání uloženého materiálu



Obr. 2 Halda Jindřich

Závěr

Haldy jako důsledek hornické činnosti mohou pro své okolí znamenat bariéru rozvoje nebo příležitost k zatraktivnění lokality. Aplikací sanačních a rekultivačních nástrojů se snažíme haldy připravit k dalšímu využití. Do procesu nám vstupuje řada faktorů, které pozitivně či negativně ovlivňují výsledek obnovy haldy. Zásadními bariérami dalšího rozvoje jsou negativní faktory, které je potřeba postupně odstranit. Podstatnou roli v procesu obnovy hraje velikost a složení haldy, stabilita svahů haldy, umístění a stáří haldy.

Terénním mapováním realizovaným v oblasti Rosicko – oslavanského uhelného revíru jsem na konkrétních příkladech dokumentoval současný stav rekultivačních prací na haldách a využití těchto hald. Výsledky mapování přinesly zjištění, že žádná ze zkoumaných hald není pro životní prostředí nebezpečná a nebrání dalšímu rozvoji oblasti. Snad jediná výjimka je halda Kukla, kde se rekultivace částečně nezdařila a plánuje se rekultivace nová.

Seznam použité literatury

- [1] Demek J. (1984) Obecná geomorfologie III. SPN, Praha, p. 5
- [2] Horčíčka L. (2002) Klasifikace a možnosti využití odvalových hald na Kladensku. Geologické služby s.r.o., Chomutov, p. 34
- [3] DIAMO státní podnik Stráž pod Ralskem, odštěpný závod GEAM Dolní Rožínka (2004) Odstraňování zátěží uhelného hornictví ve správě o.z. GEAM Dolní Rožínka: Blok E. GRAM, Dolní Rožínka, p. 41
- [4] Česká geologická služba [Citované: 11. března 2011]
< <http://www.geology.cz/extranet> >

Migračná atraktivita v kontexte polohy územia

Michal Szabo

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra humánnej geografie a demografie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
michalszabo.tua@gmail.com*

Abstrakt

This paper is an attempt to open a discussion about the need of measuring the eccentricity of a region. Also it is an attempt to introduce new indicators in measuring the attractivity of region with focus on the eccentricity phenomena.

Kľúčové slová: *migrácia; migračná vzdialenosť; atraktivita; poloha; excentricita;*

Úvod a formulácia cieľa

V demografickej literatúre i mimo nej sa bežne stretávame s analýzami migračných procesov. Najštandardnejšie sa používajú miera čistej migrácie a index migračnej efektívnosti. Ich základným porovnávacím atribútom je porovnanie počtu imigrantov a emigrantov [1,2]. Ďalší pohľad na migračné procesy predstavil Bezák, keď uviedol dištančne vážené migračné miery [3]. Miera čistej atraktivity a index atrakčnej efektívnosti rozširujú predchádzajúce štandardné ukazovatele o element migračnej vzdialenosti.

Avšak výrazne excentrická poloha (napríklad poloha Bratislavy vzhľadom na územie SR) môže umelo ovplyvniť túto migračnú vzdialenosť. Cieľom tohto príspevku je teda navrhnúť metódu na odstránenie vplyvu excentricity skúmaného územia a tiež pokúsiť sa vniesť túto metódu do nového komplexnejšieho ukazovateľa, ktorý by zohľadňoval nielen objem migrácie a migračnú vzdialenosť, ale zároveň by bral do úvahy polohu územia vo vzťahu k excentricite.

Materiál a metódy

Ako vstupné údaje pre objem migrácie sú použité údaje o medziokresnej migrácii z pramenných diel ŠÚ SR z rokov 2009 až 2011 [4] a sú vyrovnané metódou kľzavých priemerov.

Vzdialenosti medzi okresmi boli vypočítané pomocou GIS použitím nástroja Spider Graph. Takto boli vypočítané nielen vzdialenosti medzi okresmi ktoré boli zapísané do matice pre ďalšie výpočty. Z nej je vypočítaná aj priemerná vzdušná vzdialenosť (PVV_i) ako aritmetický priemer vzdialeností okresu i od ostatných okresov,

$$PVV_i = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n d_{ij} \quad [I.]$$

kde n je počet okresov a d_{ij} je vzdialenosť centroidov okresov i a j .

Pri výpočte vzdialenosti medzi košickými mestskými okresmi a okresom Košice - okolie bola mierne upravená metodika. Namiesto vzdialeností centroidov okresov boli analogicky počítané vzdialenosti každého košického okresu od všetkých obcí okresu Košice - okolie. Táto zmena je nutná z dôvodu umiestnenia centroidu okresu KS mimo svojho vlastného územia, na území mesta Košice.

Priemerná vzdušná vzdialenosť je základom pre výpočet indexu excentricity okresu (exc_j), ktorý je pomerom priemernej vzdušnej vzdialenosti skúmaného okresu a minimálnej priemernej vzdušnej vzdialenosti okresu zo skúmaného súboru okresov (pre okresy SR je to okres BB~108,3km).

$$exc_i = \frac{PVV_i}{PVV_{min}} \quad [II.]$$

Tento index je následne použitý pri výpočte priemernej imigračnej vzdialenosti očistenej o vplyv excentricity územia (PIV_i^{exc}), čo je suma jednotlivých osobovzdialeností pre všetky okresy vydelených indexom excentricity a následne delená sumou všetkých imigrantov. Analogicky vytvoríme aj priemernú emigračnú vzdialenosť očistenú o vplyv excentricity územia (PEV_i^{exc}). Zápis rovníc je nasledovný:

$$PIV_i^{exc} = \frac{\sum_{j=1}^n \left(\frac{I_{ji} \cdot d_{ij}}{exc_j} \right)}{\sum_{j=1}^n I_{ji}} \quad [III.]$$

$$PEV_i^{exc} = \frac{\sum_{j=1}^n \left(\frac{E_{ij} \cdot d_{ij}}{exc_j} \right)}{\sum_{j=1}^n E_{ij}} \quad [IV.]$$

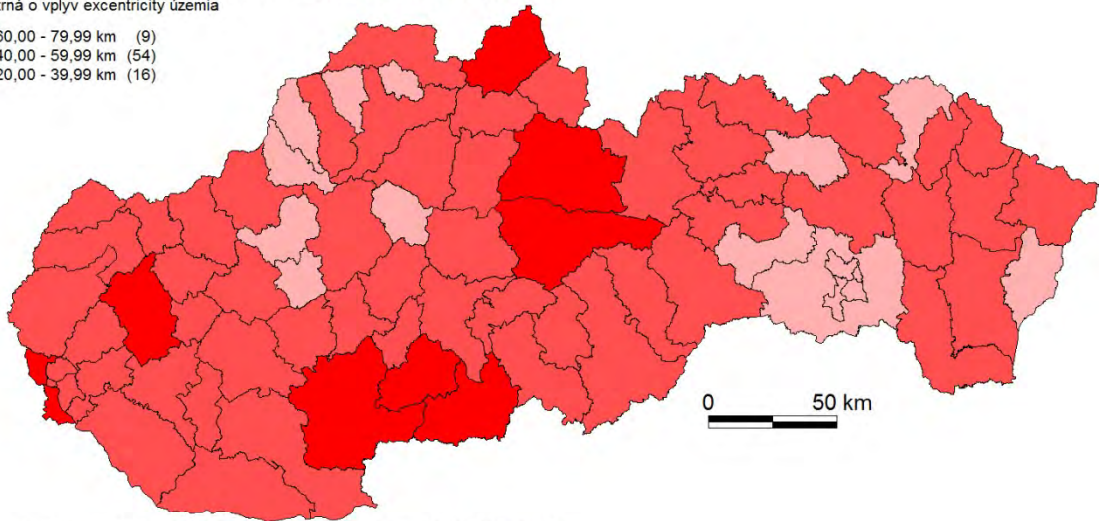
kde n je počet okresov, I_{ji} je počet imigrantov z okresu j do i , E_{ij} je počet emigrantov z okresu i do j a d_{ij} je vzdialenosť okresov i a j .

Tieto dva ukazovatele spolu v pomere udávajú index atraktivity okresu i očistený o vplyv excentricity územia (IA_i^{exc}).

$$IA_i^{exc} = \frac{PIV_i^{exc}}{PEV_i^{exc}} \quad [V.]$$

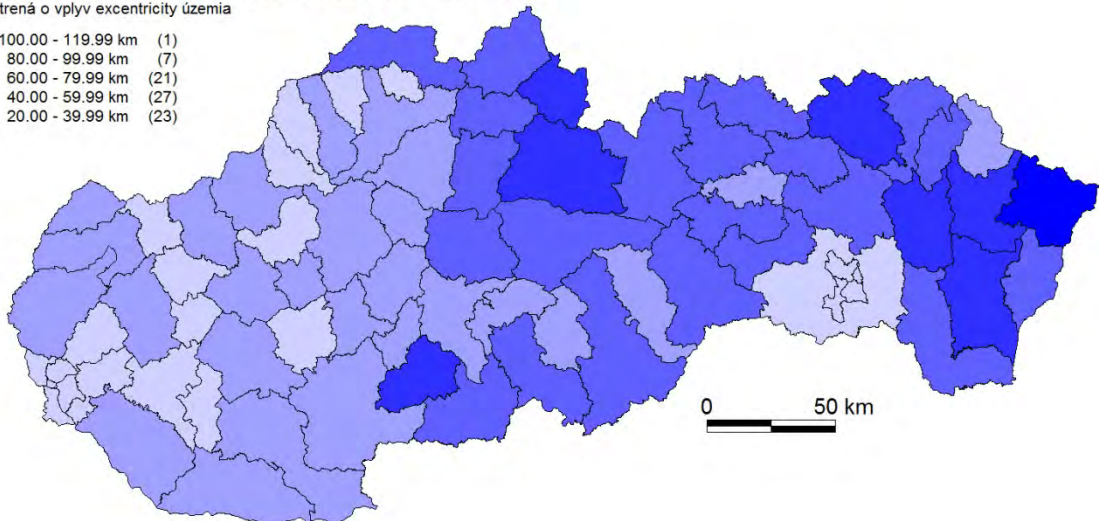
Priemerná imigračná vzdialenosť podľa okresov SR v rokoch 2009-2011
ošetrená o vplyv excentricity územia

- 60,00 - 79,99 km (9)
- 40,00 - 59,99 km (54)
- 20,00 - 39,99 km (16)



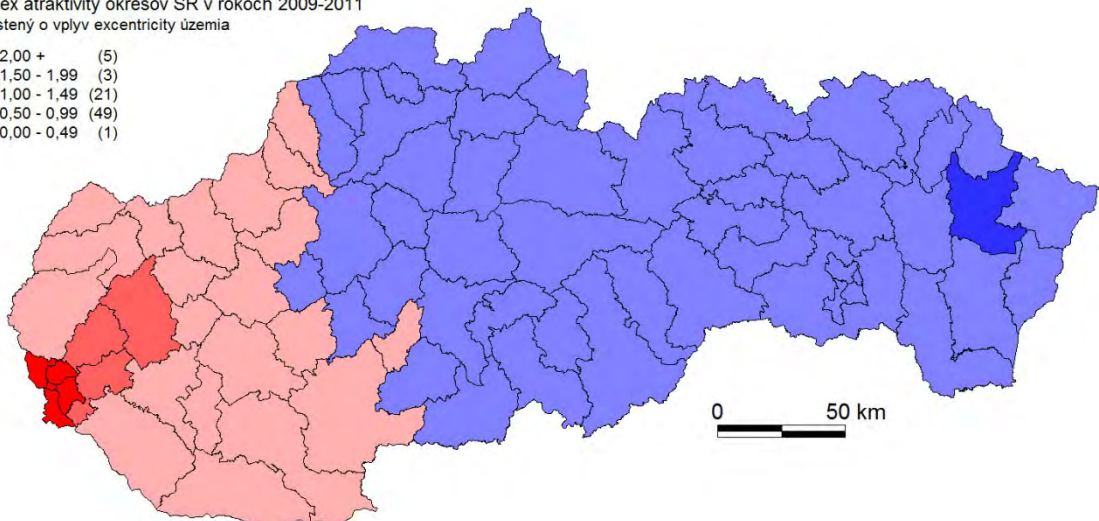
Priemerná emigračná vzdialenosť podľa okresov SR v rokoch 2009-2011
ošetrená o vplyv excentricity územia

- 100,00 - 119,99 km (1)
- 80,00 - 99,99 km (7)
- 60,00 - 79,99 km (21)
- 40,00 - 59,99 km (27)
- 20,00 - 39,99 km (23)



Index atraktivity okresov SR v rokoch 2009-2011
očistený o vplyv excentricity územia

- 2,00 + (5)
- 1,50 - 1,99 (3)
- 1,00 - 1,49 (21)
- 0,50 - 0,99 (49)
- 0,00 - 0,49 (1)



Obr.1 Priestorové rozloženie migračných vzdialeností a indexu atraktivity očistených o vplyv excentricity územia

Výsledky a diskusia

Keď uvedené ukazovatele zobrazíme graficky pre okresy SR vidíme, že aplikácia samostatných priemerných migračných vzdialeností PIV_i^{exo} a PEV_i^{exo} zobrazuje oba aspekty migrácie rozlične (obr.1). Imigrácia (PIV_i^{exo}) je zobrazená pomerne rovnomerne, s iba miernym nárastom hodnoty v smere od východu na západ, čo možno interpretovať rovnomernou dochádzkovou vzdialenosťou.

Naopak emigrácia (PEV_i^{exo}) je jasne zobrazená so zreteľným východo-západným gradientom, kde jedinou výnimku tvoria Košické mestské okresy a ich okolie. To možno interpretovať jednoducho. Emigranti z východnejších okresov SR migrujú na dlhšie vzdialenosti (najmä do hlavného mesta) a naproti tomu migranti zo západnej časti SR a Košíc a okolia migrujú na kratšie vzdialenosti (suburbanizácia).

Index atraktivity (IA_i^{exo}) už zobrazuje očakávaný východo-západný gradient, ktorý je zjavný z väčšiny tradičných analýz migračných tokov [2], no jeho hodnoty nedosahujú také výrazné výkyvy, sú vyhladenejšie a najmä nezvýrazňujú excentrickú polohu okresov na štátnej hranici. Hoci bratislavské mestské okresy vystupujú aj v tomto prípade nad ostatné, pri mierach kde nie je ošetrená excentrická poloha územia by vystupovali ešte výraznejšie [5].

Záver

Zámerom tohto príspevku bolo otvoriť diskusiu o potrebe merania a ošetrenia excentricity územia a jej vplyvu pri analýzach migračných procesov. Predložené ukazovatele sú iba pokusom pre ich uvedenie do praxe, no neukazujú sa ako neopodstatnené. Reflektujú východo-západný gradient. Rovnako odzrkadľujú skutočnosť, že Bratislava sťahuje migrantov z celého územia SR a Košice sťahujú najmä z blízkeho okolia.

Taktiež na mapovom výstupe vidíme vyhladenosť priestorového rozloženia indexu atraktivity a spomínaný východo-západný gradient.

Predstavené ukazovatele sú pokusom o implementáciu faktoru polohy na atraktivitu územia v kontexte migrácií. Zohľadňujú počet migrantov, migračnú vzdialenosť, polohu územia a rozširujú možnosti skúmania migračných procesov.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Mládek J. (1992) Základy geografie obyvateľstva. SPN, Bratislava
- [2] Jurčová D. (2010) Migračné toky v Slovenskej republike, Infostat, Bratislava
- [3] Bezák A. (2008) Geografická revue 4(2), p. 31
- [4] ŠÚ SR 2012: Pohyb obyvateľstva v Slovenskej republike v roku 2009 - 2011

(Pramenné dielo)

- [5] Bezák A. (2011) *Acta Geographica Universitatis Comenianae* 55(2), p. 149

Využitie regresnej analýzy pre potreby modelovania kontaminácie pôd potenciálne toxickým prvkom - arzénom

¹Michal Veselský, ¹Libor Burian, ²Veronika Veselská

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, ¹Katedra fyzickej geografie a geoekológie, ²Katedra geochemie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko; veselskym@fns.uniba.sk

Abstrakt

Modeling of phenomenon of objective reality (through deductive modeling) has become common in geography science. Proposed work is using upper mentioned methodic for modeling concentration of Arsenic around storage of ash near Zemianske Kostolány. Contamination of soil, in this area, was caused by perforation of dam on original pond after intensive rain events in 1965. Local morphometric variables of zero order (altitude), first order (slope, aspect), second order (profile curvature, tangential curvature) and regional morphometric variables (drainage area, wetness index) were used like inputs into model. Very low values of coefficient of determination were caused by uneven spatial distribution of sample points.

KLúčové slová: *regresná analýza; modelovanie kontaminácie; morfometrické charakteristiky*

Úvod a formulácia cieľa

Environmentálnu záťaž považujeme v zmysle zákona č. 384/2009 Z. z [1] za znečistenie územia spôsobené činnosťou človeka, ktoré predstavuje závažné riziko pre ľudské zdravie, alebo horninové prostredie, podzemnú vodu a pôdu, s výnimkou environmentálnej škody. Dobrým príkladom takéhoto znečistenia je aj kontaminácia pôd potenciálne toxickými prvkami. Zámerom práce bola primárna analýza kontaminácie poľnohospodárskych pôd arzénom (As) z pôvodného materiálu elektrárenských popolov vznikajúcich pri spaľovaní lignitu v Tepelnej elektrárni Nováky (ENO). Arzén je jedným z najviac problémových prvkov v elektrárenských popoloch [2]. Životné prostredie je negatívne ovplyvnené najmä v dôsledku unikania arzenu prostredníctvom emisií polietavého popola počas procesu spaľovania uhlia alebo pri erózii z otvorených popolových odkalísk, kde sa odpad po spaľovaní uhlia ukladá. V prípade odkaliska v Zemianskych Kostolánoch sa v dôsledku stekutenia popolového materiálu vylialo do okolitej krajiny približne 3 milióny ton popolového kalu. Celková plocha území zaplaveného popolom s minimálnou hrúbkou pol metra (lokálne aj viac ako 2 m) sa odhaduje do 20 km², pričom najväčší negatívny dopad kontaminácie sa prejavil na pôdnych a vodných systémoch. Približne 19 000 ha pôdy využívanej prevažne na poľnohospodárske účely bolo kontaminovaných toxickým prvkom arzénom. Popoly boli následne riekou Nitra rozplavené až do vzdialenosti 100 km. Zdroj vodorozpustnej formy arzenu

v kontaminovaných pôdach nie je vyčerpaný a potenciál elektrárenských popolov a kontaminovaných pôd uvoľňovať arzén do prostredia zostáva naďalej problémom. Teoretickým riešením je sanácia depozičných priestorov, ktorá je podmienená dostatočne kvalitným modelom priestorovej distribúcie As.

Cieľom predkladanej práce je vytvoriť metodiku tvorby deduktívneho modelu prostredníctvom regresnej analýzy. Následne túto metodiku aplikovať na modelovom území.

Materiál a metódy

Odber vzoriek pôd a pod nimi ležiacich elektrárenských popolov bol realizovaný prostredníctvom ručného odberového vrtáka z hĺbok 0 – 30 cm, 30 – 60 cm, 40 – 100 cm. Každé odberové miesto bolo následne zamerané prostredníctvom turistického GPS. Celkové koncentrácie As vo vzorkách boli stanovené metódou RTG fluorescenčnej analýzy.

Lineárna regresia umožňuje prostredníctvom rovnice regresného modelu vypočítať hodnotu závislej premennej od jednej nezávislej premennej (párová lineárna regresia) alebo od viacerých nezávislých premenných (viacnásobná lineárna depresia). Párová lineárna regresia sa vyjadruje prostredníctvom vzťahu:

$$y = \beta_0 + \beta x \quad [I.]$$

Analogicky viacnásobná lineárna regresia sa vyjadruje prostredníctvom vzťahu:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_i x_i \quad [II.]$$

kde: y je závisle premenná, $\beta, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_i$ sú hodnoty regresného koeficientu, x_1, x_2, \dots, x_i sú hodnoty nezávisle premenných a β_0 je hodnota absolútneho člena [3], [4].

V prípade viacnásobnej (ľubovoľnej) regresie je nevyhnutné vybrať premenné, ktoré:

1. sú od seba nezávislé – napríklad nie je vhodné využívať v rámci jednej analýzy premenné sklon georeliéfu v smere maximálneho gradientu gravitačného poľa a sklon georeliéfu v smere minimálneho gradientu gravitačného poľa. Tento problém je možné riešiť faktorovou analýzou.
2. ovplyvňujú zmenu závislej premennej – napríklad v našom prípade nie je vhodné využívať premennú hustoty obyvateľstva, ktorá zjavne závislú premennú neovplyvňuje. V tomto prípade je vhodné využívať algoritmy, ktoré do modelu pridávajú len premenné, ktoré splnia kritérium hladiny významnosti, ktoré sa definuje na začiatku štatistického skúmania.

V našom prípade využívame algoritmus viacnásobnej spätnej lineárnej regresie (Forward stepwise selection), ktorá počas analýzy postupne z regresného modelu

odstraňuje nezávisle premenné (vlastnosti odberových miest) s najnižším vplyvom. Vo výslednom regresnom modeli figurujú len tie nezávisle premenné, ktoré majú na závisle premennú skutočne signifikantný vplyv. Na zostavenie regresných modelov (párová lineárna regresia, viacnásobná lineárna regresia) sme využívali prostredie *Statgraphic Centurion 16*. Vstupnými parametrami (nezávislými premennými) boli *sklon georeliéfu* (v smere maximálnej zmeny gradientu poľa nadmorskej výšky), *príspevková plocha*, *WTI* (weatnes index), $(Kn)_n$ (normálová krivosť v smere dotyčnice k spádnici), $(Kn)_t$ (normálová krivosť v smere dotyčnice k vrstevnici). Vypočítané z produktu *ASTER GDEM* ako spoločný product *METI* a *NASA*.

Výsledky a diskusia

Výsledné polia morfometrických charakteristík uvádzaných vyššie nachádzame na obr. 1. V prípade zarovnanej časti skúmaného územia je evidentné, že všetky algoritmy na výpočet niektorých morfometrických charakteristík produkujú chybné hodnoty a teda spoľahlivosť výpočtu je obmedzená. V prípade jednotlivých párových regresíí sme sa dostali k veľmi nízkym hodnotám koeficientu determinácie (maximálne 10%). Taktiež hodnota koeficientu determinácie v prípade lineárnej multiregresie dosahuje hodnoty maximálne 38%, čo je taktiež nedostatočné. Predpokladáme, že tento fakt je spôsobený nižšie uvedenými faktormi, alebo ich kombináciou:

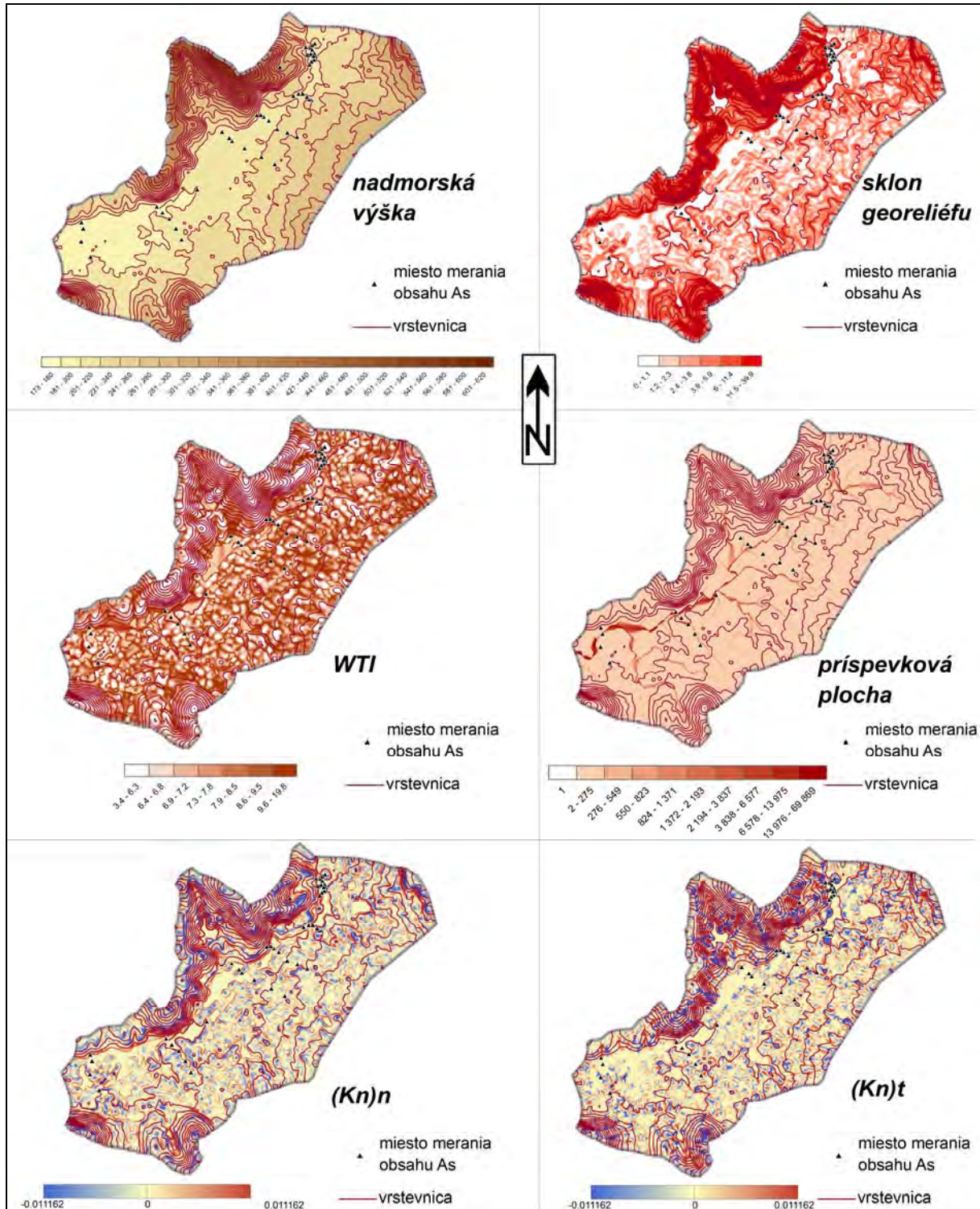
- nevhodnou distribúciou odberových miest vzhľadom na tok látky
- nerovnomernou hustotou odberových miest
- nevhodne zvolenými morfometrickými charakteristikami
- nedostatočnou kvalitou digitálneho výškového modelu

Záver

V predkladanej štúdií sa nám nepodarilo dokázať funkčnosť metódy regresného modelovania prostredníctvom morfometrických parametrov pre potreby modelovania distribúcie *As* v kontaminovanej pôde. Predpokladáme, že tento výsledok bol spôsobený kombináciou nevhodných vstupov do modelu (viď vyššie). Pre potreby budúceho výskumu doporučujeme:

- využívať korektný digitálny výškový model
- analyzovať hustotu zastúpenia odberových miest
- odberové miesta voliť v súlade s tokom látky

- analyzovať morfolometrické charakteristiky aj vyšších rádoov (platí len v prípade korektné vypočítaných priestorových derivácií)
 - využívať aj iné metódy multiregresie, ako napríklad Generalised additive modeling
- V nastolenej téme je nutný ďalší výskum.



Obr. 1 Ukážka polí využívaných ako vstupy do modelu

Zoznam použitej literatúry

- [1] Zákon Národnej rady SR č. 384/2009 Z. z. o vodách
- [2] Kashiwakura,S, et al (2001) Journal of hazardous materials. 181, p. 419
- [3] Chajdiak J., et al (1997) Štatistické metódy v praxi. Statis, Bratislava, Slovakia, p. 309
- [4] Stankovičová I., Vojtková, M. (2007) Viacrozmerné štatistické metódy s aplikáciami. IURA, Bratislava, Slovakia, p. 261

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA



ŠVK
PriF UK
2013

DIDAKTIKA

ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2013
ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV

Modifikácia syntéznych úloh na laboratórne cvičenia z anorganickej chémie

Jaroslav Baričák, Jana Chrappová

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra anorganickej chémie,
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; svetlonoz@szm.com*

Abstrakt

The aim of the work was to design some laboratory procedure texts that could be used for teaching laboratory exercises in inorganic chemistry at the Faculty of Natural Sciences of Comenius University in Bratislava. In selecting appropriate chemical syntheses we took into consideration safety work, feasibility of experiments and didactic aspects. From several experimentally tested chemical syntheses we had chosen four which were transformed into desired form.

Kľúčové slová: laboratórne cvičenie; syntézná úloha; syntéza anorganických látok

Úvod a formulácia cieľa

Laboratórne cvičenia tvoria integrálnu súčasť výučby prírodovedných a technických predmetov na vysokých školách. Laboratórne práce sa uskutočňujú v odborných učebniach, ktoré sú špeciálne vybavené v súlade s príslušnými predpismi. Cieľom laboratórných prác študentov je aplikácia poznatkov v modelových situáciách, získanie potrebných zručností a návykov, zoznámenie sa s elementárnymi vedeckými metódami, rozvíjanie samostatnosti a zodpovednosti [1]. Významné postavenie medzi laboratórnymi cvičeniami študijných odborov s chemickým zameraním majú syntézne úlohy. Pri realizácii syntéznych úloh si študenti majú možnosť prakticky odskúšať prípravu konkrétnych chemických látok prostredníctvom prevedenia niekoľkých chemických reakcií, čím prepájajú celý rad teoretických poznatkov s praktickou skúsenosťou. Taktiež si precvičujú zručnosti potrebné na vykonávanie jednotlivých laboratórných operácií, avšak nie samoučelne, ale so snahou získať požadovaný produkt.

V našej práci sa venujeme syntéznych úlohám, ktoré sú súčasťou výučby na laboratórných cvičeniach z anorganickej chémie pre študentov prvého ročníka odborov chémie, biochémie a učiteľských kombinácií s chémiou na PriF UK v Bratislave. Cieľom našej práce bolo zostaviť súbor úloh zameraných na syntézu anorganických látok, ktoré by mohli byť zaradené do výučby v rámci laboratórných cvičení. Pri výbere a posudzovaní vhodnosti úloh sme zohľadňovali viaceré kritériá, ktoré sú popísané nižšie.

Materiál a metódy

Preštudovali sme syntézne postupy nielen v učebniciach preparatívnej anorganickej chémie, ale i v starších a novších skriptách rôznych univerzít v Čechách a na Slovensku. Vymedzili sme si kritériá, ktoré nám pomohli pri výbere vhodných syntéz:

- *Charakter východiskových látok.* Vďaka súčasne platnej legislatíve zameranej na bezpečnosť práce v chemickom laboratóriu [2, 3, 4] je výber chemických látok, s ktorými môžu študenti počas laboratórnych cvičení prichádzať do kontaktu výrazne obmedzený. Snažili sme sa, aby náš výber v plnej miere rešpektoval vylúčenie práce s mutagénnymi, karcinogénnymi a toxickými látkami. Rovnako sme vylúčili syntézy s nedostupnými, resp. drahými chemikáliami.

- *Nároky na laboratórne pomôcky.* Množstvo syntéz uvedených v dostupnej literatúre nezodpovedá svojim prevedením vybaveniu laboratória určeného pre základné cvičenia.

Následne sme syntézy zhodnotili z ďalších hľadísk a zamysleli sme sa nad možnosťami ich modifikácie a optimalizácie:

- *Chemická podstata.* Zaujímavé pre nás boli syntézy s primeranými požiadavkami na východiskové vedomosti. Úlohy pre základné cvičenie by mali byť pochopiteľné, aby nešlo len o mechanické reprodukovanie postupu.

- *Rozmanitosť laboratórnych úkonov.* Vylúčili sme syntézy, ktorých postup spočíval iba v jednoduchom zmiešaní východiskových roztokov a následnej kryštalizácii alebo filtrácii produktu. Študenti častokrát nemali na stredných školách možnosť pracovať v chemickom laboratóriu a intenzívnejšiu skúsenosť s ním získavajú až v zimnom semestri prvého ročníka na laboratórnej technike. Na cvičeniach z anorganickej chémie, ktoré sú druhé v poradí, by mali mať možnosť ďalej si precvičovať rôzne zručnosti a získať potrebné návyky, ktoré využijú pri ďalšom štúdiu a v praxi.

- *Časová náročnosť.* Syntézy musia byť uskutočniteľné vo vyhradenom čase, ktorý predstavuje 5 vyučovacích hodín pre chémiu, resp. 4 vyučovacie hodiny pre učiteľské kombinácie.

- *Nadväznosť úloh.* Za motivačný prvok sme považovali, ak produkt jednej syntézy je východiskovou látkou ďalšej syntézy.

Vybrané syntézne postupy sme odskúšali v laboratóriu, v prípade potreby sme ich modifikovali a optimalizovali. Problémové syntézy sme vylúčili. Čistotu produktov sme potvrdili RTG práškovou difrakčnou analýzou, IČ spektroskopiou alebo odmernou analýzou.

Výsledky a diskusia

Navrhli sme súbor štyroch učebných textov zameraných na syntézu anorganických látok spĺňajúcich stanovené požiadavky.

1. **Príprava oxidu meďnatého CuO .** Syntéza je dvojstupňová. Produkt je získaný pri zvýšenej teplote z medziproduktu, ktorým je $\text{Cu}(\text{OH})_2$ [5]. Čistotu produktu sme potvrdili röntgenovou práškovou difrakčnou analýzou. Výhodou tejto syntézy je, že produkt je možné využiť ako východiskovú látku pre ďalšiu syntézu (č. 3). Študenti sa môžu oboznámiť s termickým rozkladom prebiehajúcim vo vodnom prostredí, ktorý je sprevádzaný farebnými zmenami.

2. **Príprava chloridu meďného CuCl .** Syntéza je viacstupňová. Prvým krokom je príprava Cu , druhým krokom je reakcia vodného roztoku $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ s Cu a NaCl pri zvýšenej teplote. Z reakčnej zmesi sa v nadbytku zriedenej H_2SO_4 vylučuje tuhý CuCl [6]. Čistotu produktu sme potvrdili chelatometrickým stanovením Cu^{2+} iónov vo vzorke pripravenej oxidáciou CuCl koncentrovanou HNO_3 . Výsledný produkt obsahuje meď v menej bežnom oxidačnom stave. Pracovný postup zahŕňa zahrievanie pod spätným chladičom, prácu s látkou citlivou na svetlo a vzdušnú vlhkosť, čo ho robí do istej miery netradičným. Keďže Cu je možné pripraviť aj na samostatnom laboratórnom cvičení, syntézu je vhodné tiež zaradiť v nadväznosti na túto úlohu.

3. **Príprava dihydrátu dioxalátomeďnatanu draselného $\text{K}_2[\text{Cu}(\text{C}_2\text{O}_4)_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a tetrahydrátu dioxalátomeďnatanu draselného $\text{K}_2[\text{Cu}(\text{C}_2\text{O}_4)_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.** Syntéza je viacstupňová. Najprv je pripravený roztok medziproduktu KHC_2O_4 , potom nasleduje reakcia tuhého CuO s týmto roztokom pri zvýšenej teplote. V závislosti od podmienok kryštalizácie je možné získať dva typy krystalohydrátov komplexu $\text{K}_2[\text{Cu}(\text{C}_2\text{O}_4)_2]$, dihydrát alebo tetrahydrát [7]. Čistotu produktov sme potvrdili chelatometrickým stanovením Cu^{2+} iónov, manganometrickým stanovením oxalátoligandov vo vzorkách a IČ spektroskopiou. V postupe sa študenti stretnú s potrebou pracovať s predhriatymi laboratórnymi pomôckami. Pripravené produkty je možné ľahko vizuálne odlíšiť na základe tvaru kryštálov.

4. **Príprava hydroxidu hlinitého $\text{Al}(\text{OH})_3$.** Táto úloha je modifikáciou syntézneho postupu, ktorý sa v súčasnosti realizuje na laboratórnych cvičeniach z anorganickej chémie. Princíp prípravy roztoku $\text{K}[\text{Al}(\text{OH})_4]$ ostal zachovaný, zmenili sme spôsob zrážania $\text{Al}(\text{OH})_3$. Namiesto roztokom $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ je produkt zrážaný plynným CO_2 [8]. Čistotu produktu sme potvrdili röntgenovou práškovou difrakčnou analýzou. Na rozdiel od súčasne používaného pracovného postupu, výhodou nami modifikovaného postupu je vznik dobre usádzajúcej sa

formy hydroxidu, čo umožňuje jeho lepšie čistenie. Postup je obohatený tiež o prácu s aparátúrou na vývoj plynu.

Produkty všetkých uvedených syntéz boli pripravené s pomerne dobrým praktickým výťažkom a dobrou čistotou.

Každý nami zostavený návrh učebného textu je členený na niekoľko častí. Úvodná časť zahŕňa tému cvičenia, názov preparatívnej úlohy a úlohy na domácu prípravu. Domáca príprava je zameraná na laboratórnu úlohu, jej cieľom je aktivizovať študentov k zamysleniu sa nad tým, čo bude náplňou cvičenia, čím sa snažíme predísť mechanickej realizácii postupu. Syntézná časť obsahuje princíp úlohy, chemické rovnice, potrebné pomôcky a chemikálie a pracovný postup. V záverečnej časti sú uvedené úlohy, ktoré je treba vyriešiť v protokole a didaktické poznámky. Didaktické poznámky, ktoré zahŕňajú tiež experimentálne zistenia, môžu byť nápomocné pri rozhodovaní o zaradení úloh do výučby.

Záver

V našej práci sme sa venovali prípravnej fáze vysokoškolského experimentu zameraného na syntézu anorganických látok. Na základe stanovených kritérií pre výber vhodných syntéznych úloh a experimentálneho odskúšania úloh sme vybrali štyri, ktoré sme spracovali do podoby učebných textov. Tieto texty môžu byť potenciálne použité vo výučbe laboratórnych cvičení z anorganickej chémie v prvom ročníku na PriF UK v Bratislave.

Pod'akovanie

Chceli by sme sa poďakovať za pomoc pri zisťovaní čistoty izolovaných produktov Mgr. Petrovi Billikovi, PhD. za zmeranie RTG práškových záznamov a Mgr. Petrovi Antalovi za zmeranie IČ spektier.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Průcha J., Walterová E., Mareš J. (1998) Pedagogický slovník. Portál, Praha, p. 120
- [2] Zákon Národnej rady SR č. 355/2007 Z. z. o ochrane, podpore a rozvoji verejného zdravia
- [3] Nariadenie vlády SR č. 45/2002 Z. z. o ochrane zdravia pri práci s chemickými faktormi
- [4] BOZP v praxi [Citované: 7. marec 2013]
<<http://bozp.anh.sk/index.php?what=2&root=73>>
- [5] Ondrejkočiová I., Izakovič M., Mašlejová A., Papánková B., Tatarko M. (2010)

- Anorganická chémia: Praktikum. Slovenská technická univerzita v Bratislave, Bratislava, p. 117
- [6] Gažo J., Horváth E., Kohout J., Serátor M., Šramko T., Toušková A., Valtr Z. (1977) Anorganická chémia: Laboratórne cvičenia a výpočty. ALFA, Bratislava, p. 226
- [7] Experiment procedure [Citované: 7. marec 2013]
<<http://202.114.108.237/Download/eb15b239-6d25-49ac-a8f3-45b53a562bae.pdf>>
- [8] Brauer G. (1963) Handbook of preparative inorganic chemistry. Academic press, Inc., New York, New York, USA, p. 821

Využitie vybraných vojenských objektov Bratislavy v návrhoch exkurznej činnosti z predmetu geografia

Miriám Černá

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra didaktiky prírodných vied, psychológie a pedagogiky, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
cerna.miriam@gmail.com*

Abstrakt

The territory of Bratislava has passed through rich historical and geographical development. Bratislava has been scene of several military conflicts and also has been integrated into numerous states as a consequence of its important location. That reflected on cultural heritage and part of this heritage are also military objects. These historic objects, mainly in focus of tourists, can be the basis for excursions in school subject – geography, whether in primary or secondary schools. Excursions belongs to innovative organizational forms of teaching and in recent years they are much more popular then in past not only among teachers, but also among students.

Kľúčové slová: *geografia cestovného ruchu; exkurzie; Bratislava; vojenské objekty*

Úvod a formulácia cieľa

Vojenské objekty predstavujú pamiatky či pamätihodnosti vojnových udalostí na určitom území. Majú nielen historickú hodnotu, ale takisto dotvárajú určitú siluetu sídelnej jednotky, napríklad mesta. Za najcharakteristickejších predstaviteľov týchto objektov môžeme na území Slovenska označiť hrady, ktorých dominantný význam pretrvával hlavne v stredoveku. Okrem nich sem však môžeme zaradiť rôzne ďalšie vojenské objekty či už dávnejšej minulosti alebo novodobých dejín.

Je potrebné rozlišovať medzi pojmom pamiatka a pamätihodnosť, nakoľko tieto dva pojmy nie sú totožné. Podľa zákona O ochrane pamiatkového fondu je pamiatka hnutel'ná vec alebo nehnuteľná vec pamiatkovej hodnoty, ktorá je z dôvodu ochrany vyhlásená za kultúrnu pamiatku. Pamätihodnosť môžeme charakterizovať ako pamiatku nižšej úrovne, ktorá spadá pod správu danej obce, v ktorej sa nachádza [1]. V dostupných zdrojoch sa však neuvádza presný termín definujúci vojenské objekty a tak ich skôr môžeme zaradiť do kategórie historických objektov, pričom vojenské objekty majú všetky ich charakteristické prvky, ale zároveň v minulosti plnili vojenskú funkciu. K vojenským objektom možno zaradiť aj budovy a priestory určené vojenským (armádnym) účelom, najmä ak sú buď zachované v pôvodnom stave, alebo zrekonštruované tak, aby pripomínali svoju funkciu v minulosti. K takto charakterizovaným vojenským objektom by mohli patriť bojiská, kasárne, vojenské cintoríny a pod. Hlavným cieľom príspevku je predstavenie vybraných vojenských objektov Bratislavy

ako lokalít vhodných pre vyučovanie v podobe exkurzií. Vybrané objekty predstavujú prierez dejinami od staroveku (antická Gerulata, územie hradu Devín), stredoveku (hrad Devín, Bratislavský hrad) až po novodobé dejiny (Petržalské vojenské bunkre).

Samotné exkurzie predstavujú jednu z organizačných foriem vyučovania, pričom ich cieľom je prehĺbiť a doplniť učivo pozorovaním predmetov, procesov a javov v ich prirodzenom prostredí [2]. V niektorých odborných publikáciách môžeme vidieť aj diferenciáciu medzi termínmi exkurzia a vychádzka. Podľa Petláka vychádzka umožňuje žiakovi poznávať predmety a javy, ktoré sú v blízkosti školy [3].

Dôležitým prvkom návrhu exkurzie je jej vhodné začlenenie do obsahu vzdelávania, to znamená do konkrétnej vyučovacej témy. Vzhľadom na charakter vojenských objektov, faktu, že ide o objekty týkajúce sa človeka a jeho aktivít, ale aj o historické objekty, je možné tieto exkurzie realizovať ako medzipredmetové (exkurzia z geografie a dejepisu). Z hľadiska obsahu geografického vzdelávania môžeme exkurzie navrhnuté v práci začleniť do celkov Slovensko - cestovný ruch, prípadne Miestny región [4]. Keďže exkurzie sú navrhnuté pre vyšší stupeň osemročných gymnázií a štvorročné gymnáziá, predpokladá sa, že žiaci by mali mať dostatočné komplexné vedomosti z geografie a takisto aj histórie.

Materiál a metódy

Vypracovanie návrhov exkurzií si vyžiadalo použitie viacerých metód. Z hľadiska obsahu boli výrazne nápomocné informačné zdroje týkajúce sa jednotlivých objektov a metodiky tvorby exkurzií. Okrem toho nemohol chýbať ani terénny výskum, pri ktorom išlo hlavne o analýzu dostupnosti miesta, aktuálny stav objektu či o exponáty a možnosti, ktoré objekt zahŕňa. Pri samotnom vypracovaní návrhov exkurzie bolo nutné vytvoriť syntézu z predchádzajúcich kapitol a analyzovať ďalšie dokumenty týkajúce sa cieľa, obsahu a štandardov geografického vzdelávania. Tie poskytol Štátny vzdelávací program.

Výsledky a diskusia

Pre účely tejto práce sme vypracovali dva návrhy exkurzií, určené učiteľom a žiakom na úrovni ISCED 3, prioritne žiakom gymnázií. Tematikou prvej exkurzie sú vybrané vojenské objekty vo vzťahu k cestovnému ruchu a ich vplyvu na miestnu krajinu. Druhá exkurzia pojednáva o vybraných vojenských pamiatkach rímskeho osídlenia a ich významu z hľadiska cestovného ruchu. Po formálnej stránke sú exkurzie navrhnuté podľa šablóny, ktorá zahŕňa všetky potrebné informácie o obsahovej i organizačnej časti exkurzií.

Návrh exkurzie č. 1**Cieľová skupina:** osemročné a štvorročné gymnázium**Ročník:** 3. ročník štvorročného resp. 7. ročník osemročného gymnázia**Predmet:** geografia**Téma exkurzie:** Vojenské bunkre a Bratislavský hrad ako objekty cestovného ruchu a ich vplyv na miestnu krajinu**Druh exkurzie:** záverečná, komplexná**Cieľ exkurzie:** Bližšie priblížiť tieto vojenské objekty žiakovi vo svetle historických udalostí formujúcich dejiny Slovenska, ich vplyv na súčasnú miestnu krajinu a cestovný ruch v regióne, zhodnotiť predpoklady, prognózy, súčasný stav a propagáciu týchto pamiatok, ozrejmiť lokalizáciu ako významný faktor pri ich budovaní**Objekt exkurzie:** vojenský bunker B-S-8, sprievodné objekty vojenský bunker B-S-9, vojenský bunker B-S-7, Bratislavský hrad**Príprava exkurzie:** Žiaci sú oboznámení s potrebnými vecami, ktoré si majú vziať so sebou. Na vyučovacej hodine pred exkurziou môže byť tematika vojenských bunkrov načrtnutá v krátkej diskusii prípadne rozprávaním učiteľa.**Vyučovacie metódy:** rozprávanie, vysvetľovanie, diskusia, pozorovanie, aktivizačný rozhovor**Materiálne vyučovacie prostriedky:** fotoaparát, písacie potreby**Začlenenie do tematického celku:** Cestovný ruch Slovenska**Program a časový plán exkurzie****Trasa exkurzie:** vojenský bunker B-S-8, sprievodné objekty vojenský bunker B-S-9, vojenský bunker B-S-7, Bratislavský hrad**Miesto stretnutia:** pred školou**Doprava:** prostredníctvom MHD a čiastočne pešo

Tab. 1 Časový plán exkurzie č. 1

Časový plán	
Čas stretnutia	8:30
Exkurzia vo vojenskom bunkri B-S 8 a okolí	9:30 - 11:15
Presun na Bratislavský hrad	11:15 – 12:00
Exkurzia na Bratislavskom hrade, expozície, okolie hradu	12:00 – 14:00
Návrat	po 14:00

Priebeh exkurzie

Pri oboch objektoch učiteľ môže využiť komplexné poznatky, ktoré žiaci majú nielen z geografie, ale aj z dejepisu. Práve na tom môže hlbšie analyzovať objekty z historického a geografického hľadiska, poukazovať na ostatné (okolité) prvky krajiny sféry. Pri exkurzii vojenských bunkrov sa žiaci rozdelia na skupinky po 10, vystriedajú sa v objekte a preskúmajú aj okolie bunkru, kde sa nachádzajú ďalšie artefakty. Exkurzia Bratislavský hrad sa uskutoční najprv v okolí hradu a následne v jednotlivých expozíciách.

Zhodnotenie exkurzie

Učiteľ sa k exkurzii vráti na najbližšej hodine. Zhodnotí celú exkurziu, so žiakmi prediskutuje ich dojmy a úlohou žiakov bude navrhnúť spôsoby lepšej propagácie objektov v spoločnosti, prípadne i za hranicami Slovenska. Navrhnú niekoľko spôsobov zlepšenia objektov vo vzťahu k návštevníkom, taktiež môžu porozmýšľať nad tým, ako by obsahovú stránku upravili, zmenili (obmenenie expozícií na hrade, otvorenie ďalších bunkrov pre verejnosť).

Návrh exkurzie č. 2

Cieľová skupina: osemročné a štvorročné gymnázium

Ročník: 3. ročník štvorročného resp. 7. ročník osemročného gymnázia

Predmet: geografia

Téma exkurzie: Rímske pamiatky na našom území ako dôležitá časť kultúrneho dedičstva

Cieľ exkurzie: Predstaviť žiakom materiálne pozostatky po rímskom osídlení na našom území, zhodnotiť význam rímskeho osídlenia pre budúci vývoj v regióne, navrhnúť spôsoby propagácie týchto pamiatok a zhodnotiť ich prínos pre cestovný ruch.

Objekt exkurzie: Devín, antická Gerulata

Príprava exkurzie: Žiaci sú oboznámení s potrebnými vecami, ktoré si majú vziať so sebou. Stručné predstavenie Rímskeho osídlenia na našom území.

Vyučovacie metódy: rozprávanie, vysvetľovanie, diskusia, pozorovanie, aktivizačný rozhovor

Materiálno-vyučovacie prostriedky: fotoaparát, písacie potreby

Začlenenie do tematického celku: Cestovný ruch Slovenska

Program a časový plán exkurzie

Trasa exkurzie: Devín - antická Gerulata

Miesto stretnutia: pred školou

Doprava: prostredníctvom MHD

Tab. 2 Časový plán exkurzie č. 2

Časový plán	
Čas stretnutia	9:30
Exkurzia na Devíne, okolie	10.15 - 11:45
Presun do Rusoviec	11:45 – 12:45
Exkurzia antická Gerulata	12:45 – 14:15
Návrat	po 14:15

Priebeh exkurzie

Vzhľadom na ročník, pre ktorý je táto exkurzia vhodná, by žiaci mali mať dostatočné poznatky o období z predmetu dejepis. Takisto by mali byť oboznámení s miestnou krajinou, polohou mesta. Tieto poznatky by sa mali vzájomne prepojiť. Pri exkurzii Devínu učiteľ uvedie základné informácie o tomto objekte, stručnú históriu a takisto sa môže sústrediť na komplexnú geografiu daného miesta, kde sa nachádza viacero pozoruhodných prvkov krajinskej sféry. Z historického hľadiska zdôrazní obdobie Rímskej ríše. Bližšie toto obdobie charakterizuje v Rusovciach, kde antická Gerulata poskytuje viacero konkrétnych artefaktov.

Zhodnotenie exkurzie

Exkurzia bude zhodnotená na nasledujúcej hodine, kde sa okrem toho žiaci rozdelia na skupiny. Podporená bude vzájomná kooperácia medzi členmi skupín, pričom každá skupina vypracuje krátky referát obsahujúci niektorú z iných pamiatok rímskej kultúry na našom území a k tomuto referátu si pripraví stručnú a výstižnú prezentáciu. Táto aktivita bude zohľadnená v hodnotení.

Záver

Obdobne by mohli byť realizované aj ďalšie exkurzie spadajúce pod iné témy geografie, či už pre základné alebo stredné školy. Vychádzky do okolia školy sú veľmi vhodné aj pre žiakov prvého stupňa základných škôl. Aj vzhľadom na analýzu Štátneho vzdelávacieho programu môžeme tvrdiť, že exkurzie po vojenských objektoch nachádzajú v predmete geografia svoje miesto, nielen v spomenutej téme (Slovensko – Cestovný ruch), ale takisto v ďalších témach (napríklad Objavovanie prírodných a človekom vytvorených osobitostí regiónu). Okrem samotného obsahu exkurzie je táto organizačná forma veľmi vhodná aj pre socializáciu žiakov, poskytuje interaktívnosť a názornosť skúmaných objektov či javov.

PodĎakovanie

Chcela by som poďakovať Mgr. Eve Džupinovej, PhD. a RNDr. Petrovi Likavskému, CSc. za cenné rady a pripomienky.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Zákon č. 49/2002 o ochrane pamiatkového fondu. [Citované: 25. február 2013]
<<http://www.zbierka.sk/zz/predpisy/default.aspx?PredpisID=16237&FileName=02-z049&Rocnik=2002>>
- [2] Otčenášová R. (1998) Exkurzie v dejepisnom vyučovaní na základnej škole. Metod. Centrum, Prešov, p. 7
- [3] Petlák E. (2004) Všeobecná didaktika. Iris, Praha, p. 179
- [4] Štátny vzdelávací program pre 2. stupeň ZŠ (ISCED 2) a osemročné gymnáziá, Človek a spoločnosť [Citované: 25. február 2013]
<http://www.statpedu.sk/files/documents/svp/gymnazia/vzdelavacie_oblasti/geografia_i_sced3a.pdf>

Aplikácia školských počítačových meracích systémov vo vyučovaní chémie na ZŠ

Vladimír Gašparík, Katarína Javorová

*Katedra didaktiky prírodných vied, psychológie a pedagogiky, Prírodovedecká fakulta,
Univerzita Komenského, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava;
gasparik@fns.uniba.sk*

Abstract:

In this article experiences with probeware and handhelds are discussed in chemistry education. Selected experiments were realized focusing on acids and bases and also basic and acidic oxides with eighth grade students from two classes of elementary school. Children learned the way to use probeware and handhelds; they realized the experiments fluently and without serious problems. The best accepted activities were those, which children could do by hand.

Kľúčové slová: počítačové meracie systémy, kyseliny a zásady, kyselino- a zásadotvorné oxidy

Úvod a formulácia cieľa

Školské počítačové meracie systémy umožňujú merať a vyhodnocovať rôzne chemické a fyzikálne veličiny (teplota, tlak, vodivosť, pH a i.) meniace sa v priebehu chemickej reakcie a skúmať tak chemický pokus nielen kvalitatívne, ale i kvantitatívne. Chemické pokusy na školách sa takto môžu viac priblížiť k súčasnej modernej chémii, ktorá je postavená na meracích prístrojoch. Dnes sú prístupné viaceré meracie systémy (napr. CoachLab, eLab Interfejs, LabQuest, LabQuest Mini, CBL 2, NOVA 5000, LogIT, Xplorer GLX, Spark) [1, 2, 3], ktoré umožňujú realizáciu školských chemických pokusov s kvantitatívnym charakterom. Významom a efektivitou využitia meracích systémov v školskom pokusníctve [4, 5, 6, 7], ako i návrhmi konkrétnych pokusov sa zaoberá viacero autorov doma i v zahraničí.

Cieľom nášho výskumu bolo pilotné otestovanie školských chemických experimentov s využitím školských počítačových meracích systémov navrhnuté pre témy „Kyseliny a zásady“ a „Kyselinotvorné a zásadotvorné oxidy“ pre základnú školu. Vo výskume sme sledovali stupeň prejavovaného záujmu žiakov o navrhnuté experimenty, ich motivačný a afektívny účinok, efektivitu žiakov v osvojovaní si nových manuálnych zručností a efektivitu žiakov v osvojovaní si schopnosti ovládať použité meracie systémy.

Experimentovanie malo prvky výskumne ladenej koncepcie vyučovania, nebolo preto vhodné, aby sa žiaci na pokusy vopred pripravovali alebo dostali konkrétny pracovný postup.

Materiál a metódy

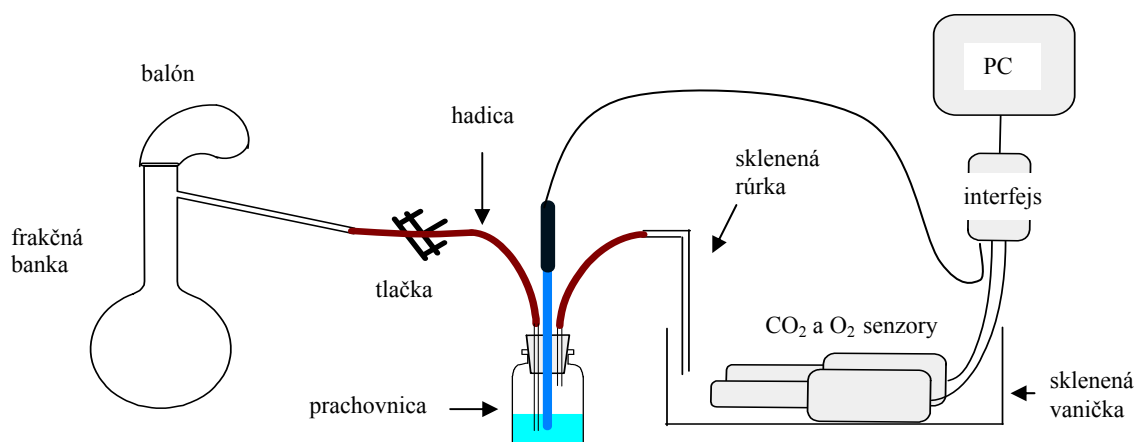
Výskum bol uskutočnený v dvoch triedach tercie (v prvej bolo 16 žiakov a v druhej 12 žiakov). Výskum prebehol počas dvoch dní (každý deň jedna trieda) vo 4-hodinovom bloku pre každú triedu. Žiaci pracovali v dvoj- až štvorčlenných skupinách. Z priebehu výskumu bol vyhotovený video záznam, fotodokumentácia a poznámky z účastníckeho pozorovania. Získané dáta boli vyhodnotené kvalitatívnou analýzou.

Popis experimentu:

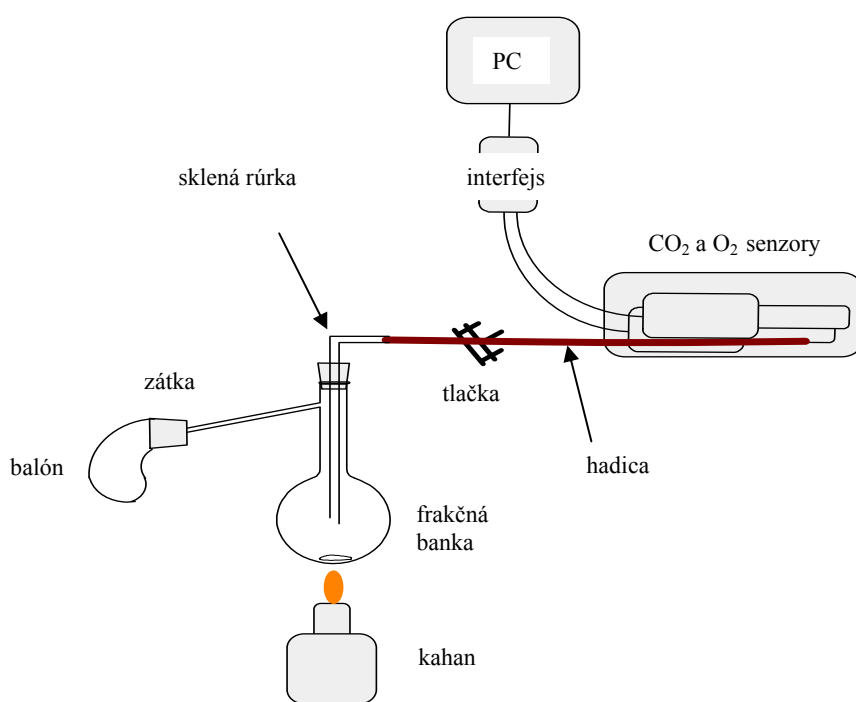
Po stručnom výklade, kde bolo žiakom vysvetlené, čo sú kyseliny, zásady a pH stupnica, nasledovalo experimentovanie najprv k téme „Kyseliny a zásady“ a potom k téme „Kyselinotvorné a zásadotvorné oxidy“.

K téme „Kyseliny a zásady“ žiaci pripravili pH škálu desatinným riedením roztokov kyseliny chlorovodíkovej a hydroxidu sodného. Žiaci odmerali pH týchto roztokov pH senzorom pomocou zariadenia LabQuest, meranie overovali univerzálnymi pH papierikmi a následne vytvorili farebnú pH stupnicu pridaním výluhu červenej kapusty. Žiaci tiež pripravovali roztoky z bežne dostupných látok a potravín v domácnosti a pH senzorom zisťovali ich pH hodnotu.

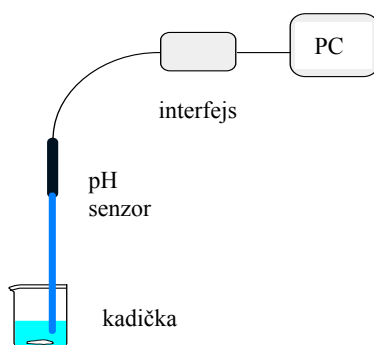
K téme „Kyselinotvorné a zásadotvorné oxidy“ boli realizované dva experimenty. Pri experimente „Príprava a vlastnosti oxidu uhličitého“ bola najprv žiakom položená otázka, či môžu oxidy meniť pH roztoku, keďže neobsahujú ani vodík, ani OH skupinu. Následne bol pripravený oxid uhličitý reakciou kyseliny octovej a hydrogénuhličitanu sodného. Senzorom na meranie pH bolo zisťované pH vodného roztoku oxidu uhličitého. Prítomnosť oxidu uhličitého bola dokazovaná senzormi zastúpenia oxidu uhličitého a kyslíka (obr. 1). V experimente „Príprava páleného a haseného vápna“ bola žiakom predložená úloha zistiť, aký plyn vzniká pri tepelnom rozklade uhličitanu vápenatého a na základe toho vyvodiť vzorec páleného vápna. Vznikajúci plyn bol identifikovaný senzormi na zastúpenie oxidu uhličitého a kyslíka (obr. 2). Vlastnosti oxidu vápenatého boli po jeho rozpustení vo vode zisťované pH senzorom (obr. 3).



Obr. 1 Aparatúra „Príprava a vlastnosti oxidu uhličitého“



Obr. 2 Aparatúra „Príprava páleného vápna“



Obr. 3 Aparatúra „Vlastnosti oxidu vápenatého“

Výsledky a diskusia

Žiaci prejavovali záujem a iniciatívu hlavne v činnostiach, ktoré si mohli vlastnoručne vyskúšať. Úloha pripraviť pH škálu desatinným riedením bola u niektorých žiakov z počiatku pri vysvetľovaní prijímaná slabšie, ale počas samotnej práce ju žiaci dokončili ochotne. Najlepšie prijatými úlohami boli: Vytvorenie farebnej škály výluhom červenej kapusty a Meranie pH v domácnosti bežne dostupných látok a potravín. Žiaci obdivovali farebnú škálu vytvorenú výluhom červenej kapusty a fotili si ju. Záujem a sústredenosť žiakov klesali pri činnostiach, ktoré boli uskutočnené a vysvetľované demonštračne.

Pri osvojovaní si nových manuálnych zručností (napr. pipetovanie) mali žiaci medzery a mali tendenciu uskutočňovať ich svojím spôsobom aj napriek opakovaným zlyháním a pokusom učiteľa o dodatočnú inštrukciú. Napriek tomu zvládli všetky skupiny desatinné riedenie uspokojivo. Pre takéto činnosti je možné využiť aj metódu vrstovnickeho učenia (skúsenejší žiak učí a dozerá na neskúseneho). Osvedčilo sa, keď sa jedna žiačka s predchádzajúceho dňa zúčastnila laboratórneho cvičenia aj na druhý deň a zaúčala svojich spolužiakov hlavne pri osvojovaní si pipetovania.

Žiaci pracovali v dvoj- až štvorčlenných skupinách. Aj v štvorčlenných skupinách si všetci stihli odskúšať rôzne zručnosti, avšak väčšinou pracovali v skupine súčasne iba dvaja, nanajvýš traja žiaci. Preto stačí organizovať žiakov do dvojíc, najviac trojíc. K tomu, aby si žiaci v skupine rozdelili úlohy a pracovali tak súčasne viacerí, ich bolo treba vyzývať.

Žiaci si intuitívne a rýchlo osvojili meranie počítačovými meracími systémami. Nastavenie parametrov merania (časovú dĺžku merania, nastavenie grafu) uskutočňoval učiteľ.

Keďže použitá metóda experimentovania žiakov obsahovala prvky výskumne ladenej koncepcie vyučovania, nebolo vhodné, aby sa žiaci na pokusy vopred pripravovali alebo dostali konkretizovaný pracovný postup. Zistili sme však, že pre učiteľa je za takýchto podmienok ťažké až nemožné organizovať súčasne viacero pracovných skupín, ktoré robia rôzne pokusy. Ak sa jednej zo skupín učiteľ prestane na chvíľu venovať, žiaci ihneď presúvajú pozornosť mimo danej problematiky. Organizovať viacero skupín súčasne sa za takýchto podmienok dá, ak tieto skupiny robia súčasne ten istý pokus. To však nie vždy je možné a preto bude v budúcnosti potrebné vytvoriť pracovný list, ktorý bude určitým spôsobom zastupovať učiteľa, bude obsahovať otázky, ktoré by inak žiakom kládol učiteľ a jednoduché inštrukcie vedúce k vykonaniu experimentu.

Záver

Kvantitatívne pokusy majú vysokú didaktickú hodnotu [5] a použitie počítačových meracích systémov ich robí pre žiakov viac atraktívnymi [4].

Podľa našich zistení, celkovo prijímajú žiaci experimentovanie so školskými počítačovými meracími systémami pozitívne. Je potrebné navrhnuté úlohy ďalej upravovať podľa zistených výsledkov a následne v školskej praxi opäť otestovať. Potrebné je zamerať sa čo najviac na vlastnú žiacku aktivitu a iniciatívu, vrátane zostavovania experimentálnych aparátúr.

Pod'akovanie

Príspevok vznikol s finančnou podporou grantu MŠVVaŠ SR, VEGA 1/0417/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Školní chemické experimentování s pomocí měřících přístrojů a počítače [Citované: 6. marec 2013]
<http://everest.natur.cuni.cz/konference/2009/prispevek/stratilova_smejkal.pdf>
- [2] Staněk M. (2009) Výzkum, teorie a praxe v didaktice chemie XIX - 2. Část. Univerzita Hradec Králové, Hradec Králové, p. 390
- [3] Prokša M., Silný P., Tóthová A. (2005) Technika a didaktika školských pokusov z chémie. Univerzita Komenského, Bratislava, p. 69
- [4] Stratilová Urváľková E. (2009) Výzkum, teorie a praxe v didaktice chemie XIX - 2. Část. Univerzita Hradec Králové, Hradec Králové, p. 395
- [5] Tóthová A., Prokša M. (2003) Možnosti využitia meracieho zariadenia CBL 2 pri realizácii laboratórnych cvičení na základných a stredných školách. Biológia, ekológia, chémia, 8(1), p. 6
- [6] Metcalf S. J., Tinker R. F. (2004) J. Sci. Educ. Technol., 13(1), p. 43
- [7] Zucker A. A. a kol. (2008) J. Sci. Educ. Technol., 17, p. 42

Motivačné prepojenie minulosti a súčasnosti – didaktický príklad Bergakadémie a rastrujúcej sondovacej mikroskopie v nanotechnológii

Ján Goruška

*Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra didaktiky prírodných vied,
psychológie a pedagogiky, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika;
jangoruska@gmail.com*

Abstract

The history of technical university education in Slovakia starts with a foundation of Bergakademie in Banská Štiavnica. The school was founded by Maria Theresa in 1762 for still growing needs of higher education for the mining engineers. The first department became Department of Chemistry, Mineralogy and Metallurgy. The first chemistry professor was M. J. Jacquin who had the first chemistry lecture in September 1764. Nowadays the nanotechnology is scientific direction of chemistry, which studies and manipulates materials on nanometer size level. Main techniques used in nanotechnology are Scanning Tunneling Microscopy (STM), measuring conductive surfaces, and Atomic Force Microscopy (AFM), measuring nonconductive surfaces. Discovery of STM was awarded by the Nobel price. In experimental part I measured thickness of layer on mineral muscovite. These examples I used as a motivation for students at high school and evaluated in a questionnaire. The result shows that most of the students consider the subject as non-attractive and useless which is alarming and it is necessary to improve it.

KLúčové slová: *Chémia; Bergakadémia; Banská Štiavnica; Nanotechnológia; Nobelová cena; Muskovit*

Úvod a formulácia cieľa

Územie Slovenska bolo už v stredoveku známe svojím nerastným bohatstvom, hlavne zlatom, striebrom, meďou a železom. Nebola to preto náhoda, že prvá vysoká banská škola vznikla práve na území Slovenska. Pred ňou pôsobila v Banskej Štiavnici Banská škola, založená už v roku 1735, ktorej poprednou osobnosťou sa stal vynikajúci banský odborník a kartograf Samuel Mikovíni. Jej úroveň však ešte nebola univerzitná. Zvyšovaním nárokov na ťažbu aj horšie dostupných nerastných surovín, bolo nevyhnutné vzdelanie banských majstrov na vysokoškolskej úrovni. Dňa 13. 12. 1762 na pokyn Uhorskej panovníčky Márie Terézie bola založená Banícka akadémia. Názov Bergakadémia [1] sa v tej dobe používal najmä kvôli nemeckému vplyvu, keďže toto obyvateľstvo tu malo vysoké zastúpenie. Za najvhodnejšie mesto bola určená Banská Štiavnica. Banícka akadémia bola prvou akadémiou, v ktorej sa začali prednášať i technické disciplíny univerzitným spôsobom. Jej založenie sa stalo významným medzníkom vo vývoji vysokého technického školstva na celom svete. Dňa 13. júna 1763 bola ako prvá založená Katedra chémie a mineralógie, jej prvým profesorom sa stal Mikuláš Jozef Jacquin (1727-1817) z holandského Leydenu. Prednášať začal v roku 1764 po zriadení nového moderného laboratória a mineralogickej zbierky. Po Jacquinovom odchode v

roku 1769 prednášal chémiu Anton Scopoli z Cavalese. V rokoch 1779-1792 nastal najväčší rozmach univerzity. V tejto dobe na katedre chémie, mineralógie a metalurgie pôsobil Scopoliho nástupca, chemik Anton Ruprecht, rodák zo Smolníka. Hneď po nástupe vybavil rozsiahle opravy školskej budovy a dokonalejšie vybavenie laboratória. Jeho dobrá povest' pritiahla do Banskej Štiavnice na štúdiá aj takých známych európskych vedcov ako boli taliansky fyzik Volta a chemici Tondi, Savaresi a ďalší. Taktiež zadovážil množstvo chemických látok a minerálov z celej Európy. Ruprecht vo svojej výskumnej práci dospel k objavom bária, vápnika, horčíka, hliníka, mangánu a volfrámu. V prvej polovici 19. storočia, kedy v Európe prepukla revolučná vlna, začína pre Bergakadémiu obdobie stagnácie. Dôvodom boli národnostné rozpory, ktoré sa začali prejavovať už v 30. rokoch s narastaním maďarského vplyvu, ktoré vyvrcholili v revolučnom roku 1848 odchodom 133 českých a nemeckých poslucháčov akadémie. K vynikajúcim odborníkom pôsobiacim v tomto čase na akadémii patrili profesori chémie Michal Patzier a Alojz Wehrle, fyzik a matematik Kristián Doppler. V roku 1904 sa zmenil názov akadémie na Vysokú školu banskú a lesnícku. V roku 1918 spolu so zánikom Rakúsko-Uhorskej monarchie skončila aj jej činnosť. [2 - 4]

Na počiatku vývoja nanotechnológie bolo vynájdenie skenovacieho tunelového mikroskopu - STM. Vynašiel ho Gerd Binnig s kolegom Heinrichom Röhrerom v roku 1981 vo výskumných laboratóriách IBM v Zürichu. Keďže toto zariadenie bolo schopné merať len povrchy látok a materiálov s určitým stupňom vodivosti, tak v roku 1985 zhotovili atómový silový mikroskop – AFM. Ten už bol schopný merať aj nevodivé povrchy látok. O tom, že tieto objavy boli veľmi významné, svedčí aj fakt, že im v roku 1986 bola za tieto objavy udelená Nobelova cena. AFM môže pracovať v statickom i dynamickom móde. V statickom (kontaktnom) móde sa ostrý hrot konzoly dostáva do kontaktu s povrchom meranej vzorky. Počas iniciačného kontaktu sú atómy na konci hrotu vystavené veľmi slabým odpudivým silám, ktoré sú spôsobené elektrónovým orbitálnym prekryvom s atómami povrchu vzorky. Sily pôsobiace na povrchu hrotu zapríčiňujú vychýlenie konzoly, ktoré je merateľné optickým detektorom. Výchylka môže byť meraná v rozsahu 0,02 nm, typická konštanta tuhosti konzoly je 10 N/m a sila, pôsobiaca medzi povrchom hrotu a povrchom vzorky, menšia ako 0,2 nN. V dynamickom (nekontaktnom) zobrazovacom móde sa hrot dostáva veľmi blízko k povrchu vzorky na niekoľko nm, ale nie do kontaktu s ňou. [5, 6]

Meraná vzorka muskovit, vzorec $KAl_2(AlSi_3O_{10})(OH)_2$, je horninotvorný minerál kryštalizujúci v monoklinickej sústave. Zaradujeme ho do skupiny fylosilikátov, konkrétne

do skupiny sl'úd. Má šupinkovitú, hrubo až jemne lupenitú štruktúru a výbornú štiepateľnosť. Dá sa štiepať na veľmi tenké lístky, ktoré sú ohybné a elastické. Jeho ďalšie fyzikálne vlastnosti sú: tvrdosť: 2 - 2,5; hustota: 2,76 - 2,88 g/cm³; sklený lesk, tenké lupene prepúšťajú svetlo, sfarbené môžu byť do žltá, hnedá, zelena a červená. Stabilný je približne do teploty 950 K

v závislosti od tlaku, kedy sa mení na K-živec, korund a vodu. [7]

Predmetu chémia v poslednom čase „prischla“ nálepka – neobl'úbený. Aj počas mojej učiteľskej praxe som sa u žiakov stretol s odporom a nezaujmom voči chémii, a to dokonca aj u žiakov, ktorí plánujú v štúdiu pokračovať na vysokej škole v odboroch súvisiacich s chémiou (medicína, biológia, farmácia, atď.). Cieľom výskumu bolo zistiť záujem žiakov o chémiu a následne navrhnuť experiment, ktorý by predpokladáme mohol zvýšiť záujem žiakov o tento prírodovedný predmet. V našom prieskume bola použitá dotazníková metóda. Pre zvýšenie motivácie žiakov ponúkam dva konkrétne príklady. Prvý sa týka minulosti – Baníckej akadémie v Banskej Štiavnici. Na tomto príklade prezentujem začiatky technického vysokého školstva, ktoré sa realizovali práve na Slovensku. Analyzujem podnety ku vzniku tejto nielen pre Slovensko dôležitej inštitúcie, popisujem jej úspešnú históriu, významných profesorov, ktorí na nej pôsobili, významných absolventov, ktorí ju navštevovali a nakoniec hodnotím jej prínos. Druhý príklad je zameraný na súčasnosť a to na vedecký smer nanotechnológia. Pre prírodu nie sú nanoefekty žiadnou novinkou. Vo svete vedy však predstavuje veľký potenciál, a to nielen v odboroch chémie - pri príprave a skúmaní nových pokročilých materiálov, ale aj napríklad v biológii, elektrotechnike, zdravotníctve, energetike a iných vedných disciplínach. Odvážne tvrdenia hovoria v súvislosti s nanotechnológiou ako o možnej priemyselnej revolúcii. Toto vedné smerovanie overujem aj experimentálne na vzorke šupinatého minerálu muskovit, ktorý patrí do skupiny fylosilikátových sl'úd. Snahou je vytvoriť čo najtenšiu vrstvu odlúpením, ktorú meriam pomocou atómového silového mikroskopu. Oboznámenie žiakov o významných historických míľnikoch z oblasti chémie, ako aj najaktuálnejších technologických trendoch v chémii ako sú nanotechnológie, by mohlo vyučovanie spestriť, zatraktívniť a v konečnom dôsledku zvýšiť u žiakov záujem.

Materiál a metódy

Na zistenie atraktivity a obl'úbenosti predmetu chémia u žiakov stredných škôl som urobil prieskum formou dotazníka. Respondenti vyplňali dotazník na prelome mesiacov február a marec 2013. Celkovú vzorku tvorilo 76 žiakov v zastúpení všetkých ročníkov.

V úvode dotazníka som najskôr zisťoval o respondentoch základné údaje – pohlavie, navštevovaný ročník a priemer známok z posledného koncoročného vysvedčenia. Dotazník bol vytvorený vo formáte A4 na dvoch stranách. Obsahoval 13 položiek, z toho 6 položiek s možnosťou výberu, kde mohli respondenti zvoliť aj viac odpovedí. Ďalších 6 položiek bolo s otvorenou odpoveďou a jedna položka bola škálovaná.

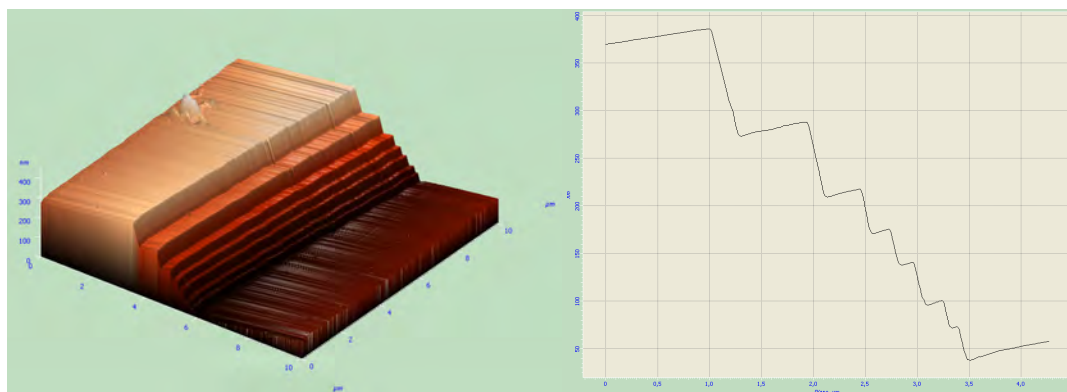
Cieľom výskumu bolo okrem zistenia vzťahu žiakov ku chémii aj navrhnúť vhodné motivačné prostriedky na zatraktívnenie predmetu. Na predstavenie nanotechnológie sa ako atraktívna metóda ponúka motivačný experiment. Atómová silová mikroskopia je jedna z techník nanotechnológie, vhodná na meranie nevodivých povrchov. Vhodnou demonštračnou vzorkou je slúda muskovit. Je to dostupný nerast, bežne sa vyskytujúci aj na Slovensku. Jeho makroskopická štruktúra nabáda k podrobnejšej analýze. Na prevedenie, čas aj technické zaobstaranie prístrojov je pokus síce náročný, ale jeho vhodnou interpretáciou by mohla byť názorná demonštračná ukážka výsledkov spracovaných do digitálnej podoby (napr. video, prezentácia). Meranie prebehlo v Medzinárodnom laserovom centre na AFM mikroskope. Vzorku minerálu muskovit som na meranie pripravil opakovaným odlupovaním šupiniek za pomoci špeciálnej gaffa pásky. Tým som zámerne vytvoril rozhranie dvoch polí s určitým prevýšením. Tento akýsi pomyselný „schod“ som následne zmeral.

Výsledky a diskusia

Analýza obľúbenosti predmetu chémia, ktorú sme uskutočnili pomocou dotazníka, skončila smutným konštatovaním nízkeho záujmu žiakov o chémiu. Škálová položka (škála 1-5, ako hodnotenie v škole) zameraná na zistenie obľúbenosti tohto prírodovedného predmetu skončila podpriemernou hodnotou 3,44. Mnohí si však aj napriek tomu uvedomujú, že bez chémie sa nezaobíde takmer žiadne priemyselné odvetvie. Preto je potrebné, aby každý z nás disponoval určitými vedomosťami z tejto oblasti. Poradie záujmu o jednotlivé odbory chémie bolo nasledovné: 1. biochémia, 2. organická chémia, najmenší záujem bol o anorganickú chémiu. Podľa prieskumu za najväčšie negatívum chémie žiaci považujú náročnosť učiva na pochopenie; rozsah učiva (kvantita), nezaujímavý obsah (nuda) a obtiažnosť učiva. Najmenšia kritika sa týkala vyučujúcich a učebníc chémie. Žiakom robí najväčšie problémy teória, potom reakcie a príklady (približne na rovnakej úrovni). Najmenej problémov majú žiaci s názvoslovím a praktickými cvičeniami. Zaujímavým zistením bolo, že takmer všetci žiaci, ktorí majú problémy s praktickými cvičeniami, by v prípade zvýšenia ich počtu hodín mali o chémiu väčší záujem. Okrem toho by sa žiakom viac páčila chémia, keby bolo učivo rozdelené do väčšieho počtu hodín a tiež by uvítali viac chémie na príkladoch z bežného

života. Za najmenej podstatné v tomto bode považovali zavádzanie digitálnych technológií do vyučovania a lepšiu učebnicu. V dotazníku som sa dostal aj k problematike motivácie. Iba 2,63 % žiakov má informácie o Bergakadémii ako o prvej vysokej škole technického smeru na svete. Ďalších 3,94 % určilo nesprávnu univerzitu (STU, UK). O nanotechnológii síce niečo počulo 28,94 % žiakov, nikto však nemal o nej bližšie informácie. Analýzou ďalšej položky som zistil, že 76,32 % žiakov by objav materiálov s progresívnymi vlastnosťami zaujímal. A práve nanotechnológia je prostriedok, ktorý stojí za objavmi týchto materiálov. Na moje nemilé prekvapenie prieskum ukázal, že len 33 % opýtaných počulo o Nobelovej cene, vysvetliť ju však nevedel takmer nikto. Z držiteľov Nobelovej ceny si spomenuli (alebo správne zatipovali) iba na M. C. Sklodowskú (3,94 % žiakov), 6,57 % žiakov nesprávne určilo za držiteľa D. I. Mendelejeva. Na základe týchto zistení navrhujem zaviesť do vyučovania chémie viac „ľahšie stráviteľných“ a zaujímavejších informácií súvisiacich s chémiou. Žiakov tiež zaujímajú rôzne extrémny, ktoré môžu upútať ich pozornosť na úkor stereotypu z niekedy nudných informácií. Môže ísť nielen o príklady, ktoré som ponúkol, ale aj napr. pohľad do histórie iných zaujímavých a dôležitých vecí. Tiež môže ísť o rôzne príbehy, napr. o tom ako bolo úplnou náhodou objavené RTG žiarenie, ďalej napríklad objavenie rádioaktivity a v tejto súvislosti im spomenúť, že za tieto objavy bola udelená Nobelova cena. Predpokladám, že vyučovanie by sa týmto spôsobom zatraktívnilo a aj záujem o chémiu by sa zvýšil.

V rámci experimentu na prezentovanie nanotechnológie som na vzorke muskovitu zámerne vytvoril prechod z jednej vrstvy (šupinky) na druhú, teda akýsi pomyselný schod. Snahou bolo dosiahnuť čo najnižšie prevýšenie. Pomocou špeciálnej lepiacej gaffa pásky som vrstvy minerálu odlupoval dovtedy, pokiaľ to bolo možné. Prevýšenie som potom zmeral pomocou AFM. Dosiahol som úroveň 26 nm (**Obr. 1**). Z röntgenovo-difrakčných meraní je známe, že 1 vrstva má 1,03 nm. To znamená, že daný schod mal približne 26 vrstiev.



Obr. 1 Muskovit meraný v kontaktnom móde konštantnej výšky, zobrazovacia plocha je 10x10 μm: vľavo: 3D pohľad, vpravo: grafické znázornenie prierezu zobrazenej plochy

Záver

V tejto práci som analyzoval obľúbenosť prírodovedného predmetu chémie u žiakov stredných škôl. Pomocou dotazníka som zisťoval príčiny neobľúbenosti tohto predmetu a hľadal možné riešenia, ako predmet viac zatriktívniť. Riešenie som ponúkol na dvoch príkladoch, pričom nanotechnológiu som prezentoval aj prakticky. Oba príklady odporúčam ako motiváciu zaviesť do vyučovania chémie. Pedagogickým prieskumom som dospel aj k možným návrhom na zlepšenie pedagogického procesu, ktoré by som nazval ako „zážitkové vyučovanie“. Ku kvalitnejšej a efektívnejšej výučbe by sa mohlo dopracovať tiež väčším počtom hodín a to najmä praktických cvičení, čo v konečnom dôsledku by viedlo k menšiemu rozsahu preberaného učiva na vyučovaciu jednotku, a tak by vznikol priestor na uvádzanie rôznych príkladov z chémie bežného života, reálnych príbehov a zaujímavostí.

PodĎakovanie

Chcel by som sa poďakovať všetkým, ktorí mi akýmkoľvek spôsobom pomohli, najmä doc. Ing. Dušanovi Veličovi, PhD; Mgr. Danielovi Repovskému, Katedre fyzikálnej a teoretickej chémie na Prírodovedeckej fakulte UK, Medzinárodnému laserovému centru za poskytnutie prístrojov na meranie a tiež všetkým, ktorí vyplnili dotazník. Moje poďakovanie tiež patrí mojím najbližším, rodine, priateľom, spolužiakom a v neposlednom rade tiež Bohu.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Bartl J., (2002) Slovak history Chronology & Lexicon. Slovenské pedagogické nakladateľstvo, Bratislava, p. 286
- [2] Tomeček O., Herčko I. (2001) Chémia a mineralógia na Baníckej a lesníckej akadémii v Banskej Štiavnici. Slovenská chemická spoločnosť, Banská Bystrica. p. 7
- [3] Konečný P., (2012) 250. Výročie Banskej a Lesníckej Akadémie v Banskej Štiavnici, Ing. Tibor Turčan – Banská agentúra, Košice. p. 6
- [4] Sikorová T. (1997) Študijná ročenka pri príležitosti 60. výročia STU. Slovenská technická univerzita, Bratislava. p. 5
- [5] Bhushan B., (2003) Springer Handbook of Nanotechnology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, p. 331
- [6] Binnig G., Quate C. F., Gerber Ch. (1986) Atomic force microscope, Phys. Rev. Lett. 56, San Jose, p. 930
- [7] Klein C., (2006) Mineralógia. Oikos-Lumon, Bratislava, p. 553

Návrh databázy filmových scén z prírodopisných filmov pre aplikáciu vo vyučovaní biológie na základnej a strednej škole

Henrieta Hambalková, Ján Štubňa

*Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Fakulta prírodných vied, Gemologický ústav,
Nábřežie mládeže 91, 94974 Nitra, Slovensko, h.hambalkova@gmail.com*

Abstrakt

The use of film or its parts could have a very important place among teaching tools, which can be used for achieving better understanding of learning material and help the teacher to motivate pupils of elementary and secondary schools. It creates new and interesting learning environment which can cause that pupils will have higher interest for natural sciences. Film as a genre offers plenty of possibilities of everyday usage in biology classroom. Our point is to introduce documentary film as a special tool, which is very useful and suitable for illustration and explanation of several biological topics. Our work lists five documentary films and possibilities of their usage in particular biological topics taught on elementary and secondary schools.

Kľúčové slová: prírodopisný film; biológia; vyučovanie; filmová scéna

Úvod a formulácia cieľa

Začiatok expanzie filmu do spoločnosti, ako ho poznáme dnes, začal na konci 19. storočia vo Francúzsku, keď bratia Lumierovci zorganizovali prvé verejné filmové predstavenie. Už na začiatku bol film nositeľom informácií o realite. Jeden z najväčších vedcov 20. storočia Albert Einstein, videl budúcnosť modernizácie vyučovania prírodných vied najmä v aplikácii vhodných školských filmov.

Neobyčajný rozvoj audiovizuálnej didaktickej techniky sa viaže hlavne ku koncu šesťdesiatych a začiatku sedemdesiatych rokov dvadsiateho storočia. Táto skutočnosť v značnej miere súvisí s prienikom masovokomunikačných prostriedkov ako sú rozhlas, televízia alebo film do každodenného života bežných ľudí [1].

Moderná doba ponúka široké spektrum audiovizuálnych prostriedkov určených pre vyučovací proces [2, 3, 4, 5]. K najstarším z nich zaradíme film, ktorý je výsledkom túžby človeka zaznamenať a reprodukovať realitu [6].

Film zobrazuje fyzickú realitu ale odlišným spôsobom ako ju vnímame v bežnom živote. Je neprekonateľný v tom ako dokáže neustále udržiavať pozornosť diváka. Rôzne techniky snímania objektívom, pohyby a uhly kamier či strihanie snímok dokážu zaujať diváka aj v situácii, ktorá pre neho nie je v bežnom živote ničím výnimočná. Detailný záber dovoľí divákovi nazrieť do reality neobvyklým spôsobom. Práve táto technika snímania dovoľí ukázať niečo, čo by si inak divák nevšimol [7].

Detailné zábery sú v biológii vďačnou pomôckou hlavne pri vysvetľovaní a opisovaní

telesnej stavby živočíchov, ich jednotlivých charakteristík alebo zvláštností. V súčasných učebniciach slúžia na tento opis hlavne kreslené obrázky, ktoré veľmi často nevystihujú podstatu a slúžia viac – menej na ilustráciu. V samotnom texte, ktorý slúži mnohým učiteľom ako predloha výkladu je naopak opis veľmi detailný. Žiaci si tak mnohokrát vedia ťažko predstaviť jednotlivé štruktúry alebo časti tela, ktoré nie sú na kreslených obrázkoch dobre vidieť. Týka sa to hlavne živočíchov, ktoré nie sú u nás bežné a žiaci ich nemali možnosť vidieť naživo.

Film ako taký má vo vzdelávacom procese za cieľ prostredníctvom dynamického obrazu preniesť ku žiakovi vizuálne informácie. V súčasnosti nie sú vytvorené filmy pre vyučovací proces. Možnosťou vyplnenia tohto prázdneho miesta sú tzv. fragmentárne filmy, ktoré sú vytvorené vystrihnutím určitých scén z komerčných alebo dokumentárnych filmov [8].

Cieľom príspevku je navrhnúť databázu filmových scén z rôznych prírodopisných filmov premietaných v slovenských kinách pre aplikáciu vo vyučovaní biológie na základných a stredných školách so zameraním na živočíšnu ríšu.

Materiál a metódy

Štúdium dostupnej domácej a zahraničnej literatúry týkajúcej sa danej problematiky. Vyhľadávanie a spracovávanie informácií o prírodopisných filmoch premietaných v kinách vhodných pre aplikáciu vo vyučovaní biológie. Na výber vhodných filmov pre vyučovanie Biológie sme použili metodiku na vyhľadávanie komerčných filmov vhodných pre vyučovanie prírodopisných filmov [8]. Sledovanie filmov a výber jednotlivých filmových scén zameraných na živočíšnu ríšu. Začlenenie filmových scén do konkrétnych tematických celkov a súvisiacich tém v učebniciach biológie pre základné a stredné školy.

Výsledky a diskusia

Pre aplikáciu vo vyučovaní biológie bolo vhodných 5 filmov, a to filmy *Microcosmos*, *Príbeh modrej planéty*, *Tajomstvo oceánu*, *Zamilované zvieratá* a *Putovanie tučniakov*.

Film *Microcosmos* podáva fascinujúce príbehy zo života bezstavovcov a detailne mapuje ich život. Ponúka nám pozoruhodné zábery práce hmyzu, jeho telesnej stavby, rozmnožovania a rôznych životných prejavov hmyzu [6]. Konkrétne filmové scény sú vhodné pre využitie v 5. a 6. ročníku základných škôl. V biológii pre 5. ročník môžeme použiť filmové scény v tematickom celku *Život v lese*. Tematický celok sa zaoberá rastlinami a živočíchmi žijúcimi v lese a obsahuje niekoľko tém súvisiacich s problematikou lesa.

Do týchto tém je zaradená aj téma Iné lesné bezstavovce, pre ktorú má práve film *Microcosmos* široké uplatnenie. Vo filmových scénach sa objavuje niekoľko druhov hmyzu, ktoré sú priamo zahrnuté v učebnej látke. Konkrétne sa jedná o slimáka pásikavého, pavúky, roháča obyčajného a mravca a jeho život v mravenisku. Filmové scény ponúkajú náhľad do telesnej stavby hmyzu, spôsobu pohybu a chytania potravy, súbojov jedincov či stavby a fungovania mraveniska. Minutáž jednotlivých scén sa pohybuje v rozmedzí od jednej do troch minút.

V biológii pre 6. ročník môžeme filmové scény z filmu *Microcosmos* využiť v tematickom celku *Život s človekom* a v ľudských sídlach, konkrétne v témach *Živočíchy prospešné pre človeka* a *Živočíchy v okolí ľudských sídel*. Film nám ponúka pohľad na včelu robotnicu, lienku sedembodkovú a osu obyčajnú a ich telesnú stavbu, spôsob pohybu a životné prejavy. V prípade osy obyčajnej máme dokonca možnosť vidieť vývin od vajíčka až po dospelého jedinca. Dĺžka jednotlivých scén je dve až tri minúty.

Ďalším filmom vhodným pre využitie vo vyučovaní biológie je film *Príbeh modrej planéty*. Pri tomto filme sa nám ponúka naozaj širokospektrálne využitie nakoľko je ho možné využiť takmer v každom ročníku zaoberajúcom sa živočíšnou ríšou. Uplatnenie nájdeme v piatom, šiestom a siedmom ročníku základných škôl a aj v biológii stredných škôl.

V 5. ročníku je vhodné použiť filmové scény pri tematickom celku *Život vo vode* a na brehu, konkrétne v témach *Vodné rastliny* a *Obojživelníky a plazy vo vode a na brehu*. Vo filme môžeme vidieť jednobunkovca váľača guľavého a jeho kolóniu či rôzne druhy obojživelníkov, pričom sa sústreďujeme na ich morfológiu, spôsob pohybu a rozmnožovanie. Časový rozsah scén sa pohybuje v rozmedzí dvoch minút.

V 6. ročníku je možné využiť filmové scény z filmu *Príbeh modrej planéty* v tematickom celku *Vnútoraná organizácia tela organizmov*, konkrétne v téme *Jednobunkové organizmy*. Podobne ako v predchádzajúcom prípade máme možnosť vidieť jednobunkovca – meňavku veľkú a jej stavbu tela, jednotlivé orgány a jej pohyb. Táto scéna trvá 8 sekúnd.

V 7. ročníku môžeme spomínaný film zužitkovať v tematickom celku *Vnútoraná stavba tela stavovcov* v téme *Rozmnožovacia sústava stavovcov*. V niekoľkých scénach máme možnosť vidieť rozmnožovanie obojživelníkov spolu s ich jednotlivými vývinovými štádiami a príklady embryí rôznych stavovcov vrátane človeka. Minutáž oboch scén sa pohybuje v rozmedzí dvoch minút.

Pri aplikácii scén na vyučovanie biológie na stredných školách sme vychádzali z predpokladu, že živočíšnej ríši je venované učivo 3. ročníka gymnázií a učitelia v prevažnej miere využívajú na výklad učebnice *Biológia pre gymnáziá 1 – 6*. Zaradenie jednotlivých

filmových scén bude preto korešpondovať práve s týmito učebnicami, v našom prípade s učebnicou Biológia pre gymnáziá 3: Biológia a etológia živočíchov a učebnicou Biológia pre gymnáziá 4: Vývoj, systém a ekológia živočíchov.

Filmové scény z filmu Príbeh modrej planéty môžeme teda aplikovať pri výučbe Biológie a etológie živočíchov, a to v 2 tematických celkoch. Prvým je celok Etológia – správanie živočíchov, konkrétne učivo Najvýznamnejšie typy vrodeneho inštinktívneho správania. Film nám ponúka ukážky rozmnožovacieho vrodeneho správania u vtákov, ktoré zhrňa rôzne predsvadobné spevy a tance. Druhým tematickým celkom je Rozmnožovanie a ontogenéza živočíchov a s ním súvisiaca téma Zárodočný vývin živočíchov – embryogenéza. Vo filme môžeme vidieť kompletný embryonálny vývin rôznych stavovcov. Časový rozsah scén je jedna a dve minúty.

Spomínaný film má najširšie uplatnenie pri vyučovaní Vývoja, systému a ekológie živočíchov. Prvým tematickým celkom, pre ktorý je tento film vhodný je Ríša Jednobunkovce, konkrétne kmeň Meňavko-bičíkovce. Máme možnosť vidieť meňavku veľkú, jej morfológiu a pohyb pomocou panôžok. Scéna trvá iba niekoľko sekúnd.

Oveľa väčšie možnosti sa nám ponúkajú pri výučbe Ríše Živočíchov. Filmové scény sú vhodné pre témy: Kmeň Pŕhlivce, Kmeň Článkonožce a Podkmeň stavovce. Vo filme máme možnosť sledovať morfológiu, pohyb a rozmanité druhy medúzovcov, kôrovcov a hmyzu. Takisto rôzne charakteristiky tried obojživelníky a plazy s dôrazom na telesnú stavbu, pohyb, rozmnožovanie, telový pokryv a špecifiká jednotlivých druhov. Minutáž scén je od niekoľkých sekúnd až po tri minúty.

Tajomstvo oceánu je dokumentárny film o podmorskom svete. Jeho najsilnejšou stránkou sú unikátne zábery života pod vodnou hladinou, ktoré zachytávajú rôznorodé druhy vodných živočíchov, z ktorých niektoré boli objavené iba nedávno. Naša pozornosť sa však naopak zamerala práve na druhy pomerne známe, zahrnuté v učebniciach biológie pre základné a stredné školy. Tento film je možné využiť v 5. a 8. ročníku základných škôl a na strednej škole pri vyučovaní vývoja, systému a ekológie živočíchov.

V 5. ročníku sa dá využiť ako ilustrácia scéna pohybu ryby vo vode. Zodpovedá obrázkovej ilustrácii k téme Vodné a brehové stavovce – Ryby patriacej do tematického celku Život vo vode a na brehu. V 8. ročníku môžeme využiť film pri objasnení pojmu konkurencia zaradeného k téme Živé zložky prostredia – Populácia. Táto téma je súčasťou tematického celku Ekologické podmienky života. Máme možnosť vidieť príklady konkurencie rôznych druhov živočíchov. Obe scény nepresahujú jednu minútu.

Na strednej škole je vhodné využitie filmu Tajomstvo oceánu hlavne pri vysvetľovaní

Ríše Živočíchov, konkrétne tém súvisiacich s kmeňmi pŕhlivce a článkonožce a podkmeňom stavovce. Máme možnosť vidieť značné množstvo záberov na medúzovce, koralovce, kôrovce, hlavonožce, drsnokožce a morské cicavce, súvisiace s ich stavbou tela, pohybom, rozmnožovaním, chytaním koristi, druhovými špecifikami. Časové rozpätie je naozaj rôzne, pohybuje sa od niekoľkých sekúnd až po 5 minút.

Film *Zamilované zvieratá* je zaujímavý dokument, ktorý nám prináša pohľad na zvieratá zamilované, páriace sa i vychovávajúce svoje potomstvo. Sústreďuje sa na najdôležitejšie momenty života jednotlivých druhov živočíchov. Keďže práve tieto momenty alebo etapy životného cyklu sú veľmi často predmetom vyučovania, film ponúka širokospektrálne využitie aj na hodinách biológie. Je vhodný pre 7. ročník základných škôl a vyučovanie biológie a etológie živočíchov, takisto vývoja, systému a ekológie živočíchov.

V 7. ročníku je možné film zužitkovať pri opisovaní rôznych životných prejavov a správania stavovcov, ktoré je zahrnuté v téme Vnútoraná stavba tela stavovcov. Scéna nám umožňuje vidieť príklady starostlivosti o telo, teda príklady komfortného správania a trvá približne dve minúty.

Etológia alebo správanie živočíchov je predmetom výučby aj na stredných školách. Spomínané prejavy živočíchov môžeme zaradiť do učiva Najvýznamnejšie typy vrodeneho inštinktívneho správania, pričom vo filme *Zamilované zvieratá* sa objavia príklady na komfortné, teritoriálne a rozmnožovacie správanie. Keďže sa vo filme v značnom množstve objavujú vtáky spolu s ich hlasovými prejavmi, tieto scény môžeme využiť pri vysvetľovaní triedy vtáky, konkrétne pri funkcii orgánu syrinx a rôznorodosti jeho prejavov. Minutáž sa pohybuje v rozmedzí niekoľkých minút.

Posledným nami vybraným filmom je *Putovanie tučniakov*. Mapuje ročný kolobeh života tučniaka cisárskeho s dôrazom na jeho schopnosť odolávať tvrdým zákonom prežitia v nehostinnej ľadovej krajine. Z hľadiska aplikácie pre vyučovanie biológie sú pre nás dôležité hlavne rôzne modely správania prezentované týmto druhom vtáka. Nájdu si uplatnenie v 8. ročníku základných škôl a na stredných školách pri výučbe Etológie – správania živočíchov. Ak hovoríme o základnej škole, problematika správania živočíchov je zahrnutá v téme Živé zložky prostredia – Populácia, pričom vo filme máme možnosť vidieť predáciu teda vzťah medzi predátorom a korisťou. Na strednej škole je zahrnutá do učiva Najvýznamnejšie typy vrodeneho inštinktívneho správania. Objavujú sa príklady orientačného, rozmnožovacieho a sociálneho správania. Najkratšia zo scén trvá minútu, najdlhšia osem minút.

Záver

V súčasnej dobe filmový priemysel ponúka veľké množstvo filmov rôznych žánrov. Jedným z nich je aj prírodopisný film, s ktorým sa môžeme stretnúť doma, v kine ale aj v škole. Je úlohou moderného a tvorivého učiteľa biológie využiť možnosť, ktorú nám film ponúka a začleniť ho do vyučovania biológie či už na základných alebo stredných školách. Nami vytvorená databáza by mala učiteľom pomôcť efektívne, zmysluplne ale aj netradične a zaujímavo využiť čas strávený so žiakmi na vyučovacej hodine.

Pod'akovanie

Tento príspevok vznikol vďaka projektu KEGA 007UKF-4/2012.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Trebišovský J.V. (1980) Audiovizuálne prostriedky v teórii a praxi. SPN, Bratislava, p. 392
- [2] Turanová L., Bizubová M., Čerňanský S. (2006) Využívanie IKT v prírodovednom vzdelávaní - IKT vo výučbe geológie, Fakulta prírodných vied UKF, Nitra, p. 9
- [3] Host'ovecký M., Zařková T. (2011) ICETA 2011, Supporting the development of digital competences of pupils and teachers, Óbuda University, Budapešť, Maďarsko, p. 75
- [4] Schlarmanová J., Žáčok Ľ., Tvrdoňová M. (2006) Metody, formy, a prostriedky pro výuku přírodovědných, zemědělských a příbuzných oborů - Vyučovací hodina trochu jinak, PF UK, Praha, p. 92
- [5] Illášová Ľ., Sandanusová A. (2006) Výzkum v oborových didaktikách přírodovědných, zemědělských a příbuzných oborů - Využitie výsledkov výskumu v edukačnom procese. PF UK, Praha, p. 146
- [6] Štubňa J., Vreštiaková L. (2007) Študentská vedecká konferencia 2007. 2. zväzok - chemická, geologická, geografická a didaktická sekcia, Prírodopisný film v slovenských kinách a jeho možnosti využitia vo vyučovaní prírodovedných predmetov na základnej a strednej škole. Kartprint, Bratislava, p. 295
- [7] Champoux J. (1999) Journal of Management Inquiry, 8(2), p. 206
- [8] Štubňa J. (2008) Možnosti využitia filmu vo vyučovaní geológie. In: Turanová L. (ed.) Aktuálne problémy didaktiky geológie. Inovácia didaktických kompetencií, Iris, Bratislava, p. 106
- [9] Štubňa J., Vreštiaková L. (2008) Paidagogos - časopis pro pedagogiku a s ní související vědy, (2-3), p. 1

Námety výučby ekológie pre gymnáziá na príklade vodných ekosystémov

Igor Kokavec¹, Eva Bulánková²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra prírodných vied, psychológie a pedagogiky, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko;

kokavec99@gmail.com

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra ekológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko

Abstrakt

Aquatic ecosystems are ideal model for teaching ecological terms and relationships. The aim of this work was to develop new educational materials and lesson models focused on macrozoobenthos, fishes and freshwater classification for secondary school teachers. Materials offer a variety of ways, how to make education more modern and interesting. Materials has been prepared during the project Life and water – model applications and ideas for teaching of biology in high schools (acronym Aqua). Curriculum of ecology enable schools to realize education directly in nature and prepared educational materials offer teachers knowledge and practices how to do it.

Kľúčové slová: Učebné osnovy; exkurzia; prezentácia; vodný ekosystém; makrozoobentos

Úvod a formulácia cieľa

Prijatím Rámcovej smernice o vode 2000/60/ES sa všetky členské štáty Európskej únie zaviazali k zachovaniu a zlepšovaniu ekologického stavu vodného prostredia. Na dosiahnutie cieľov bolo potrebné oboznámiť verejnosť s touto problematikou v rámci popularizácie smernice, ktorá sa uskutočnila aj prostredníctvom projektov realizovaných na školách po celej Európe.

Jedným z projektov realizovaných na slovenských školách bol projekt „Voda, prameň života a poznania“ (AquaWis). Tento medzinárodný edukačný projekt ponúkal učiteľom biológie na gymnáziách, prípadne učiteľom 2. stupňa základných škôl, celkový koncept výučby ekológie na príklade tečúcich vôd. Cieľom projektu bolo poskytnúť učiteľom a žiakom prehľad v problematike ekologických vzťahov a potreby ochrany tečúcich vodných ekosystémov [1]. Na tento projekt nadväzuje ďalší projekt s názvom „Život a voda – modelová aplikácia a námety k výučbe biológie na gymnáziách“ (Aqua) podporený Kultúrnou a edukačnou grantovou agentúrou Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR (ďalej KEGA), ktorý rozširuje poznanie ekologických vzťahov aj do ekosystémov stojatých vôd. Cieľom projektu je prostredníctvom školení učiteľov a prípravou vzdelávacích materiálov zabezpečiť kvalifikované vyučovanie tematického celku „Život a voda“ priamo v prírode [2].

Cieľom tejto práce bolo dopracovať existujúce materiály pre učiteľov vytvorené v rámci projektu AquaWis a vytvoriť nové učebné materiály a modely hodín pre učiteľov

biológie na gymnáziách. Materiály oboznámia učiteľov a žiakov s poznatkami zameranými na ekologickú charakteristiku a adaptácie v tečúcich vodách žijúcich druhov makrozoobentosu a rýb a predstavujú aj ekologickú a ichtyologickú kategorizáciu vodných tokov. Pri ich tvorbe boli využité také organizačné formy a metódy vyučovania, ktoré zvyšujú motiváciu a záujem žiakov.

Úloha učebných pomôcok a didaktickej techniky sa vo vyučovaní najlepšie prejaví vtedy, ak si predstavíme učiteľa odkázaného výlučne na svoje slová. Aj keď slová sú silným prostriedkom učiteľa, ich účinok je obmedzený. Preto učitelia siahajú po pomôckach, ktoré im pomáhajú priamo sprítomniť niektoré javy a objekty na vyučovaní. Ich používanie súvisí najmä s didaktickou zásadou názornosti [3]. Jednou z takýchto pomôcok sú preto aj prezentácie pripravené v Power Pointe.

Exkurzia, ako organizačná forma vyučovania, využíva hlavne metódu pozorovania a výkladu a má charakter zážitkového vyučovania. Zážitkové učenie je proces, v ktorom sú vedomosti vytvárané na základe transformácie skúseností. Zážitkové vyučovanie je založené na vyššej schopnosti ľudskej pamäti zapamätať si informácie, ktorých vnímanie je sprevádzané so vznikom emócií [4]. Exkurzie zamerané na poznávanie života a vzťahov vo vodnom toku majú len málo priestoru na realizáciu v rámci vyučovania. Pre tento cieľ boli navrhnuté učebné osnovy predmetu ekológia pre gymnáziá.

Aplikácia poznatkov obsiahnutých v pripravených materiáloch je zhrnutá v rámci exkurzií, ktoré boli uskutočnené so žiakmi gymnázií na vodnom toku Vydrica.

Materiál a metódy

V rámci diplomovej práce boli vytvorené prezentácie v programe Microsoft Power Point, ktoré sú opísané vo forme príprav na vyučovanie podľa aktuálnych požiadaviek kladených na ich obsah a štruktúru. Súčasťou príprav sú rozmanité, aj interaktívne cvičenia, pracovné listy a didaktické testy vytvorené s použitím didaktických softvérov SMART, Hot Potatoes a programu MS Word, ktoré prispievajú interaktivitou do vyučovacieho procesu.

Fotografie makrozoobentosu, rýb a vodných tokov nachádzajúcich sa vo vytvorených materiáloch boli vytvorené v priebehu roka 2012 s použitím digitálneho fotoaparátu Olympus μ 5000 a NIKON D3000. Fotografie makrozoobentosu pochádzajú z hydrobiologických odberov v rámci exkurzií k tečúcim a stojatým vodám, ktoré som absolvoval so žiakmi gymnázií zapojenými do projektu Aqua alebo iných terénnych exkurzií a pri love rýb. Jednotlivé druhy makrozoobentosu boli po odbere odfotografované na bielej podložke a vypustené späť. Niektoré z ulovených druhov rýb som preniesol do akvária, ktoré

simulovalo prirodzené prostredie ich výskytu a zhotovil fotografie a videá, ktoré sú súčasťou krátkeho edukačného filmu *Ryby našich vôd*. Videá boli zaznamenané s použitím rovnakého digitálneho zariadenia. Ostatné fotografie pochádzajú z videí, internetových stránok, či súkromných zbierok iných autorov a niektoré druhy rýb vo videu z akvária nachádzajúceho sa na Katedre zoológie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského. Fotografie boli následne upravované v programe Olympus Master 2 a Adobe Photoshop CS6. Zostrihanie videí, pridanie titulkov a komentárov bolo uskutočnené v programe Windows Movie Maker.

Učebné osnovy predmetu ekológia boli navrhnuté na základe Metodiky tvorby Školského vzdelávacieho programu (ďalej ŠkVP), vydanou Štátnym pedagogickým ústavom [5]. V práci je opísaný koncept ŠkVP vo všeobecnej rovine a upravený Rámcový učebný plán pre gymnáziá.

Pri exkurziách boli využívané informácie, ktoré sú zakomponované do vytvorených učebných materiálov. Poznatky z exkurzií so žiakmi gymnázia Bilíkova v Bratislave som využil pri tvorbe ďalších učebných materiálov a exkurzií.

Výsledky a diskusia

Ekológia je rozdelená najmenej na tri hierarchické úrovne a to jedinec, populácia a spoločnosť. Na gymnáziách sa vyučovanie ekológie zameriava vo veľkej väčšine na poslednú úroveň spoločností rôznych typov ekosystémov v rámci vyučovacieho predmetu biológia v prvom ročníku na gymnáziách. Navrhnuté učebné osnovy pre predmet ekológia môžu pomôcť školám so zameraním na prírodné vedy, prípadne školám so záujmom o ekológiu, zaradiť tento predmet do ŠkVP. Poskytujú priestor na exkurzie a množstvo iných aktivít pre žiakov. Ekológia je rozdelená podľa ročníkov na tri tematické celky, prvý ročník sa venuje všeobecnej ekológii, druhý ročník ekosystémom Slovenska a tretí biómom Zeme.

Prezentácie vytvorené v rámci diplomovej práce majú pomôcť učiteľom a žiakom pochopiť a poznať rozmanitosť života vo vode. Je v nich množstvo názorných obrázkov s popisom, ktoré poskytujú dobrý základ pre vytvorenie obrazu o rozmanitosti nenápadných, ale o to zaujímavejších živočíšnych organizmov vyskytujúcich sa pod vodnou hladinou. Prezentácie boli vytvorené na sprístupnenie tém: *Ekologické charakteristiky makrozoobentosu a rýb*, *Makrozoobentos tečúcich a stojatých vôd*, *Adaptácie bentických bezstavovcov*, *Ryby Slovenska*, *Adaptácie rýb našich riek*, *Ekologická a ichtyologická klasifikácia vodných tokov* a *Teória riečneho kontinua*. Každá prezentácia je slovne opísaná vo forme prípravy na vyučovaciu hodinu, doplnená o množstvo otázok, aktivít, cvičení, pracovných listov, didaktických testov a videí, takže predstavuje pre všetkých učiteľov biológie zrozumiteľný

vzdelávací materiál, ktorý poskytuje bohatú paletu možností, ako urobiť vyučovanie pre žiakov záživnejšie, pestrejšie, modernejšie a zaujímavejšie.

Exkurzia prináša učiteľom spôsob, ako realizovať vyučovanie mimo budovy školy, pretože len bezprostredné pozorovanie prispieva k vytváraniu správnych predstáv a trvalých vedomostí. Exkurzia má veľkú nielen vzdelávaciu, ale aj výchovnú funkciu. Okrem toho, že pozorovaním predmetov a javov žiaci získavajú komplexnejšie vedomosti, formuje u nich aj vzťah k prírode a k jej ochrane [6].

Exkurzia *Riečny ekosystém* na jednej strane predstavuje vstup do tematiky vodných ekosystémov, ktorá sa bude v nasledujúcom období preberať a na druhej strane umožňuje zopakovať a v praxi aplikovať poznatky zo všeobecnej ekológie na modeli vodných ekosystémov.

Pedagogická zmysluplnosť je najviac závislá od prípravy učiteľa, ktorá spočíva v obozretnom výbere a zabezpečení miesta exkurzie, organizačnú a obsahovú prípravu žiakov a dôkladné rozpracovanie pripraveného programu.



Obr. 1 Ukážka z prezentácie Adaptácie benthických bezstavovcov



Obr. 2 Exkurzia so žiakmi Gymnázia Bilíkova na Vydrici

Ak plánovanie exkurzie je súčasťou prípravy tematických plánov, umožňuje eliminovať živelnosť a rozpačitosť ich realizácie [6]. Exkurzii predchádzajú úvodné hodiny zamerané nielen na teoretickú prípravu žiakov, ale riešia aj ciele, postup, obsah úlohy, ktoré budú výstupom exkurzie a ich hodnotenie. Exkurzia je podrobne naplánovaná po teoretickej aj praktickej stránke vo forme prípravy na vyučovanie.

Doteraz vytvorené materiály týkajúce sa vodných ekosystémov boli na Slovensku zamerané pre mladšie vekové skupiny žiakov. Inštitút aplikovanej ekológie (DAPHNE) poskytuje ekovýchovné programy pre žiakov materských a základných škôl a od roku 2012 ponúka pre učiteľov dve metodické príručky pre vyučovanie vodných ekosystémov [7]. Okrem modelov hodín, námetov aktivít a pracovných listov neposkytuje iné učebné pomôcky.

Ďalším projektom realizovaným aj u nás na základných školách bol projekt s názvom BISEL, ktorý vznikol v Belgicku. V rámci projektu bol navrhnutý zjednodušený kľúč na určovanie vybraných taxónov makrozoobentosu, kľúč na určovanie vodných rastlín a metodika hodnotenia ekologického stavu na základe vodných bezstavovcov [8].

V zahraničí sa popularizácii vedy a vzdelávaniu učiteľov a žiakov už dlhodobo venuje veľká pozornosť. V roku 2002 bolo v Anglicku vydané interaktívne vzdelávacie CD s názvom *Riverside Explorer* vytvorené pre potreby environmentálneho vzdelávania základných a stredných škôl. CD poskytuje učiteľom a žiakom množstvo obrázkov, učebných pomôcok a aktivít, ktoré sa zameriavajú na spoznávanie a vzťahy procesov a funkcií vodných tokov, riečnych habitatov a voľne žijúcich organizmov, prevažne stavovcov [9]. Toto CD bude so súhlasom jej autorov poskytnuté aj učiteľom, ktorí sa zúčastnia projektu Aqua. V rámci nemecko-slovenského projektu AquaWis boli prvý raz u nás vytvorené didaktické materiály pre stredoškolských učiteľov a žiakov, ktoré na príklade tečúcich vôd objasňujú ekologické pojmy a význam ochrany vôd.

Výstupy mojej diplomovej práce nadväzujú na materiály vytvorené aj v týchto projektoch a rozširujú ich. Svojou štruktúrou a obsahom sú však určené pre žiakov slovenských stredných škôl a gymnázií. Poskytujú žiakom aj učiteľom moderný vzdelávacie materiál, ktorý rozširuje stredoškolské učivo zamerané na vodný ekosystém za účelom skvalitnenia environmentálnej výchovy a výučby ekológie a biológie.

Exkurzie, prezentácie a modely hodín, pripravené v rámci riešenia projektu Aqua poskytujú žiakom podrobné poznatky o rybách a bentických bezstavovcoch, ich vzájomných vzťahoch a vzťahoch k prostrediu. Ekológia vodných ekosystémov je preberaná z hľadiska vodnej bioty aj abiotických podmienok na základe klasifikácie tokov. Ekologické pojmy sú preto viac krát zopakované a stávajú sa bežnou súčasťou slovníka žiakov.

Záver

Prípravou uvedených materiálov zameraných na vodný ekosystém som chcel prispieť k rozvoju vedomostí žiakov o živote a vzťahoch organizmov žijúcich pod vodnou hladinou. Pri realizácii jednotlivých hodín a využití pripravených materiálov sú použité také metódy a formy vyučovania, ktoré podnecujú motiváciu a aktivizáciu žiakov, vyznačujú sa názornosťou, dynamikou a komplexnejším prístupom. Umožňujú žiakom aktívne sa zapájať do vyučovacieho procesu a vykonávaním rôznych činností a pozorovaní sami dospieť k dôležitým informáciám a záverom, ktoré prinášajú trvalé vedomosti. Zároveň prinášajú do vyučovania rôzne inovatívne prvky (zapojenie žiakov do hodnotenia ekologického stavu).

Prezentácie a učebné materiály sú využiteľné učiteľmi na hodinách biológie v rámci tematického celku „Život a voda“ alebo pri prípravách gymnazistov na domáce aj zahraničné súťaže týkajúce sa vodných ekosystémov a ich ochrany. Predmet ekológia zaradený do školského vzdelávacieho programu gymnázia, by umožnil učiteľom realizovať vzdelávanie v oblasti ekológie priamo v prírode v rámci vyučovania, a tým priniesol spetrenie a inováciu vzdelávania a výchovy. Na základe exkurzií absolvovaných so žiakmi gymnázií som dospel k záveru, že vyučovanie žiakov v prírode s využitím moderných metód vytvára u žiakov vnútornú motiváciu a upriamuje pozornosť aj zdanlivo nezainteresovaných žiakov. Vďaka zážitkovému spôsobu vyučovania vytvára u žiakov trvalé vedomosti a prispieva k vyššiemu záujmu o predmet biológia (ekológia). Svojim obsahom zvyšuje environmentálne povedomie žiakov a prispieva tak k ochrane vodných biotopov.

PodĎakovanie:

Moje podĎakovanie patrí RNDr. Soni Nagyovej PhD. za odbornú pomoc a cenné rady. Učebné materiály sú čiastkovým výstupom riešenia grantového projektu KEGA č. 073UK-4/2012 „Život a voda – modelové aplikácie a námety k výučbe biológie na gymnáziách.“

Zoznam použitej literatúry

- [1] AquaWis, projekt Voda, prameň života a poznania [Citované: 25. február 2013]
<<http://www.aquawis.eu/ucitelia.php?id=2>>
- [2] Bulánková E. (2012) Biológia, ekológia, chémia. 16(2) p. 5
- [3] Turek I. (2008) Didaktika. Iura Edition, Bratislava, p. 304
- [4] Kapšová J. (2008) Zoom – m 3/2008 p. 4
- [5] Štátny pedagogický ústav [Citované: 25. február 2013]
<http://www2.statpedu.sk/buxus/docs/kurikularna_transformacia/tvorbasvp.pdf>
- [6] Gnoth M., Pupala B. (2003) Vybrané kapitoly z pedagogiky I (učiteľ a vyučovací proces). Univerzita Komenského, Bratislava, p. 53
- [7] Inštitút aplikovanej ekológie – DAPHNE [Citované: 25. február 2013]
<<http://www.daphne.sk/>>
- [8] BISEL, projekt Slovenskej akadémie životného prostredia [Citované: 25. február 2013]
<<http://www.sazp.sk/bisel/>>
- [9] Hawley D., Raven P.J., et al. (2002) Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst. 12 p. 457

Chemický projekt pre žiakov prvého ročníka osemročného gymnázia

Gabriella Németh

Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra didaktiky prírodných vied, psychológie a pedagogiky, Mlynská dolina, 842 15, Bratislava 4; nemeth@fns.uniba.sk

Abstrakt

The article is about the characterisation of a project-based learning on the theme Mixtures and solutions. The project was designed and used in a first year class of a high school with 8 year duration. The article also deals with the creation of different tools and materials for the implementation of the project-based learning into the teaching process. Thereafter we also analyze the fruitfulness of above mentioned tools and materials.

Kľúčové slová: projektové vyučovanie, zavedenie projektovej metódy do vyučovania, pomocné materiály

Úvod a formulácia cieľa

Správne zavedenie projektovej metódy do vyučovacieho procesu chémie môže mať kladné dôsledky na rozvoj kľúčových kompetencií žiakov. Projektové vyučovanie tiež môže byť vhodným nástrojom na obohacovanie bežného vyučovania a kladnej motivácie žiakov jednak k učeniu, ako aj k predmetu chémia. Učiteľia ale často nevedia ako začať s realizovaním projektového vyučovania.

Cieľom nášho výskumu bolo vytvorenie plánu projektu pre žiakov bez predchádzajúcich skúseností projektového vyučovania a otestovanie vytvoreného plánu na reálnych vyučovacích hodinách.

Materiál a metódy

Plánovacia fáza projektu

Plánovanie projektu a projektových úloh sa uskutočnilo v októbri 2012 počas niekoľkonásobného stretnutia s učiteľkou chémie vybranej triedy.

1. Výber triedy a témy pri ktorej sme zohľadnili niekoľko faktorov, ako:

- Veľkosť triedy – Projekt sa realizoval v rámci vyučovacieho predmetu chémia a žiaci ešte nemali žiadne skúsenosti s projektovým vyučovaním, preto sme zvolili triedu s menším počtom žiakov (15 žiakov).
- Vek žiakov – Pre získanie najpresnejších výsledkov sme chceli zaviesť projekt v triede, kde s najväčšou pravdepodobnosťou žiaci ešte nerobili projekt, preto sa zvolil 1.ročník (prima) osemročného gymnázia.

- Výber témy – Pri voľbe témy projektu sme vychádzali zo školského vzdelávacieho programu pre chémiu a z tematických plánov chémie pre vybraný ročník a v konečnom dôsledku sa zvolila hlavná téma projektu „Zmesi“.
- Voľba hľadísk spracovania/tvorby tematických skupín – Téma projektu sa rozdelila na 4 tematické hľadiská spracovania nasledovne: Čistiaca brigáda, Enviráci, Kozmetici a Maliari. Hlavnou úlohou každej skupiny bolo skúmanie zmesí podľa zamerania skupiny.

2. Tvorba materiálov pre žiakov/Plánovanie projektových činností žiakov

a) Tvorba prvého materiálu pre žiakov:

Pod prvým materiálom v projekte chápeme papierovú, alebo digitálnu formu doporučenej literatúry pre žiakov na základe čoho žiaci pochopia svoje úlohy a pomôže učiteľom, aby sa žiaci pri zbere informácií sústredili na dôležité veci. V našom prvom materiáli sme zvolili nasledovný prístup:

Po zvolení motivačného videa o Krtkovi chemikovi [1] sme napísali krátky príbeh o Krtkovi, ktorí raz v lese našiel veľký strom, v ktorom žije Zajac chemik. Zajac začne rozprávať Krtkovi o rôznych zmesiach... Text rozprávky je postupne nahradený webovými zdrojmi informácií o zmesiach. K poskytnutým zdrojom sú podľa potreby pripojené obrázky s poznámkami, kde je možné nájsť ďalšie informácie v rámci daného webového rozhrania.

Zbierka doporučenej literatúry obsahovala také zdroje, ktoré si každá skupina mala prečítať (napr. informácie o zmesiach, o ich typoch a zložení atď.) a individuálne zdroje podľa tematického zamerania skupiny.

Prvý materiál žiaci dostali aj v papierovej forme aj v digitálnej forme na ich poskytnutú mailovú adresu.

b) Tvorba druhého materiálu pre žiakov

Cieľom druhého vytvoreného materiálu je pomôcť žiakom v ďalších činnostiach projektu. Druhý materiál sa využíva po skontrolovaní toho, či žiaci preštudovali poskytnuté zdroje. Používa sa tiež pri realizácii vybraných pokusov.

Našími ďalšími materiálmi na tento účel boli pracovné listy. Každá skupina dostala dva rôzne pracovné listy. Hlavnou témou prvého pracovného listu bolo: „Zmesi a ich rozdelenie filtráciou“, kde žiaci mali možnosť na základe písomných pokynov realizovať filtráciu Coca-Coly s aktívnym uhlím a následne riešiť niekoľko úloh týkajúcich sa filtrácie a prečítať si dodatočné informácie o adsorpcii. Prvý pracovný list a prvý pokus bol totožný pre každú skupinu. Využitie prvého pracovného listu malo niekoľko cieľov:

- naučiť žiakov riadiť vlastnú prácu na základe písomných pokynov

- poskytnúť možnosť žiakom stotožniť sa s laboratórnou prácou
- realizovať filtráciu
- okrem bežnej filtrácie oboznámiť sa s javom adsorpcie (informácie budú môcť využiť po realizácii druhého pracovného listu)
- pomocou jednoduchých úloh opakovať a upevniť vedomosti o zmesiach.

Druhý pracovný list pre každú skupinu mal rovnakú formu, ale s rôznymi úlohami a pokusmi. Skupiny mali jednoduché a efektívne pokusy, ktoré sa rozdelili na menšie pokusy podľa nasledujúceho príkladu:

Pre skupinu Čistiaca brigáda sa zvolil pokus s názvom Hra farieb vo fľaši [2]. Princíp základného pokusu je založený na tom, že atrament, ktorý nie je rozpustný v oleji, vo fľaši s olejom a vodou klesne na dno olejovej vrstvy ako kvapka. Keď kvapka atramentu prerazí povrchové napätie vody (ktorá je jemne zafarbená potravinárskym farbivom) na spodnej hranici olejovej vrstvy, tak sa veľmi rýchlo rozpustí a vytvorí pekné farebné čiary a efekty vo vode počas difúzie. Základný pokus sa rozdelil na čiastkové pokusy nasledovne:

1. Skúmanie vlastností vody, potravinárskeho farbiva a atramentu – cieľom pokusu bolo spoznanie správania sa potravinového farbiva a atramentu vo vode.
2. Skúmanie vlastností vody a oleja – cieľom pokusu je spoznanie vzniku emulzie.
3. Skúmanie vlastností oleja, vody a atramentu – cieľom pokusu je spoznanie správania sa atramentu vo vode a v oleji.
4. Hlavný pokus „Hra farieb vo fľaši“.

Čiastkové pokusy majú viesť žiakov k spoznaniu princípu hlavného pokusu. Po každom čiastkovom pokuse žiaci popíšu a nakreslia ich pozorovania a vysvetlia čo videli. Pri riešení hlavného/výsledného pokusu už na základe predchádzajúcich čiastkových pokusov môžu sami vydedukovať princíp pokusu. Po hlavnom pokuse žiaci dostanú ďalšiu úlohu: Vytvorenú zmes majú teraz rozdeliť na jednotlivé časti a následne svoje nápady po prekonzultovaní s učiteľkou môžu aj vyskúšať.

Využitie druhého pracovného listu malo nasledovný cieľ:

- žiaci majú naďalej postupovať na základe písaných pokynov
 - naučiť žiakov samostatne pracovať v skupine a spoločne rozmýšľať o dôvodoch pozorovaných javov
 - poskytnúť žiakom možnosť naučiť sa vedecké pozorovanie a opísanie pozorovaných javov
 - poskytnúť žiakom možnosť riešiť praktické problémy
- c) Tvorba „Zmluva o spolupráci“

Žiaci majú možnosť prvýkrát pracovať spolu v skupine, preto na stotožnenie sa s myšlienkou skupinovej spolupráce a na zavedenie zásad a pravidiel skupinovej spolupráce sa vytvorili tzv. Zmluvy o spolupráci. Zmluvy sa podpíšu pri tvorbe skupín na prvej vyučovacej hodine projektu. Okrem vopred vytvorených pravidiel sa žiakom poskytne možnosť zasahovať do pravidiel, na základe konzultácií ich zmeniť, prepísať alebo pridať ďalšie.

d) Tvorba hodnotiacich materiálov

V projekte pre objektívnejšie hodnotenie žiackej práce, spolupráce a výsledných produktov sa vytvorili hodnotiace pomôcky: Hodnotiaci hárok (zbierka kritérií a úrovne kritérií) pre hodnotenie výslednej prezentácie a vytvorených plagátov, Sebahodnotiace dotazníky o vlastnej práci žiakov, Hodnotiace dotazníky na hodnotenie práce spolužiakov v skupine a krátky dotazník na hodnotenie celého projektu.

Realizácia projektu

Počas realizácie projektu prebiehalo systematické pozorovanie práce skupiny žiakov. Realizácia projektu prebiehala vo forme projektového dňa na škole. Pred samotným projektovým dňom sa realizovala prvá vyučovacia hodina projektu, kde si žiaci pozerali motivačné video, rozdelili sa do skupín, podpísali zmluvy o spolupráci a dostali prvý materiál pokusu. Žiaci dostali 4 týždne na preštudovanie poskytnutých zdrojov a vyhotovenie spoločných referátov.

Nasledoval projektový deň, ktorý pozostával zo 7 vyučovacích hodín. Na prvej a druhej vyučovacej hodine žiaci dostali možnosť prezentovať svoje referáty. Referáty, ktoré tvorili spolu ako skupina, prezentovali ako skupina. Pri prezentovaní získaných informácií sa každý žiak prejavil slovnou. Pri prezentovaní referátov sme zistili, že žiaci prirodzene rozdelili zdroje informácií a každý preštudoval svoju časť. Prezentácia získaných informácií poskytla žiakom možnosť:

- referovať o preštudovanej časti a tým oboznámiť aj ďalších členov svojej skupiny aj triedy so získanými vedomosťami
- získať prvé skúsenosti, vyjadriť sa a opísať vedomosti vlastnými slovami
- získať prvé skúsenosti, prezentovať vlastnú prácu pred spolužiakmi a odpovedať na otázky vlastných spolužiakov (nielen učiteľov).

Druhá a tretia vyučovacia hodina bola venovaná realizácii pokusu pomocou prvého pracovného listu. Žiaci mali možnosť vyskúšať intenzívnu spoluprácu a získali prvé skúsenosti pracovať podľa písomných pokynov s veľmi malou pomocou zo strany učiteľky.

Na štvrtej a piatej vyučovacej hodine žiaci realizovali pokus druhého pracovného listu. Na siedmej vyučovacej hodine sa riešila problémová úloha: „Ako rozdeliť vzniknutú zmes?“ Počas realizácie pokusov učiteľka vystupuje ako koordinátor procesu. Žiaci sa nemôžu na ňu spoľahnúť v každej minúte, aby konštantne poskytla precízne postupy, ale sú nútení postupovať podľa prístupných zdrojov (pracovné listy). Učiteľka postupne kontroluje priebeh práce skupiny a konzultuje so žiakmi získané výsledky. Žiaci na poslednej hodine projektového dňa dostanú aj pokyny a kritériá na vyhotovenie plagátov a prípravu výsledných prezentácií.

Zvyčajne po 2 týždňoch (v našom prípade 4 týždňoch, kvôli zimným prázdninám) sa realizovalo ďalšie stretnutie so žiakmi. Naše stretnutie trvalo 1 vyučovaciu hodinu, kde žiaci mohli ukázať už polohotové plagáty a získať priebežnú spätnú väzbu na vylepšenie ich výsledných produktov.

Prezentačný deň projektu prebiehal týždeň po kontrolnej hodine. Na dvoch vyučovacích hodinách žiaci prezentovali celý priebeh projektu, sústredili sa na úroveň spojenia získaných vedomostí z informačných zdrojov a realizovaných pokusov. Okrem získaných vedomostí sa využíval na hodnotenie vytvorený hodnotiaci hárok, ktorý zahŕňal aj hodnotenie slovného prejavu a úroveň prezentácie žiakov.

Na poslednej vyučovacej hodine prezentačného dňa (tretia vyučovacia hodina) žiaci sa venujú sebahodnoteniu pomocou sebahodnotiaceho hárku s jednoduchými otázkami o názoroch vlastnej práce. Žiaci tiež poskytnú podobnú spätnú väzbu pomocou ďalších hárkov pre hodnotenie práce vlastných spolužiakov, s ktorými spolupracovali v skupine. Následne sa žiakom poskytla možnosť vo forme dotazníka s otvorenými otázkami vyjadriť vlastné názory o projekte a o možných vylepšeniach projektu. V tejto fáze projektu sa žiaci učia nielen vyjadriť vlastné názory, ale vyjadriť ich aj konkrétne a čo najpodrobnejšie.

Diskusia

Fáza tvorby materiálov:

Najväčší problém pri tvorbe materiálov spôsobuje voľba vhodných literárnych zdrojov pre danú vekovú skupinu žiakov. Kvôli ročníku sa nedali používať žiadne cudzojazyčné zdroje. Pri zavedení projektu do stredoškolských tried by sa dalo obohatiť literatúru aj o cudzojazyčné zdroje, ktoré sú v mnohých prípadoch bohatšie.

Fáza realizácie projektu:

1. Pri prezentácii získaných informácií sme zistili, že niektorí žiaci v rôznych skupinách nesprávne interpretovali úlohu, kde mali vyhotoviť jeden referát pre celú skupinu. Pre

odstránenie nedorozumenia po prvej hodine a pred samotným projektovým dňom by bolo potrebné zaviesť jednu konzultačnú hodinu, kde žiaci môžu preukázať, čo stihli spracovať, čo im ešte chýba a poprípade pracovať spoločne na vyhotovení referátu.

2. Žiaci boli zvyknutí na tradičné vyučovanie, preto ich bolo treba počas celého projektu upozorňovať, že sa majú vyjadrovať vlastnými slovami a nie recitovať definície. Na konci projektu, pri výslednej prezentácii už žiaci dokázali pekne a zrozumiteľne opísať niektoré časti projektu vlastnými slovami, ale stále pretrvávala tendencia recitovať definície. Realizovaním ďalších projektov sa zvýši pravdepodobnosť, že žiaci si zvyknú vyjadrovať sa vlastnými slovami.
3. Vytvorenie plagátov žiakom nespôsobilo veľké ťažkosti, hlavne zakomponovaná kontrolná hodina sa ukázala ako veľmi užitočná na zvýšenie úrovne vytvorených plagátov. Na kontrolnej hodine žiaci získali pokyny od učiteľov, kde by bolo možné vylepšiť ich plagát a čo ešte by bolo potrebné dodať.
4. Žiaci až v našom projekte získali prvýkrát možnosť prezentovať vlastnú prácu a nielen odpovedať na učiteľkine otázky ako počas bežnej vyučovacej hodiny. Kvôli pretrvávaniu žiackej recitácie definícií, prednes ich prezentácie bol trochu nešikovný a viac pripomínal odpovedanie ako prezentáciu. Prezentačné schopnosti sa ale dajú naučiť a zavedením ďalšieho stretnutia pred prezentáciou, kde žiaci majú možnosť reálne si precvičiť celú prezentáciu, môže vylepšiť ich výsledný výkon v tejto oblasti.

Záver

Navrhnutý projekt ako samotné vyučovanie mal veľký úspech medzi žiakmi. Nielen samotná spolupráca priniesla žiakom niekoľko krásnych a zábavných momentov, ale realizovanými pokusmi mohli lepšie pochopiť základné chemické javy. Okrem spolupráce mali možnosť rozvíjať si svoje schopnosti a zručnosti v projektovom vyučovaní a mali možnosť vyskúšať si netradičné metódy vyučovania (napr. sebahodnotenie). Popísaný projekt môže slúžiť ako dobrá inšpirácia pre prvotné zavedenie projektového vyučovania pre žiakov.

Pod'akovanie

Táto práca vznikla za podpory grantov VEGA č.1/0417/12 MŠ SR a UK/360/2013.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Videakid [Citované: 5. marec 2013] <<http://videakid.hu/videok/animacio/kisvakond-a-kemikus-gyerek-mese-vakond-pKe6Xt15nVd95OD3>>
- [2] Chajda R. (2008) Fyzika na dvoře. Computer press a.s., Brno Holandská 8, p. 12

Vizualizácia vybraných foriem georeliéfu ako doplnkový materiál ku štúdiu geomorfológie na vysokých školách

Miroslava Šárová

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyzickej geografie a geoekológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
miroslava.sarova@gmail.com*

Abstract

Georelief as the complex of shapes on the Earth's surface is created at the landmark between partial geospheres (lithosphere, atmosphere, pedosphere, and hydrosphere). It is the place of intensive interaction of the land components. Geomorphological processes in particular conditions result in formation of various types of georelief with characteristic landforms. The selection of the types of georelief in this thesis was determined by their prevalence or their uniqueness. This thesis concerns certain fluvial, karst, glacial, slope landforms, as well as passive morphostructures. Their characteristics and visualisation through map samples, photographs, and 3D models enable students to gain integrated knowledge of a certain landform. Flights over 3D models provide us with a great view of landforms which is often impossible during a field research. This is why it can serve as a great addition to study of geomorphology and can really help students to better understanding.

Kľúčové slová: geomorfológia; georeliéf; forma georeliéfu; vizualizácia; prelet nad 3D modelom

Úvod a formulácia cieľa

Pri štúdiu geomorfológie považujem za najlepší spôsob na porozumenie vzniku, vývoja a súčasného stavu geomorfologických foriem terénny výskum. Je nevyhnutné a pre študenta veľmi prínosné vidieť danú formu priamo v teréne. Pre tento účel sa aj na našej fakulte konajú exkurzie zamerané okrem iného aj na geomorfológiu, po ktorých absolvovaní má študent bez pochyb jasnejšiu predstavu o formách, ktoré videl na vlastné oči. Za dobu jednej týždňovej exkurzie je však možné navštíviť len obmedzený počet zaujímavých lokalít. Prednášky zahŕňajúce popisy foriem, prípadne vhodné fotografie, sú výborným podkladom pre tvorbu teoretickej základne vedomostí. Popisných diel zameraných na geomorfológiu je mnoho, avšak citeľná je absencia takého učebného materiálu, ktorý by študentom dovolil vidieť jednotlivé formy reliéfu v inom rozmere. Preto som sa pod odborným vedením RNDr. Márie Bizubovej rozhodla pokúsiť sa obohatiť učebné materiály a priniesť študentom nový, nevšedný pohľad na geomorfologické formy.

Georeliéf ako súbor tvarov zemského povrchu vzniká na styku čiastkových geosfér a je miestom intenzívnej interakcie krajinných prvkov. [1]. Vzniká pôsobením geomorfologických procesov, ktoré v danom prostredí podmieňujú vznik rozličných typov georeliéfu s charakteristickými formami. Cieľom práce je obohatiť študijné materiály

o fotografie spolu s náhľadom vrstevnicovej mapy, ale najmä o 3D modely vybraných foriem georeliéfu, ktorých výber vychádza z klasifikácie podľa Geomorfologickej tabuľky. [2]

Na Slovensku síce nenájdeme všetky formy, ktoré boli doposiaľ klasifikované, avšak pestrý georeliéf našej krajiny predstavuje bohatú databázu geomorfologických foriem. Výber foriem v tejto práci bol podmienený ich častým výskytom alebo naopak jedinečnosťou na území Slovenska, závisel taktiež od veľkosti foriem. Práca je venovaná vybraným fluviálnym, krasovým, glaciálnym, svahovým formám a pasívnym morfoštruktúram, ktorých rozmery si niekedy vyžadujú pohľad z výšky či širší uhol pohľadu, čo terénne podmienky mnohokrát nedovoľujú. Ich vizualizácia vo forme fotografie, vrstevnicovej mapy a 3D modelu umožňuje študentom získať ucelené vedomosti o danej forme. Prelety nad 3D modelmi vo forme videí umožňujú vidieť niektoré formy tak, ako to v teréne nie je možné. Preto môžu predstavovať významný doplnok ku štúdiu geomorfológie a študentom môžu výrazne napomôcť k lepšiemu porozumeniu problematiky.

Materiál a metódy

Pri zostavovaní práce som bola inšpirovaná zahraničnými prácami podobného zamerania, ako napríklad Digitální atlas geomorfologických forem Plzeňského kraje [3] alebo atlas rôznych reprezentatívnych geomorfologických foriem sveta prostredníctvom aplikácie Google Earth [4].

Existuje niekoľko zdrojov získania podkladov využiteľných pri takto zameranej práci. Hlavne pri mapových podkladoch a digitálnych modeloch sú k dispozícii aj iné, kvalitnejšie, no finančne náročné zdroje. Pri práci som však uprednostňovala voľne dostupné materiály. Nasledovný postup som zvolila pre jeho finančnú nenáročnosť a možnosť využitia aj v budúcnosti.

Pri výbere fotografií som využila hlavne vlastný archív (t. j. väčšina fotografií vznikla počas vlastného terénneho výskumu), niektoré fotografie mi poskytli moji známi. V prípade potreby fotografie zachytávajúcej danú formu z lepšieho a názornejšieho uhla pohľadu som využila rôzne internetové stránky.

Mapový podklad v podobe výrezu vrstevnicovej mapy slúžil na znázornenie konkrétnej formy v teréne. Pracovala som s Turistickou mapou [5], ktorej výber som zvolila z dôvodu možnosti aktivovania ďalších vrstiev (turistické značky a i.). Výhodou je tiež možnosť online plánovania turistických trás, čo je využiteľné aj pri organizovaní terénnych exkurzií alebo individuálnych výletov za zaujímavými geovednými lokalitami. Dĺžky strán

výrezu mapy v tvare obdĺžnika závisia od rozmerov danej formy, prípadne aj od potreby zdôrazniť jej okolie. Tento výrez tvorí ohraničenie aj pre 3D model. Mapa bola metódou georeferencovania importovaná do programu Arc Gis 9.3 (Arc Map).

Azda najdôležitejšiu úlohu zohráva 3D model danej formy, a to vďaka svojej výpovednej hodnote. Okrem zmien nadmorských výšok znázorňuje aj priebeh vrstevníc v teréne a podáva používateľovi nevšedný pohľad na danú formu. Modely boli spracované taktiež v programe Arc Gis 9.3 (Arc Scene). Pri tvorbe preletu nad 3D modelom som sa snažila o takú trasu preletu, ktorá čo najlepšie vystihuje špecifiká danej formy, čím sa môže stať vhodným doplnkom počas prednášok alebo cvičení z geomorfológie. Prelety nad 3D modelmi vybraných foriem v podobe videa tvoria samostatnú prílohu.

Základom 3D modelu je voľne stiahnuteľný digitálny model reliéfu (DMR) [6], ktorý predstavuje raster s rozlíšením 1 pixelu na 90 m. Pri tomto rozlíšení má každý pixel určenú nadmorskú výšku. Keďže ale pracujem s výrezmi veľkosti len zopár km², funkciou resample som zmenila rozlíšenie 1 pixelu na 25 m, čo slúži na jemnejšie vykreslenie modelu. Takto upravený DMR nie je vhodný pri morfometrických analýzach, avšak tento postup je prijateľný v prácach zameraných na jednoduchú vizualizáciu reliéfu. Z upraveného DMR boli následne vygenerované vrstevnice s rozstupom 10 m, pričom každá 50-ta vrstevnica bola zvýraznená.

Pri modeloch zobrazujúcich celé Slovensko býva využívaná farebná škála tak, aby oblasti nížin boli v odtieňoch zelenej, so stúpajúcou nadmorskou výškou farebná škála prechádza odtieňmi žltej a je zakončená odtieňmi hnedej až svetloružovej (najvyššie položené miesta). Ak by bola farebná škála s prechodmi farieb vo fixne daných nadmorských výškach použitá aj v mojej práci, v prípade 3D modelov niektorých foriem by celá forma obsahovala len 1 odtieň. Preto je pri každej forme využitá rovnaká farebná škála, avšak s prechodmi farieb v takých nadmorských výškach, aby bolo možné zobrazit' všetky odtiene farebnej škály, čím sa zvýraznia zmeny v nadmorských výškach.

Výsledky a diskusia

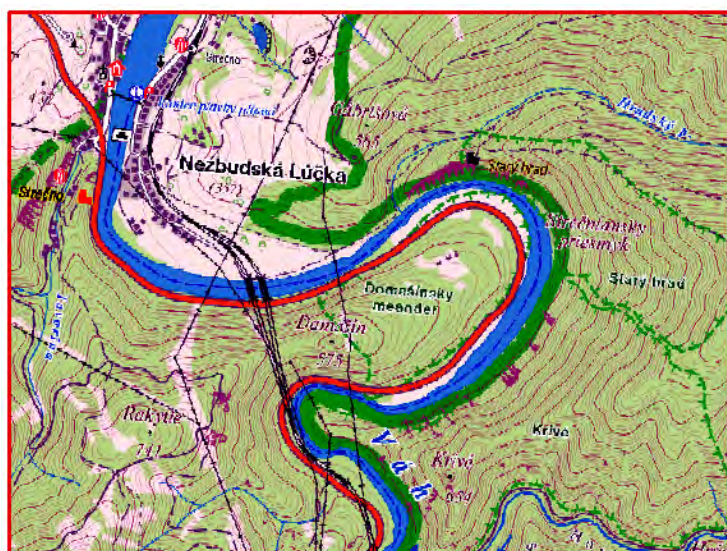
Predkladaná práca predstavuje zhromaždenie vizuálnych podkladov, ktoré môžu slúžiť ako doplnkový materiál ku štúdiu geomorfológie na vysokej škole. V práci sa zaoberám vizualizáciou 11 foriem georeliéfu, ktoré sú uvedené v Tabuľke č. 1.

Tab. 1 Vybrané vizualizované formy georeliéfu

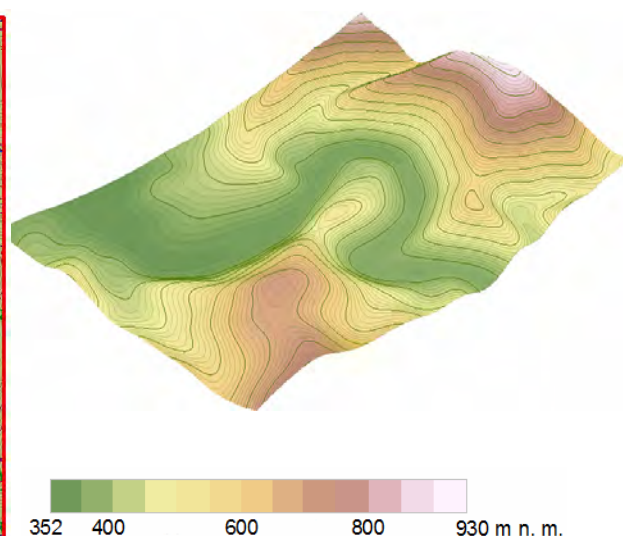
Typy foriem	Forma	lokality
fluviálne	meander	Domašínsky meander
	prielomová dolina	prielom Váhu cez Veľkú Fatru, okolie Lubochné
	windgap	Kozie chrbty
krasové	tiesňava	Juráňova dolina
	roklina	Suchá Belá
	kaňon	kaňon Slanej, Silická / Plešivecká planina
glaciálne	trog	Velická dolina
	nunatak	Hrubá kopa
	visutá dolina	Ťažká dolina
gravitačné	združené hrebene	Salatín
pasívne morfoštruktúry	monoklinálny chrbát	Veľký Choč

Výsledkom spracovania podkladov podľa vyššie uvedeného postupu sú 4 typy vizuálnych pomôcok pre štúdium geomorfológie zobrazujúce jednotlivé formy georeliéfu: fotografia, výrez vrstevnicovej mapy, 3D model a prelet nad 3D modelom vo forme videa. Dané výstupy (okrem preletu nad 3D modelom vo forme videa) znázorňujú nasledujúce obrázky.

**Obr. 1** Domašínsky meander – pohľad z pravého brehu Váhu od Starého hradu



Obr. 2 Domašínsky meander – výrez vrstevnicovej mapy 3x4 km



Obr. 3 Domašínsky meander – ukážka 3D modelu

Porovnaním obrázkov 1-3 sa však môžeme presvedčiť o nedostatkoch fotografického a mapového materiálu. Fotografie pri formách väčších rozmerov nedokážu zachytiť celú formu alebo jej okolie, ktoré má vo väčšine prípadov taktiež súvis so vznikom a vývojom danej formy. Štúdium foriem prostredníctvom mapových podkladov neposkytuje dojem plasticosti reliéfu, študenti majú navyše často problém s pochopením priebehu vrstevníc s meniacou sa nadmorskou výškou. Týmto vizuálnym pomôckam preto jednoznačne konkuruje prelet nad 3D modelom. Poskytuje totiž nevšedný pohľad na geomorfologické formy z vtáčej perspektívy. Vďaka tomu je možné zlepšiť predstavivosť študenta o daných formách, čo prispeje k ich bližšiemu poznaniu dokonca i bez osobného terénneho výskumu.

Záver

V predkladanej práci som sa venovala vizualizácii vybraných foriem georeliéfu v podobe fotografie, výrezu vrstevnicovej mapy a 3D modelu, a to najmä za pomoci programu Arc Gis 9.3. Využitím voľne dostupných údajov a podkladov bolo možné vytvoriť pomerne zaujímavú učebnú pomôcku.

Táto práca nie je zameraná na popis daných foriem, môže však predstavovať doplnkový materiál k mnohým už existujúcim popisným prácam. V učebných textoch a iných dielach venovaných tvarom georeliéfu autori niekedy na lepšie znázornenie foriem georeliéfu využívajú blokdiagramy, avšak jeden uhol pohľadu a statickosť takéhoto typu vizualizácie často nepostačujú, čo platí aj pre fotografie a mapy. Obohacovanie študijného procesu

o vizuálny materiál s väčšou výpovednou hodnotou je preto viac než potrebný. Na pomoc tým študentom, ktorým robí ťažkosti predstaviť si niektoré formy väčších rozmerov, boli vytvorené prelety nad 3D modelmi v podobe videí. Keďže 3D modelovanie foriem georeliéfu je súčasťou mojej bakalárskej práce, plánujem postupne zvyšovať ich počet a následne ich sprístupniť s cieľom prispieť k skvalitneniu procesu výučby geomorfológie.

Pod'akovanie

Rada by som poďakovala RNDr. Márii Bizubovej za odborné vedenie a koordináciu, Mgr. Michalovi Veselskému a Mgr. Liborovi Burianovi za cenné konzultácie a tiež mojim známym za poskytnutie niektorých fotografií.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Učebné texty z geomorfológie [Citované: 8. marec 2013]
<<http://www.fns.uniba.sk/index.php?id=3652>>
- [2] Geomorfologické podmienky a činitele, procesy a formy [Citované: 8. marec 2013]
<<http://www.fns.uniba.sk/index.php?id=3652>>
- [3] Digitální atlas geomorfologických forem Plzeňského kraje [Citované: 8. marec 2013]
<http://www.pef.zcu.cz/pef/kge/geom_atlas/index.htm>
- [4] Geomorphology atlas for Google Earth [Citované: 8. marec 2013]
<<http://bbs.keyhole.com/ubb/ubbthreads.php?ubb=showflat&Number=1306232>>
- [5] Mapový portál Hiking.sk [Citované: 8. marec 2013]
<<http://mapy.hiking.sk/?ref=navigator>>
- [6] Hole-filled SRTM for the globe Version 4 [Citované: 8. marec 2013]
<<http://srtm.csi.cgiar.org>>

Mentálne a konceptuálne mapovanie ako nástroj kvalitatívneho výskumu v nižšom sekundárnom vzdelávaní s aplikáciou na tému „Voda“

Martin Šponiar, Katarína Javorová

Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra didaktiky prírodných vied, psychológie a pedagogiky, Mlynská dolina, 842 15, Bratislava 4, Slovenská republika; sponiar@fns.uniba.sk; javorova@fns.uniba.sk

Abstrakt

This paper describes how mindmapping methods and instruments can support learning of natural sciences on the lower secondary education. They also help to reveal hidden misconceptions in understanding complex problems. According to several researches children do not understand the waters' significant role in life and their picture is often incomplete. Our research focuses on identification basic misconceptions in understanding the general topic - water.

Kľúčové slová: *mentálne mapovanie; konceptuálne mapovanie; voda; miskoncepce*

Úvod a formulácia cieľa

Zvýšená komplexnosť poznatkov, záplava informácií a ich celosvetová dostupnosť sťažujú učenie sa žiakov a ich mentálne kapacity sú značne preťažené. Narastá potreba hľadať nástroje externej organizácie a reprezentácie, ktoré uľahčia vyhľadanie informácií, ich elaboráciu a formulovanie koherentných argumentov vo výstupe [1]. Kognitívne nástroje, resp. nástroje kognitívneho mapovania podporujú uvedené kognitívne funkcie a zároveň slúžia aj ako prostriedok kvalitatívneho výskumu pri odhaľovaní žiackych konceptov a miskonceptí [2]. Vychádzajú z konštruktivismu, pričom predpokladajú, že žiaci si v priebehu učenia tvoria vlastný „konštrukt“ [3], ktorý niekedy nezodpovedá objektívnej realite.

Viacere výskumy dokázali, že žiaci nechápu tému „Voda“ v širších kontextoch a plne nerozumejú jej významu v prírode a živote človeka [4, 5, 6]. Komplexnosť témy „Voda“ v učive prírodovedných predmetov v nižšom sekundárnom vzdelávaní potvrdzujú aj dokumenty ŠVP - ISCED 2 [7, 8, 9, 10]. Vhodným spôsobom ako riešiť a odhaľovať nedostatky v žiackych konceptoch je použiť kognitívne nástroje pre podporu rozvoja komplexného vnímania problematiky témy „Voda“.

Myšlienkové (al. mentálne) mapy predstavujú obrazce, ktoré znázorňujú súvisiace slová, nápady, úlohy alebo iné námety usporiadané radiálne okolo **centrálnej myšlienky**. Účel ich využitia je v generovaní, vizualizácii, štruktúrovaní, klasifikácii nápadov a ako pomôcka pri štúdiu, organizácii a riešení problémov, rozhodovaní a písaní [11]. Myšlienkové mapy sú originálnym výtvorom autora – žiaka, pričom sa kladie dôraz na kreatívne farebné

spracovanie a použitie obrázkov.

Podobnú funkciu plnia aj konceptuálne mapy [12, 13], ktoré kladú dôraz na štrukturálnu reprezentáciu konceptov a korelácií. Vzťahy medzi individuálnymi konceptmi sú vyjadrené pomocou šípok a čiar [14].

Cieľom práce je informovať o príklade konkrétnej aplikácie mentálneho a konceptuálneho mapovania ako nástroja vyučovania a nástroja kvalitatívneho výskumu v nižšom sekundárnom vzdelávaní. Uvedený nástroj analyzuje výstupy žiackych prác a identifikuje chyby v žiackych konceptoch. V závere poukazujeme na možnosť použitia softvérov na tvorbu mentálnych máp ako možnej alternatíve k popísanej metóde.

Materiál a metóda

Skúmaným materiálom bolo 15 myšlienkových máp, ktoré pripravilo 29 žiakov dvoch tried sekundy rozdelených do homogénnych skupín (dvojice, trojice, príp. jednotlivci). Úlohou žiakov bolo pracovať s poskytnutým textom zaoberajúcim sa témou voda [15]. V texte mali identifikovať dôležité pojmy a informácie, ktoré mali následne spracovať do myšlienkovvej (mentálnej) mapy. Uvedenej aktivite predchádzalo prebratie tematického celku „Voda“, ktorého súčasťou bolo napr. aj laboratórne cvičenie zamerané na vlastnosti vody a obsah vody vo vybraných látkach. V rámci preberanej témy mali žiaci za úlohu napísať aj úvahu na tému: Čo pre mňa znamená voda?

Z uvedeného dôvodu sa zadanie aktivity neobmedzovalo iba na prácu s informáciami uvedenými v poskytnutom texte [15] ale úlohou žiakov bolo včleniť do myšlienkovvej mapy aj informácie, ktoré získali na vyučovaní, a zároveň informácie z dostupných printových a elektronických zdrojov, či vlastných skúseností. Pri čerpaní zo zdrojov neboli kladené žiadne obmedzenia. Súčasťou aktivity bola okrem prípravy myšlienkovvej mapy aj jej prezentácia v rámci triedy s následnou diskusiou a hodnotením.

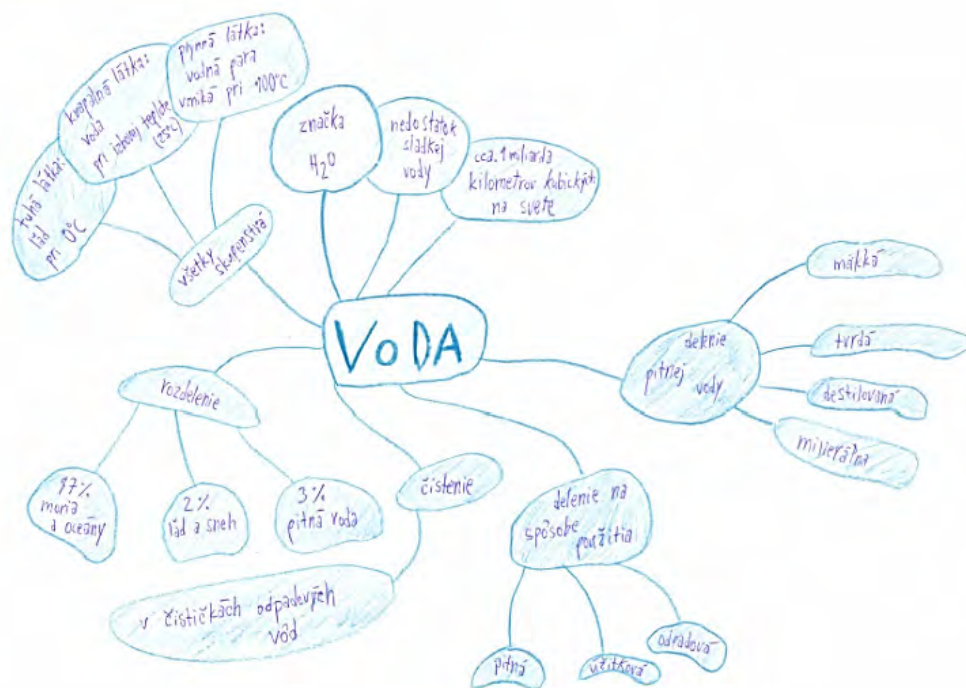
Pri analýze žiackych prác sme venovali pozornosť komplexnosti spracovania danej témy (korešpondovanie s prebratým učivom, použitie informácií z iných zdrojov, širšie asociácie) a formálnej stránke myšlienkových máp (správne hierarchické usporiadanie pojmov, využitie obrázkov a schém). Predpokladali sme aj možný výskyt miskoncepcií a faktických chýb v myšlienkových mapách, venovali sme im preto zvýšenú pozornosť.

Výsledky a diskusia

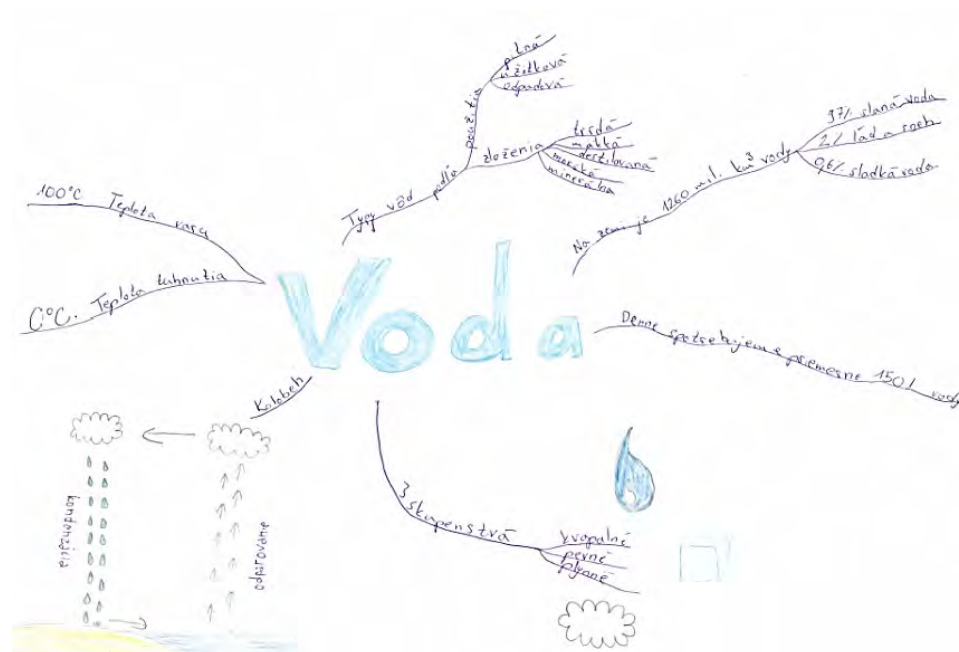
Na obrázkoch 1 – 3 sú zobrazené vybrané myšlienkové mapy žiakov, ktoré sú výstupom z vyššie popísanej aktivity:



Obr. 1 – Myšlienková mapa 1



Obr. 2 – Myšlienková mapa 2



Obr. 3 – Myšlienková mapa 3

Z analýzy žiackych prác vyplynulo niekoľko záverov:

1. Pri tvorbe myšlienkových máp k téme „Voda“ sa žiaci vo viacerých prípadoch obmedzili iba na informácie z poskytnutého textu. Vedomosti získané na vyučovaní, resp. informácie ktoré mali čerpať z printových alebo elektronických zdrojov neboli v ich myšlienkových mapách zapracované.
2. Napriek tomu, že žiaci boli dostatočne informovaní o formálnej stránke spracovania myšlienkového mapy (centrálny pojem, radiálne usporiadané pojmy, spájanie pojmov čiarami, atď.), sa v šiestich prípadoch odklonili k „projektovej“ forme spracovania témy (chýba myšlienková mapa), čo sťažilo identifikáciu žiackych konceptov.
3. Identifikovali sme malý počet faktografických chýb, napr. bod mrazu alebo bod tuhnutia miesto správnej formulácie: teplota topenia a teplota tuhnutia.
4. Z hľadiska kreatívneho prístupu žiakov k tvorbe myšlienkového mapy vystúpilo do popredia najmä farebné spracovanie – farebné odlíšenie jednotlivých vetiev, zobrazenie kolobehu vody v prírode a napr. vtipné asociovanie sladkej vody s cukorničkou. Vo viacerých prípadoch je zrejmé, že myšlienková mapa stimulovala u žiakov širšie asociácie k téme „Voda“.
5. Potvrdil sa predpoklad, že myšlienkové mapy pomáhajú odhaliť žiacke miskoncepce. Z nich za najdôležitejšie považujeme:
 - a. Vodná para vzniká iba pri 100 °C.
 - b. Ak je voda v kvapalnom stave, molekuly sa dotýkajú.

- c. Dážď a voda v potokoch sú označené ako nepitná voda.
- d. V žiackych konceptoch často nie sú uvedené fyzikálno-chemické vlastnosti vody.
- e. Formálne nesprávne spájanie jednotlivých konceptov čiarami, resp. nesprávne úrovne delenia konceptov (delenie vôd podľa použitia – pitná, úžitková, odpadová - nezaradenie typov pitných vôd k predošlej úrovni).

Z prezentácie žiackych prác a následnej diskusie sa potvrdili uvedené miskoncepce, na ktoré boli žiaci upozornení a došlo k ich poopraveniu.

Je potrebné podotknúť, že vzhľadom na šírku záberu témy „Voda“, nie je na mieste požadovať od žiakov hlbšie vniknutie do problematiky. Nimi zostavené myšlienkové mapy idú takpovediac „po povrchu“ a odhaľujú iba najvypuklejšie miskoncepce. Vzhľadom na to, že sa jedná o žiakov sekundy však môžeme konštatovať, že úlohu zvládli na požadovanej úrovni. Pri odhaľovaní miskonceptí v užších oblastiach (napr. úloha vody pre život, čistenie vody, pitná voda a pod.), bude potrebné upraviť zadanie a zdôrazniť aj formálnu stránku tvorby myšlienkových máp.

Záver

Myšlienkové a konceptuálne mapovanie je osvedčeným nástrojom vyučovania ale aj kvalitatívneho výskumu, ktoré umožňujú odhaliť žiacke miskoncepce. Úlohou žiakov po prebratí tematického celku „Voda“ bolo zostrojiť myšlienkovú mapu, pričom neboli kladené obmedzenia v čerpaní informácií. Napriek široko formulovanému zadaniu boli odhalené viaceré chyby v konceptoch.

Iné (skryté) miskoncepce je možné v ďalšom výskume identifikovať pomocou špeciálnych softvérov alebo webových aplikácií, napr. Freemind [16], iMindmap [17], Text2mindmap [18], zameraných na mentálne mapovanie. Umožňujú interaktívnu tvorbu myšlienkových máp, do ktorých môžu žiaci vkladať obrázky, videá, dokumenty a hyperlinky.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Mind Mapping for Fostering Self-Regulated Resource-Based Learning in Science Classes. [Citované: 25. február 2013.]

<<http://www.iwm->

[kmrc.de/workshops/visual_artifacts/downloads/abstracts/visart_all_abstracts.pdf](http://www.iwm-kmrc.de/workshops/visual_artifacts/downloads/abstracts/visart_all_abstracts.pdf)>

- [2] What are cognitive tools? [Citované: 14. február 2013.]

<<http://tecfa.unige.ch/tecfa/maltp/cofor-1/textes/jonassen92.html>>

- [3] Hendry G.D., King R.C. (1994) Inc. Sci Ed 78(3), p. 223
- [4] Ben-Zvi-Assarf O., Orion N. (2005) JGE 53(4), p. 366
- [5] Sheparadson D. P. (2007) Inc. Sci Ed 91(4), p. 554
- [6] Havu-Nuutinen S., Kärkkäinen S. Keinonen T. (2011) IJESE (6), p. 321
- [7] ISCED 2 Biológia [Citované: 17. február 2012]
<https://www.iedu.sk/vyucovanie_a_studium/vyucovacie_predmety/xKatalog_Dokumenty/Biol%C3%B3gia%20ISCED%202.pdf>
- [8] ISCED 2 Chémia [Citované: 17. február 2012]
<https://www.iedu.sk/vyucovanie_a_studium/vyucovacie_predmety/xKatalog_Dokumenty/Ch%C3%A9mia%20ISCED%202.pdf>
- [9] ISCED 2 Fyzika [Citované: 17. február 2012]
<https://www.iedu.sk/vyucovanie_a_studium/vyucovacie_predmety/xKatalog_Dokumenty/Fyzika%20ISCED%202.pdf>
- [10] ISCED 2 Geografia [Citované: 17. február 2012]
<https://www.iedu.sk/vyucovanie_a_studium/vyucovacie_predmety/xKatalog_Dokumenty/Geografia%20ISCED%202.pdf>
- [11] Buzan, T. (2007) Mentální mapování. Portál, Praha, p. 168.
- [12] Nowak J. D., Gowin J. B. (1984) Learning how to learn. Cambridge University press, Cambridge, p. 216.
- [13] McDaniel E., Roth B. a Mille M. (2005) Issues in Informing science and information technology - Concept mapping as a tool for Curriculum quality (2) p. 505
- [14] Tergan S. (2005) Handbuch lernstrategien - Wissensmanagement mit Concept Maps. Hogrefie, Göttingen, p. 54
- [15] SPP a SAŽP (2007) Domáci ekológ - pracovné listy pre základné školy – Voda. CEVAP SAŽP, Bratislava, p. 2
- [16] Text2mindmap [Citované: 7. marec 2013]
<<http://www.text2mindmap.com>>
- [17] ThinkBuzan [Citované: 7. Marec2013] <<http://www.thinkbuzan.com/sk/>>
- [18] Free Mind [Citované: 7. Marec2013]
<http://freemind.sourceforge.net/wiki/index.php/Main_Page>

Projektové vyučovanie k téme „Srdcovo-cievne (kardiovaskulárne) ochorenia“

Petra Tomčalová

*Katedra didaktiky prírodných vied, psychológie a pedagogiky, Prírodovedecká fakulta,
Univerzita Komenského, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
petra.tomcalov@gmail.com*

Abstrakt

In present age of modern technology and preference of foreign languages decreases the pupils interest in natural sciences and also biology. My experience mainly from pedagogical practice confirmed that pupils consider biology as an interesting subject, but found it difficult because of quantity of information and imagination. Pupils generally are not capable of processing amount of information, reveal relationships between individual biological concepts and processes, imagine how these processes and events run in organisms. Therefore it is suitable to use methods, which help pupils work actively and with help of the teacher participate on knowledge creation, searching, sorting, interpreting and presenting it. One of the suitable methods, which allows this is project education. The goal of this paper is to point out the possibilities of use of this conception in biology teaching, which gives space of application of knowledge and independent pupils work.

Kľúčové slová: projektové vyučovanie; ŠVP z biológie; kardiovaskulárne ochorenia

Úvod a formulácia cieľa

Nový školský zákon, Zákon 245/2008 Z. z. o výchove a vzdelávaní odštartoval školskú reformu na Slovensku. To bol začiatok komplexného a systematického riešenia dlhodobo nahromadených problémov, ktoré si stav slovenského školstva neodkladne vyžadoval [1]. Reforma znamená zmeny nie len pre samotné školy, ale i učiteľov, žiakov a rodičov. Mnohí žiaci sa dokážu učivo naučiť, ale nedokážu pochopiť jeho podstatu, prepojiť jednotlivé témy, jednoducho sa učivo „nabíflia“. Preto jedným z cieľov školskej reformy je do vyučovania zaradiť tvorivé metódy, ktoré by vyučovanie urobili originálnejším, zaujímavejším a zabránili by drilovému učeniu žiakov [2]. Jednou z možností riešenia je do vyučovania zaradiť projektové vyučovanie.

Projektové vyučovanie ako pedagogická kategória je z pohľadu mnohých autorov chápané nejednotne. Všeobecne sa označuje ako vyučovacia metóda, koncepcia, niekedy aj ako forma vyučovania. V zásade sa však všetci autori stotožňujú s tvrdením, že ide o súbor metód a vyučovacích postupov, ktorých cieľom je zapojiť žiakov aktívne do tvorby, spracovania, hodnotenia a prezentácie poznatkov. Tým ich motivovať, aktivizovať, podporiť samostatnosť a chuť dozvedieť sa stále niečo nové, a tak prirodzene uplatňovať aj prvky konštruktivizmu vo vyučovaní. Projektové vyučovanie umožňuje optimálne naplňať práve tieto ciele vyučovania biológie. Práve preto sú mnohé témy biologického učiva už v ŠVP

odporúčané pre výučbu projektovým vyučovaním. Takým učivom je aj tematický celok „Zdravý životný štýl“, z ktorého sme na projektové spracovanie vybrali tému: „*Srdcovo-cievne (kardiovaskulárne) ochorenia*“.

Vybrané učivo je podľa ISCED3 určené žiakom 3. roč. štvorročných gymnázií a septímy. Vzhľadom na to, že v súčasnosti sú tieto ochorenia primárnou príčinou úmrtí nielen v SR, ale napr. aj v USA, sme považovali výber témy za optimálny. Naším cieľom bolo nastaviť projekt tak, aby sme zdôraznili nevyhnutnosť prevencie pred kardiovaskulárnymi ochoreniami a chorobami obehovej sústavy. Poukázať na ich nebezpečenstvo, rizikové faktory, možnosti prevencie a liečby. Pozornosť sme zamerali predovšetkým na rizikové faktory nasledovných ochorení: *hypertenzie, infarktu myokardu, aterosklerózy a varixov*.

Cieľom bolo zostaviť didaktický manuál, prostredníctvom ktorého by učitelia biológie mohli projektovo sprístupniť tému „*Srdcovo-cievne (kardiovaskulárne) ochorenia*“. Nami zostavený didaktický manuál má byť pre učiteľa biológie „metodickým postupom“, podľa ktorého si môžu vyskladať svoju vlastnú predstavu realizácie projektového vyučovania vzhľadom na špecifické podmienky školy a možnosti žiakov.

Materiál a metódy

Z metód sme pri tvorbe manuálu využili najmä analýzu odborného textu a tvorbu didaktického manuálu. Na to, aby sme manuál mohli zostaviť bolo potrebné najskôr analyzovať školské dokumenty, predovšetkým ŠVP - ISCED 3A/3.ročník pre predmet biológia, pedagogickú a odbornú literatúru. Následne sme vytvorili štruktúru projektu, pracovné listy, interaktívne úlohy a vybrali vhodné úlohy vo vzdelávacom portáli www.naucteviac.sk. Pri tvorbe interaktívnych úloh sme využili programy *Hotpotatoes*, *SmardBoard Software* a *ActivInspire*.

Výsledky a diskusia

Výsledkom našej práce je didaktický manuál, ktorý obsahuje modelovo spracované prípravy na hodinu a prílohy tvorené pracovnými listami, zadaniami praktických úloh a edukačné CD s interaktívnymi úlohami a prezentáciami v aplikácii *MS PowerPoint*. Vytvorený didaktický manuál je pre učiteľa metodickou príručkou, zdroj inšpirácií ako sa pripraviť na hodinu k téme „*Srdcovo-cievne (kardiovaskulárne) ochorenia*“ využitím metód a postupov projektového vyučovania. Manuál je určený pre učiteľov biológie 3. ročníka štvorročných gymnázií a 7. ročníka osemročných gymnázií.

Ťažiskom projektu sú nami vytvorené aktivity, úlohy a cvičenia, ktoré sú zostavené tak, aby ich bolo možné využiť v každej fáze vyučovacieho procesu. Najčastejšie na začiatku hodiny v rámci motivácie, pri sprístupňovaní učiva počas expozície alebo na záver hodiny ako prostriedok fixácie. Zámerom bolo, aby cvičenia boli pre žiakov pútavé, preto sú zostavené prevažne formou didaktických hier. Majú teda aktivizačný charakter, zároveň spĺňajú aj didaktickú a edukačnú funkciu. Hravú formu majú najmä cvičenia určené pre prácu s interaktívnou tabuľou a cvičenia vybrané na vzdelávacom portáli *Planéta vedomostí* - www.naucteviac.sk.

Digitálne technológie sú dnes už samozrejmom súčasťou života mladých ľudí, preto je pre žiakov prirodzené pracovať s nimi aj v škole, naučiť sa využívať ich cielene a zmysluplne.

Prehľad vytvorených interaktívnych úloh:

Interaktívna úloha č. 1: Anatomická stavba srdca

Interaktívna úloha č. 2: Magický tunel 1

Interaktívna úloha č. 3: Magický tunel 2

Interaktívna úloha č. 4: Hypertenzia

Interaktívna úloha č. 5: Rizikové faktory infarktu myokardu

Interaktívna úloha č. 6: Infarkt myokard

Interaktívna úloha č. 7: Ateroskleróza a fajčenie

Interaktívna úloha č. 8: Ochorenia z fajčenia

Obr. 1 Ukážka interaktívnej úlohy vytvorenej v programe Hotpotatoes

Ochorenia		Kardiovaskulárne ochorenia
Rakovina	Srdcová ischémia	
Angína	Bradykardia	
Tachykardia	Angina pectoris	Psoriáza
Nádecha	Infarkt myokardu	Syfilis
Arytmie	Varixy	AIDS
Leukémia	Cukrovka	Chríпка
Tuberkulóza	Týfus	Hypertenzia
Anémia	Ateroskleróza	

Obr. 2 Ukážka interaktívnej úlohy vytvorenej v programe SmardBoard Software – Magický tunel

Nástrojom aktivizácie a samostatnej práce žiakov boli okrem vytvorených interaktívnych úloh aj klasické pracovné listy vo vzdelávacom prostredí *Hot potatoes*, *ActivInspire* a *Smart Board Software*. Tematicky sme sa zamerali najmä na rizikové faktory *srdcovo-cievnych (kardiovaskulárnych) ochorení* ako sú obezita, nesprávna životospráva, nezdravý životný štýl, alkoholizmus, fajčenie. Pre každú tému projektu sme vytvorili viacero pracovných listov. Učiteľ ich môže využiť v ktorejkoľvek fáze vyučovacieho procesu, môže nimi žiakov motivovať, aktivizovať alebo preveriť ich pozornosť v práci s textom. Je dôležité, aby žiaci vedeli nie len reprodukovat' to čo čítali, ale aby bezprostredne po prečítaní dokázali odpovedať na otázky, ktorých odpovede vyplývajú z textu a pri ktorých musia aj rozmýšľať, pochopiť príčiny procesov a javov a spájať pojmy do vzájomných vzťahov.

Prehľad vytvorených pracovných listov v prílohe:

Pracovný list č.1: Zahrajme sa na lekára

Pracovný list č. 2: Kardiovaskulárne ochorenia

Pracovný list č. 3A: Hypertenzia a obezita

Pracovný list č. 3B: Hypertenzia a obezita

Pracovný list č. 4: Ateroskleróza a fajčenie

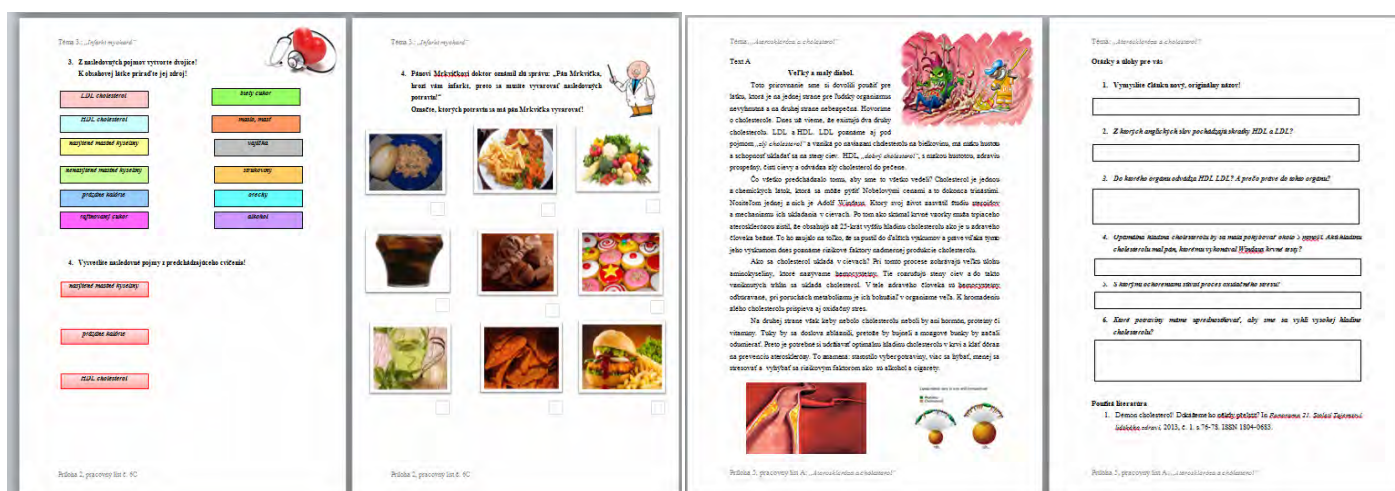
Pracovný list č. 5A: Ateroskleróza a cholesterol

Pracovný list č. 5B: Ateroskleróza a fajčenie

Pracovný list č. 6A: Srdce a rizikové faktory kardiovaskulárnych ochorení

Pracovný list č. 6B: Hypertenzia

Pracovný list č. 6C: Infarkt myokard



Obr. 3 Ukážka pracovného listu

Obr. 4 Ukážka pracovného listu – práca s textom

Keďže cieľom projektového vyučovania je u žiakov podporovať samostatnosť, iniciatívnosť a rozvíjať nie len vedomosti, ale i zručnosti a schopnosti, zahrnuli sme do didaktického manuálu aj zadania praktických úloh. Praktické úlohy sú určené pre skupinovú prácu v mimoškolskom prostredí. Pri týchto úlohách musia žiaci formulovať hypotézy, realizovať merania, porovnať výsledky meraní s hypotézami, vyvodiť záver, svoju prácu prezentovať a obhájiť.

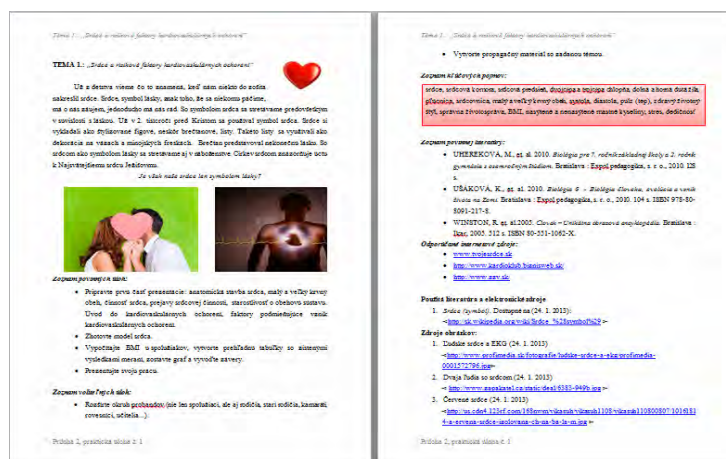
Prehľad zadaní praktických úloh:

Praktická úloha č. 1: Srdce a rizikové faktory kardiovaskulárnych ochorení

Praktická úloha č. 2: Hypertenzia

Praktická úloha č. 3: Infarkt myokard

Praktická úloha č. 4: Ateroskleróza a varixy



Obr. 5 Ukážka zadania praktickej úlohy

Súčasťou prílohy sú aj vytvorené prezentácie, ktoré majú motivačný charakter. Učiteľ môže nimi žiakov motivovať k záujmu o tému, vyvolať „hľad“ po ďalších informáciách, vyvolať riadenú diskusiu, potvrdiť predpoklady a hypotézy (rozvíjanie metakognície).

Vytvorený didaktický manuál je veľmi rôznorodý. Nemusí byť využitý len pri projektovom vyučovaní. Jednotlivé časti je vhodné použiť aj počas bežnej vyučovacej hodiny. Úlohami učiteľ v rôznej miere rozvíja takmer všetky kľúčové kompetencie.

Záver

Projektové vyučovanie je koncepciou vyučovania, ktorá je súborom mnohých vyučovacích metód rozvíjajúcich nielen vedomosti, ale aj osobnosť žiakov. Pre žiaka prináša predovšetkým pozitíva. Rozvíja vedomosti, schopnosti, zručnosti, samostatnosť, kreativitu

a najmä vedie žiaka k zodpovednosti za vlastnú prácu. Na druhej strane pre učiteľa je to náročný terén, pretože na projektové vyučovanie musí sám vytvoriť vhodné podmienky, zvoliť ústrednú tému, naplánovať úlohy, aktivity a tiež spôsob hodnotenia žiakov. Všetko musí dôsledne naplánovať a premyslieť, čo pre učiteľa znamená obetovať veľa času [4]. Lenže dobrý učiteľ by mal mať na pamäti, že je tu pre žiakov a jeho úlohou je im poskytnúť vzdelanie potrebné do ďalšieho života. Preto je projektové vyučovanie vhodnou voľbou pre učiteľov, ktorí chcú žiakov niečo naučiť nie len na chvíľu, ale na celý život.

PodĎakovanie

Touto cestou by som sa chcela poďakovať doc. RNDr. Kataríne Ušákovej, PhD. za odborné vedenie, rady, návrhy, usmerňovanie a pomoc pri písaní diplomovej práce a zostavovaní didaktického manuálu.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Zelina M. (2008) *Pedagogické rozhľady* 17(3), p. 1
- [2] Šimková Z. (2009) *Technológia vzdelávania*, 17 (5), p. 14
- [3] Petlák E. (2007) *Technológia vzdelávania* 15(9), p. 10
- [4] Valenta J., Kasíková H. a kol. (1993) *Pohľady: projektová metóda ve škole a za školou*, IPOS ARTAMA, Praha p. 64
- [5] Planéta vedomostí: [Citované 7. Február 2013] <www.naucteviac.sk>
- [6] Manuál: *Hot potatoes* [Citované 7. Február 2013]
< <http://pastelka.sk/manualy/HPmanual.pdf> >

Kompetencie prírodovednej gramotnosti v komplexných učebných úlohách z chémie

Zuzana Vasilová

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra didaktiky prírodných vied, psychológie a pedagogiky, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
vasilova@fns.uniba.sk*

Abstrakt

As a means that it can make a diagnosis and develop scientific literacy so we chose complex tasks. The paper offers insight on how to deal with primary school pupils as part of our pre-research complex tasks created us. We focused on subtasks requiring proof of any of the three described scientific literacy skills and differences in individual years.

KLúčové slová: prírodovedná gramotnosť; komplexné úlohy; kompetencie prírodovednej gramotnosti

Úvod a formulácia cieľa

Prírodovedná gramotnosť je v dnešnej dobe nevyhnutnou súčasťou každého prírodovedného vzdelávania [1, 2]. Predpokladá sa, že prírodovedne gramotní občania budú vedieť v škole nadobudnuté poznatky či zručnosti z prírodných vied aplikovať vo svojom každodennom živote a zároveň sa rýchlo zaradiť a adaptovať v spoločnosti. Nejde teda len o reprodukciu naučených poznatkov, ale hlavne o ich aktívne využitie pri riešení konkrétnej životnej situácie. Pre žiakov majú pre život význam práve tie vedomosti a zručnosti, ktoré vedia preniesť z teoretickej roviny do praktických situácií a využiť k ich riešeniu [3]. Inšpirujúc sa medzinárodným výskumom OECD PISA, ktorý je zameraný práve na zisťovanie úrovne prírodovednej gramotnosti žiakov končiacich povinnú školskú dochádzku, sme sa rozhodli venovať svoju pozornosť práve nájdeniu a vytvoreniu takého prostriedku, ktorý by bol ľahko použiteľný na našich školách a dopomohol by k rozvoju prírodovednej gramotnosti.

Za vhodný a použiteľný prostriedok na diagnostikovanie a rozvíjanie prírodovednej gramotnosti považujeme komplexné úlohy, ktorým sa venujeme aj v našej práci. Komplexná úloha predstavuje súbor čiastkových úloh obvykle rôzneho typu, ktoré sa zaoberajú jednou témou. Takéto úlohy väčšinou uvádza viac či menej rozsiahly text, graf, obrázok alebo iný písomný materiál, ku ktorému sa úlohy vzťahujú. Charakteristické je pre nich to, že postavia žiakov pred konkrétnu životnú situáciu a v rámci riešenia tejto situácie musí žiak aplikovať viacero operácií [4]. V českej didaktike sú tieto úlohy známe ako multikomponentné úlohy a

ich riešenie môže u žiakov nielen podporovať záujem o štúdium prírodných vied, ale tiež vytvárať predpoklady pre postupné zlepšenie ich výsledkov v medzinárodných porovnávacích výskumoch, ako je *PISA* a *TIMSS* [5].

V nasledujúcom príspevku ponúkame pohľad na to ako sa v niekoľkých nami vytvorených komplexných úlohách z chémie prejavujú kompetencie prírodovednej gramotnosti.

Materiál a metódy

Vo vykonanom predvýskume sme použili 5 nami vytvorených komplexných úloh z chémie zameraných na rozvoj a diagnostikovanie čitateľskej a prírodovednej gramotnosti. Vzhľadom na to, že prírodovedná gramotnosť zahŕňa aj využitie informácií a vyžaduje si istú úroveň čitateľskej gramotnosti [6], sú niektoré čiastkové úlohy zamerané aj na rozvíjanie čitateľskej gramotnosti. V našej analýze sa však zameriavame na prejavy kompetencií prírodovednej gramotnosti, preto sa čitateľskou gramotnosťou zaoberať nebudeme.

Predvýskumu sa zúčastnilo 132 žiakov základnej školy, z každého ročníka sme z dostupnej vzorky náhodne vybrali 33 žiakov. Žiaci postupne na hodinách chémie v priebehu februára až júna 2012 riešili nami vytvorené úlohy komplexného charakteru. V rámci predvýskumu sme sledovali tri skupiny kompetencií prírodovednej gramotnosti. Každá čiastková úloha vyžadovala od žiakov preukázanie ovládania konkrétnej činnosti patriacej do jednej z týchto troch základných skupín kompetencií prírodovednej gramotnosti a prehľad uvádzame v tabuľke 1. Pri analýze sme použili kvalitatívno-kvantitatívnu analýzu, kde sme určovali priemernú relatívnu úspešnosť riešenia jednotlivých čiastkových úloh každej úlohy. Následne sme pomocou kvalitatívnej analýzy rozobrali jednotlivé čiastkové úlohy a odpovede vzhľadom na kompetencie prírodovednej gramotnosti.

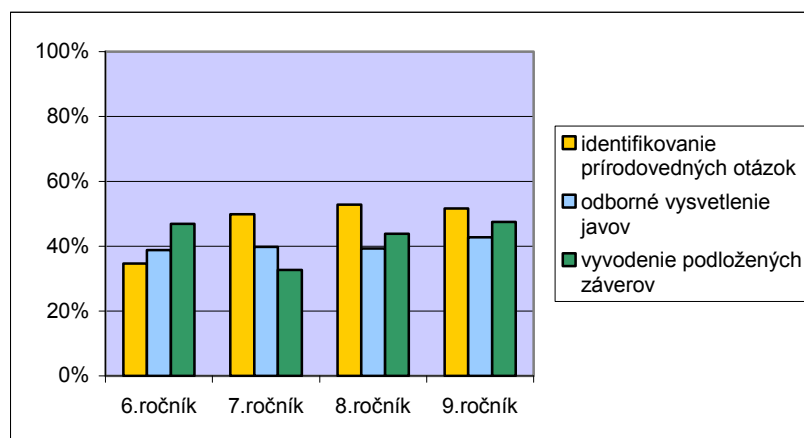
Tab. 1 Prehľad kompetencií prírodovednej gramotnosti v jednotlivých úlohách

	identifikovanie prírodovedných otázok	odborné vysvetlenie javov	vyvodenie podložených záverov
Benzín		čiasťková úloha 4	čiasťková úloha 2 - 3. tvrdenie
			čiasťková úloha 3 - 5. tvrdenie
Fotosyntéza			čiasťková úloha 3
			čiasťková úloha 4 - 3. tvrdenie
Hasiace prístroje	čiasťková úloha 2 - vysvetlenie	čiasťková úloha 4 - vysvetlenie	
	čiasťková úloha 3		
Morská kozmetika		čiasťková úloha 2 - 5. tvrdenie	čiasťková úloha 2 - 2. tvrdenie
		čiasťková úloha 3 - vysvetlenie	
Prečo pôdne rozbery	čiasťková úloha 4 - 3. tvrdenie	čiasťková úloha 5	čiasťková úloha 3 - vysvetlenie

Výsledky a diskusia

V jednotlivých ročníkoch dosiahli žiaci celkovo rozdielnu úspešnosť riešenia v rámci prírodovednej gramotnosti. V dvoch nižších ročníkoch sa pohybovala okolo 40 % (šiestaci 42 %, siedmci 45 %) a v dvoch vyšších bola úspešnosť riešenia lepšia asi o 10 % (ôsmaci 52 % a deviataci 53 %). Nás v analýze konkrétne zaujímalo, ktorá skupina kompetencií robila žiakom v jednotlivých ročníkoch najväčšie problémy.

Ako vidieť na obrázku 1, žiaci šiesteho ročníka dosiahli najnižšiu úspešnosť riešenia v čiasťkových úlohách vyžadujúcich pri riešení preukázanie kompetencie identifikovanie prírodovedných otázok – mali iba 27 %-nú úspešnosť riešenia.

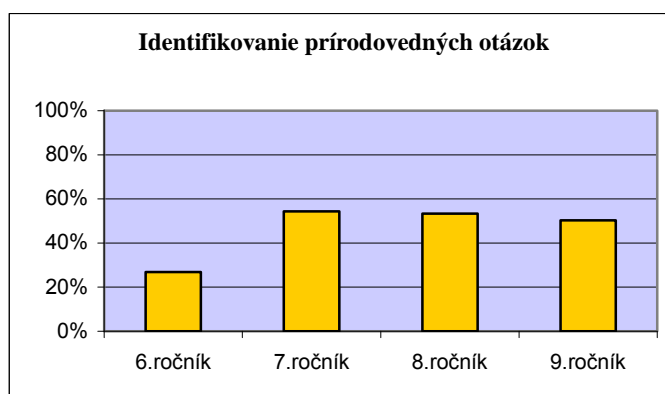


Obr. 1 Porovnanie priemernej relatívnej úspešnosti riešenia v jednotlivých ročníkoch v rámci troch skupín kompetencií prírodovednej gramotnosti

Siedmici mali najväčšie problémy pri kompetencii vyvodenie podložených záverov a ôsmaci a deviataci pri kompetencii odborné vysvetlenie javov.

Identifikovanie prírodovedných otázok

Kompetencia identifikovanie prírodovedných otázok zahŕňa v sebe činnosti zamerané na pochopenie prírodovedných tém, identifikovanie, vyhľadávanie a pochopenie prírodovedných informácií. Ako vidieť na obr. 2 najviac v tejto kompetencii majú najväčšie problémy žiaci šiesteho ročníka.



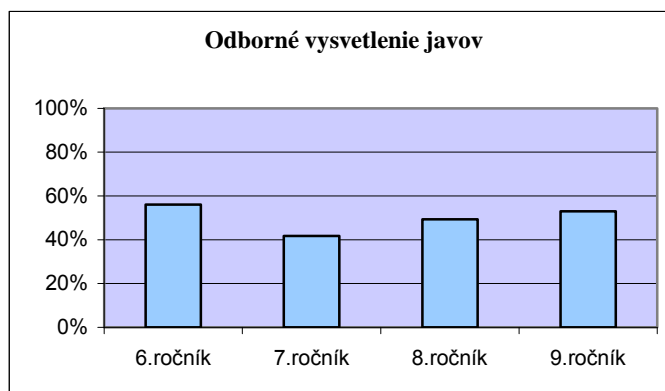
Obr. 2 Porovnanie priemernej relatívnej úspešnosti riešenia v jednotlivých ročníkoch v rámci kompetencie identifikovanie prírodovedných otázok

V súvislosti s tým mali šiestaci najväčšie problémy s čiastkovou úlohou, kde sa od nich vyžadovalo aby správne identifikovali pojem pri hľadaní informácie v súvislosti s prírodnými vedami – v tomto prípade dosiahli len 6 %-nú úspešnosť riešenia. Taktiež mali problém so správnym identifikovaním javu, ktorý možno skúmať pomocou spomenutého a v texte popísaného vedeckého prostriedku.

Odborné vysvetlenie javov

Kompetencia odborné vysvetlenie javov v sebe zahŕňa činnosti spojené s využívaním prírodovedných poznatkov v konkrétnej situácii, vysvetľovaním javov pomocou prírodných vied či správnou interpretáciou odborných popisov.

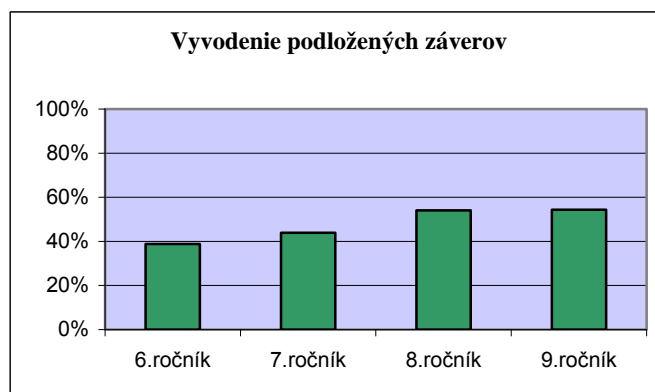
Ako vidieť na obr. 3, v rámci tejto kompetencie boli najhorší žiaci siedmeho ročníka, ktorí mali problémy hlavne s čiastkovými úlohami vyžadujúcimi správnou interpretáciu chemického deja.



Obr. 3 Porovnanie priemernej relatívnej úspešnosti riešenia v jednotlivých ročníkoch v rámci kompetencie odborné vysvetlenie javov

Vyvodenie podložených záverov

V rámci tejto kompetencie vyvodenie podložených záverov sa od žiakov vyžaduje aby správne použili vedecké fakty, identifikovali predpoklady vedúce k určitému záveru, či argumentovali a vyvodzovali závery na základe vedeckých dôkazov.



Obr. 4 Porovnanie priemernej relatívnej úspešnosti riešenia v jednotlivých ročníkoch v rámci kompetencie vyvodenie podložených záverov

Na obr. 4 môžeme vidieť ako sa úspešnosť riešenia čiastkových úloh v rámci tejto kompetencie postupne zvyšuje s pribúdajúcim ročníkom. Šiestaci mali opäť najviac problémov s čiastkovou úlohou, kde mali využitím prírodovedných poznatkov správne vyvodit' určitý záver – len 3 %-ná úspešnosť riešenia. Tiež spolu so siedmakmi mali značné ťažkosti, ak mali interpretovať vedecké fakty vedúce ku konkrétnemu v texte popísanému záveru (šiestaci – 3 %-ná úspešnosť riešenia, siedmaci 6 %-ná).

Záver

Je zrejmé, že mnohé rozdiely vzniknuté pri riešení jednotlivých úloh v rámci kompetencií prírodovednej gramotnosti súvisia s vekom či skúsenosťami žiakov, ktoré majú z hodín prírodovedných predmetov. Celkovo však môžeme konštatovať, že aj žiaci nižších ročníkov sú schopní správne používať kompetencie prírodovednej gramotnosti v rámci konkrétnych situácií popísaných napríklad v nami používaných komplexných úlohách. V posledných rokoch je rozvíjanie prírodovednej gramotnosti novým trendom aj v rámci vyučovania prírodovedných predmetov. Vzhľadom na náš predvýskum, v ktorom sme sa snažili poukázať na to, že žiaci základnej školy sú schopní riešiť aj takto zamerané úlohy, si myslíme, že práve komplexné úlohy sú vhodný a pre prax použiteľný prostriedok na rozvíjanie prírodovednej gramotnosti.

Pod'akovanie

Príspevok vznikol s podporou grantu VEGA č. 1/0417/12 MŠ SR a grantu UK/468/2012.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Holbrook J., Rannikmae M. (2009) IJESSE. 3(4), p. 275
- [2] OECD (2007) Assessing Scientific, Reading and Mathematical Literacy: A Framework for PISA 2006. OECD, Paríž, p. 21
- [3] Metodicky portál RVP [Citované 5. marec 2012]
<<http://clanky.rvp.cz/clanek/c/o/7893/VYUZITI-KOMPLEXNICH-ULOH-VE-VYUCE-CHEMIE.html>>
- [4] Kompolt P., Timková B. (2010) Pedagogická diagnostika a akčný výskum. Univerzita Komenského, Bratislava, p. 248
- [5] Černocký B., Hedbávná H., Herink J., Janoušková S., Kubištová I., Maršák J., Pumpr V., Svobodová J. (2011) Přírodovědná gramotnost ve výuce příručka pro učitele se souborem úloh. NÚV, Praha, p. 15
- [6] Koršňáková P., Kováčová J. (2007) Národná správa OECD PISA SK 2006. ŠPÚ, Bratislava, p. 29

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA



ŠVK
PriF UK
2013

ENVIRONMENTALISTIKA

ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2013
ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV

Priestorová dynamika mestskej štruktúry v urbánnom území Bratislavy

Viera Baštáková¹, Peter Baus^{1,2}, Stanislava Brnkaľáková¹

1 Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra krajinnej ekológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovensko; bastakova.viera@gmail.com

2 Ústav ekológie lesa, Slovenská akadémia vied, Ludovíta Štúra 2, 960 53 Zvolen, Slovensko

Abstract

Sustainable development of the urban environment is currently one of the most challenging tasks for human kind. Therefore land use analyses of the cities play an important role in proper spatial planning of cities. Main objective of the research is to quantify the spatial distribution of the selected land use types in study area, part of Bratislava, Slovakia. The paper identifies 10 half-kilometre concentric zones, incrementing from the city centre to the distance of 5 kilometres. Our research reveals how the spatial structure changes in dependence on distance from the city centre. We calculated percentages for particular land use types in every concentric zone. The results clearly indicate decreasing urban fabric and increasing Industry, Commerce and Transport; Agricultural area; Forest and semi-natural area; and Water bodies in dependence on distance from the city centre.

Kľúčové slová: *urbanizácia; priestorová štruktúra; využitie územia; Bratislava*

Úvod a formulácia cieľa

Urbanizácia, ako komplexná interakcia medzi mnohými procesmi prebiehajúcimi v krajine, je fenoménom súčasných a pravdepodobne aj nasledujúcich desiatok či stoviek rokov [1]. Procesy prebiehajúce v krajine menia priestorovú štruktúru a formujú charakter sídiel. Z vidieckych sídiel vznikajú sídla mestskeho typu, menia sa spôsoby využitia územia, čím sa vytvárajú nové podmienky na ďalší územný rozvoj. Absencia správneho plánovania využívania územia môže mať fatálne následky pre celkové fungovanie a život v meste. Aby sa mesto uberalo udržateľným smerom, je nevyhnutné včas analyzovať a správne plánovať jeho priestorovú štruktúru. Neplánovaný rozvoj by mohol viesť k radikálnej zmene vo využívaní územia. Rizikové sú najmä premeny významných prírodných prvkov, ktorých strata je nenávratiteľná [2]. V extrémnych prípadoch, ako napríklad v rýchlo rastúcom meste Shenzhen v Číne, je dôsledkom aplikovania nevhodných plánovacích postupov relokácia priemyselných či komerčných areálov [3].

Cieľom nášho príspevku je zhodnotiť spôsob využívania priestoru v závislosti od vzdialenosti od centra mesta. Hodnotenie bolo realizované na území hlavného mesta Slovenska, Bratislavy.

Materiál a metódy

Štúdia bola vypracovaná pre časť Bratislavy, ktorá je administratívnym, kultúrnym, obchodným aj priemyselným centrom Slovenska. Má najvyšší počet obyvateľov a najvyššiu

koncentráciu ekonomických aktivít v štáte. Rozloha záujmového územia, ktoré vzniklo vytvorením 10 koncentrických kruhov okolo centra mesta, predstavuje 73,4 km².

Bratislava patrí k monocentrickým urbánnym štruktúram. Centrom osídlenia bol po stáročia hradný vrch. Keďže v súčasnosti je výstavba v historickom jadre obmedzená – nielen kvôli nedostatočnému priestoru, ale aj vzhľadom na jeho chránený status (územie je zaradené k pamiatkovo chráneným územiám – nové objekty musia spĺňať stanovené urbanistické a architektonické kritériá) [4], významným sa stal prstenec, ktorý ho obklopuje. Tak ako v iných urbánnych štruktúrach, aj Bratislava má okrem historického centra husto zastavané vnútorné mesto, staršie a moderné priemyselné a dopravné zóny, či niekoľko generácií obytných areálov [5].

Dynamika priestorovej štruktúry záujmového územia bola analyzovaná v prostredí ArcGIS 10.0. Základným podkladom bola mapa súčasnej krajinnej štruktúry zostavená na základe leteckých snímok z roku 2011. Mapa bola vypracovaná s presnosťou mierky 1:50 000. Pri určení jednotlivých prvkov krajinnej štruktúry sme vychádzali z kategorizácie tried CORINE Land Cover [6]. Vypočítali sme rozlohy nasledujúcich tried: urbanizovaná zástavba; priemysel, obchod a doprava; poľnohospodárske areály; lesy a polo-prírodné areály; vodné toky a plochy.

Vyššie spomenuté koncentrické kruhy boli vytvorené v intervaloch po 0,5 km. Stred záujmového územia predstavuje centrum Hlavného námestia nachádzajúceho sa v mestskej časti Staré Mesto. Pre každú triedu, v rámci zóny medzi dvomi kruhmi, sme vypočítali jej plošné a percentuálne zastúpenie (Tab. 1). Plocha v rámci 5 km vzdialenosti, ktorá územne patrí Rakúsku, nebola do výpočtov zahrnutá.

Výsledky a diskusia

Štúdiom spôsobov využitia územia bola potvrdená existencia jedného mestského jadra a rádiocentrického modelu mesta. Rozvoj mesta je limitovaný na jednej strane riekou Dunaj, na strane druhej pohorím Malé Karpaty (Obr. 1).

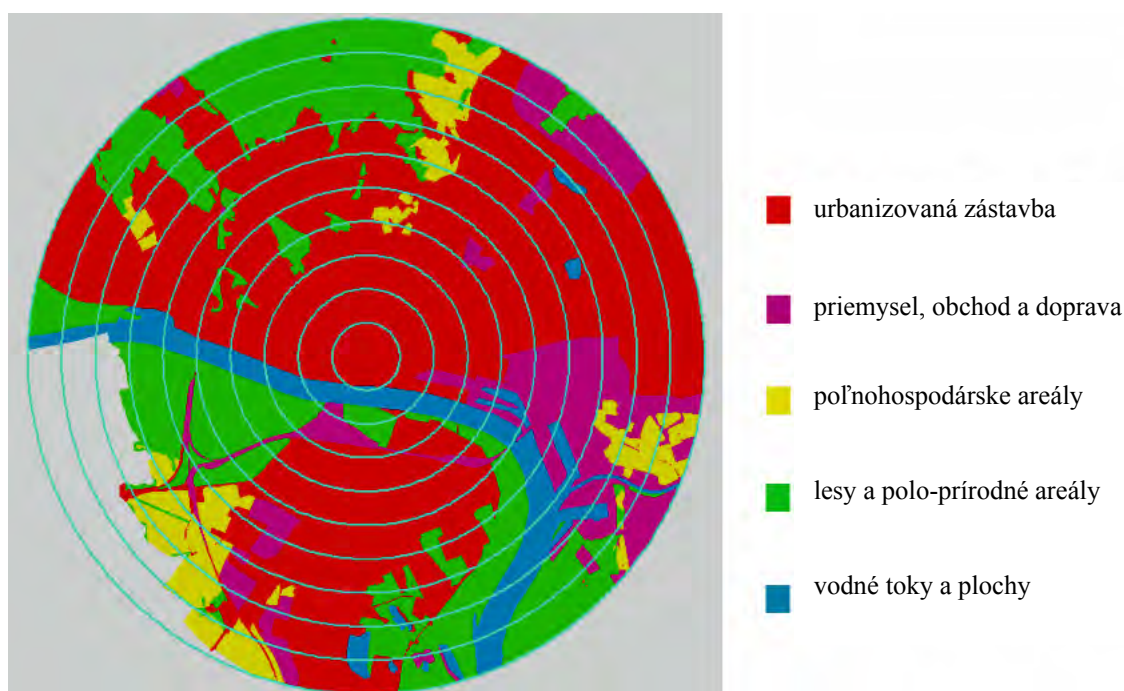
Z jednotlivých vyčlenených tried využitia územia je prirodzene najviac zastúpená urbanizovaná zástavba (52 %). Jej zastúpenie smerom k periférii mesta postupne klesá, z 97,8 % v Starom Meste (do 0,5 km) na 31,4 % v zóne vzdialenej 5 km. V západnej časti ju tvoria rezidenčné mestské časti Karlova Ves a Dúbravka, v severnej resp. severovýchodnej časti Rače, Nového Mesta a Ružinova. Významný podiel v tejto triede predstavuje sídlisko Petržalka na pravom brehu Dunaja.

Smerom na východ od historického centra sa koncentrujú biznis centrá a iné

kancelárske priestory, nákupné centrá, ale aj nové národné divadlo. Významný podiel nákupných centier tiež vidieť v juhozápadnom smere v mestskej časti Petržalka. V rámci dopravy nemožno opomenúť prístav. V juhovýchodnej časti modelového územia je lokalizovaná rafinérsko-petrochemická spoločnosť Slovnaft a.s. V severovýchodnej časti sú tiež komerčné areály a biznis centrá. Všetky tieto prvky patria súhrnne do kategórie priemysel, obchod a doprava. Celkovo zaberajú plochu 12,3 % záujmového územia.

Poľnohospodárske areály sú spolu s vodnými tokmi a plochami triedou s najnižším zastúpením (6,5 %, resp. 6,3 %). Plošné zastúpenie vodných tokov je ovplyvnené riekou Dunaj, v malej miere jazerami Štrkovec v mestskej časti Ružinov a Kuchajda v Novom Meste, či prírodným kúpaliskom Draždiak v Petržalke. Poľnohospodárske areály sú najviac rozšírené v Petržalke, na pohraničí s Rakúskom. V Rači sú zastúpené vinice, v miestnej časti Ružinov orná pôda.

Kategória lesy a polo-prírodné areály sú koncentrované najmä po obvode modelového územia. Najväčší podiel predstavujú lesy Malých Karpát a na petržalskej strane Dunaja sú to Pečniansky les a ďalšie lužné lesy v okolí Dunaja.

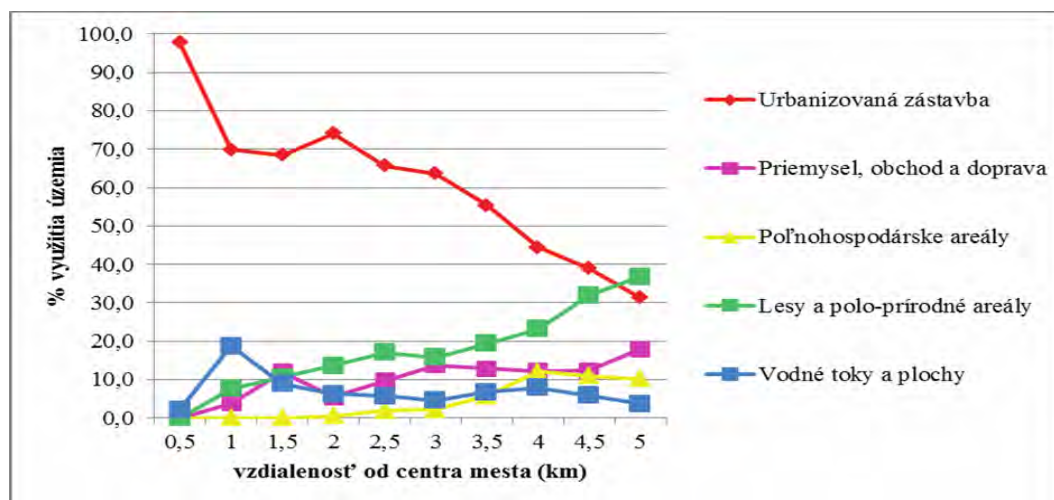


Obr. 1 Triedy využitia územia s vyznačenými desiatimi koncentrickými kruhmi

Tab. 1 Absolútne hodnoty a percentuálne zastúpenie rozlohy tried využitia územia v zadefinovaných okruhoch

vzdialenosť od centra mesta (km)	Urbanizovaná zástavba		Priemysel, obchod a doprava		Poľnohospodárske areály		Lesy a polo-prírodné areály		Vodné toky a plochy	
	(ha)	%	(ha)	%	(ha)	%	(ha)	%	(ha)	%
0,5	76,78	97,8	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	1,74	2,2
1,0	164,61	69,9	9,04	3,8	0,00	0,0	17,88	7,6	44,08	18,7
1,5	268,75	68,4	47,19	12,0	0,00	0,0	41,77	10,6	34,96	8,9
2,0	407,35	74,1	30,17	5,5	2,79	0,5	75,22	13,7	34,21	6,2
2,5	464,05	65,7	68,81	9,7	13,56	1,9	120,30	17,0	40,13	5,7
3,0	550,10	63,7	118,78	13,7	18,66	2,2	136,68	15,8	39,74	4,6
3,5	564,91	55,3	131,20	12,8	58,40	5,7	197,12	19,3	69,37	6,8
4,0	485,09	44,5	133,75	12,3	132,42	12,1	252,43	23,2	86,63	7,9
4,5	453,17	38,9	143,80	12,4	126,85	10,9	372,13	32,0	68,11	5,9
5,0	388,93	31,4	222,23	17,9	126,43	10,2	457,06	36,8	45,73	3,7

Výpočty zmien v podieloch jednotlivých tried využívania územia v korelácii so vzdialenosťou od centra mesta ukázali pokles v prípade urbanizovanej zástavby a naopak, nárast pri triedach: priemysel, obchod a doprava; poľnohospodárske areály a lesy a polo-prírodné areály. V prípade vodných tokov a plôch nemožno hovoriť o vzájomnej závislosti medzi vzdialenosťou od centra mesta a rozlohou (Obr. 2). V rozmedzí kruhov medzi 0,5 km a 1,5 km je vysoký podiel vodných tokov a plôch spôsobený blízkosťou Dunaja pri historickom jadre. Vyšší podiel obchodu v tomto rozmedzí spôsobuje prítomnosť komerčných areálov a kancelárskych priestorov na Einsteinovej ulici v Petržalke.



Obr. 2 Podiel jednotlivých tried využívania územia vyjadrený v percentách v závislosti od vzdialenosti (km) od centra mesta

Je prirodzené, že dopyt po pozemkoch v rámci sídla je najväčší na miestach s kvalitným životným prostredím (prítomnosť parkov, lesov, tiché prostredie atď.). Problém v zmysle plánovania územia nastáva vtedy, ak v daných oblastiach dôjde k situácii, v ktorej si obyvatelia kladú otázku „prečo sme sem prišli bývať?“. Hovoríme o tzv. „bumerangovom efekte“, kedy sa pôvodne atraktívne prostredie pre život stáva prehustené výstavbou a tým aj menej zaujímavé pre obyvateľov. Na obrázku 1 vidíme, že tento problém by mohol reálne ohroziť aj lesy Malých Karpát. O Pečnianskom lese a jeho využívaní sa vedú diskusie už dlhšie. Jedným z problémov v priestorovej štruktúre Bratislavy sú aj rozsiahle obytné areály a sídliská vybudované po jeho obvode. V prípade veľkých monofunkčných sídlisk, ide o jeden z dopadov plánovacej politiky z obdobia komunizmu. Mesto nie je svojou dopravnou infraštruktúrou kapacitne uspokojené na dochádzanie veľkého množstva ľudí do centra mesta z periférií za prácou. Ak prirátame dochádzku ľudí za prácou z okolitých obcí, situácia je ešte vážnejšia. Navyše, v porovnaní s mnohými európskymi mestami, v Bratislave chýbajú účelné cyklotrasy, ktoré by spájali obytné časti mesta s centrom.

Ak by sa pri plánovaní miest viac prihliadalo na efektívne využívanie územia a zachovanie zelene v meste, ľudia by neboli nútení sťahovať sa do suburbia za krajším prostredím. Ako príklad môžeme uviesť tzv. „brownfieldy“ vo východnej časti mesta, ktoré ostávajú nevyužívané.

Záver

Prácou sme sledovali dynamiku priestorovej štruktúry na území hlavného mesta Slovenska, Bratislavy. Využitím funkcie *Multi Ring Buffer* v prostredí ArcGIS, sme potvrdili koreláciu medzi podielmi jednotlivých tried využívania územia a vzdialenosťou od centra mesta. Jedinou triedou, pri ktorej nebolo možné jednoznačne určiť túto závislosť, ostali vodné toky a plochy, pri ktorých sú charakteristiky vo veľkej miere ovplyvnené polohou rieky Dunaj.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Antrop, M. (2004) *Landscape and Urban Planning*. 67 (1-4), p. 9.
- [2] Pathan, S. K., Sampat Kumar, D., Mukund et al. (1993) *International Journal of Remote Sensing*. 14 (17), p. 3169.
- [3] Jixian Wang, J., Xub, J. (2002) *Journal of Retailing and Consumer Services*. 9 (6), p. 317.
- [4] Gregorová, J. (2012) *Urbanita*. 24 (2), p. 30.

- [5] Program hospodárskeho a sociálneho rozvoja hlavného mesta SR Bratislavy na roky 2010-2020. Júl 2010.
- [6] Feranec, J., Oľahel, J., Pravda, J. (1996). Krajinná pokrývka Slovenska: identifikovaná metódou Corine Land Cover. Slovenská akadémia vied, Geografický ústav, Bratislava.

Bioakumulácia a biosorpcia bizmutu Bi(III) mikroskopickou vláknitou hubou *Aspergillus clavatus*

Katarína Boriová¹, Slavomír Čerňanský², Peter Matúš¹, Marek Bujdoš¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Ústav laboratórneho výskumu geomateriálov, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4; boriova@fns.uniba.sk

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra environmentálnej ekológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4

Abstract

In this work we focused on bismuth (III) biosorption and bioaccumulation. Prior the bioaccumulation experiments the 7-day-old conidia were collected from mycelia surface of filamentous fungus *Aspergillus clavatus* and used as inocula for 50 ml of nutrient media with different bismuth (III) concentrations. After 15-day cultivation under laboratory conditions (dark, 25 °C) the bismuth concentration in grown fungal biomass was measured using ICP OES. Maximum achieved accumulation capacity of dry biomass was 112 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$. Batch biosorption experiments were performed in Erlenmeyer flasks with pelletized wet fungal biomass/solution ratio 1.8% and with various bismuth (III) concentrations. The equilibrium time was studied within the time interval of 0-240 min. The reaction kinetics were well described by both pseudo-first and pseudo-second order rate models, and equilibrium was reached after 50 min. Langmuir and Freundlich isotherm models were used to represent equilibrium data, and the calculated maximum biosorption capacity of fungal biomass for bismuth(III) was 0.40 $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$.

KLúčové slová: biosorpcia; bioakumulácia; bizmut; *Aspergillus clavatus*; kinetika biosorpcie

Úvod

Bizmut je prvkom 15. skupiny periodickej tabuľky a patrí do kategórie kovov. Vďaka jeho nízkej toxicite sú štúdie o mobilite bizmutu v prostredí veľmi zriedkavé v porovnaní s inými ťažkými kovmi. Avšak, široká škála použitia bizmutu a jeho zlúčenín v medicíne a výrobe zliatin, pigmentov, kozmetike, a liečivách zvyšuje šance na expozíciu týmto prvkom a je teda potrebné zvážiť jeho ďalšie skúmanie, pochopenie osudu bizmutu v životnom prostredí a jeho zmeny v mobilite a biologickej dostupnosti [1].

Mobilita každého prvku v biogeochemických cykloch je ovplyvnená mnohými faktormi, vrátane mikrobiálnej aktivity. V tejto práci sme sa zamerali na bioakumuláciu a biosorpciu bizmutu (III), tieto dva procesy sú taktiež dôležitou súčasťou kolobehu prvkov. Biosorpcia môže byť definovaná ako pasívne viazanie prvkov na povrchu buniek, vedená fyzikálno-chemickými mechanizmami. Pri bioakumulácii je látka translokovaná do živých buniek, kde sa viaže a je uložená v rôznych bunkových štruktúrach, alebo metabolicky transformovaná na inú formu [2].

Materiál a metódy

Pre experimenty bioakumulácie a biosorpcie bola použitá mikroskopická vláknitá huba *Aspergillus clavatus*. Druh *A. clavatus* bol získaný zo zbierok Mykologického laboratória Slovenskej zdravotníckej univerzity (doc. Ing. Elena Piecková, PhD., MPH). Kolónie sú kultivované a uchovávané na šikmých Sabouraudových agaroch pri teplote 25 °C.

Experimenty bioakumulácie boli realizované v Erlenmeyerových bankách so Sabouraudovým živným médiom obohateným o roztok $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, p.a. (LACHEMA, s r.o., Brno) v rôznych koncentráciách (4 – 240 $\mu\text{mol.l}^{-1}$). Živné médium (50 ml) bolo naočkované konídiami odobratými očkovacou ihlou v sterilných podmienkach zo 7-dňových kultúr *A. clavatus* kultivovaných na šikmom agare. Experimenty prebiehali po dobu 15 dní za laboratórnych podmienok (25 °C, tma). Po uplynutí 15 dní bola vzniknutá biomasa odstránená filtráciou, vysušená a rozložená v autoklávoch pri 160 °C počas 4 hodín s prídavkom 5 ml 65 % HNO_3 . Obsah bizmutu v biomase bol stanovený použitím optickej emisnej spektroskopie s indukčne viazanou plazmou (ICP OES).

Biosorpčné experimenty boli realizované v Erlenmeyerových bankách za stáleho trepania (120 ot.min⁻¹) pri teplote 25 °C. V Erlenmeyerových bankách bol roztok bizmutu v rôznych počiatkových koncentráciách (0.1 – 2 mmol.l⁻¹) a peletizovaná biomasa *A. clavatus*, ktorá bola kultivovaná v živnom médiu za stáleho trepania po dobu 3-5 dní. Experimenty boli robené v časovom intervale 0 – 240 min. Obsah bizmutu v roztoku po biosorpcii bol stanovený metódou ICP OES. Reakčná kinetika bola hodnotená modelmi pseudo-prvého, pseudo-druhého a pseudo-*n*tého poriadku. Langmuirova a Freundlichova izoterma boli použité na hodnotenie rovnovážnych dát biosorpcie.

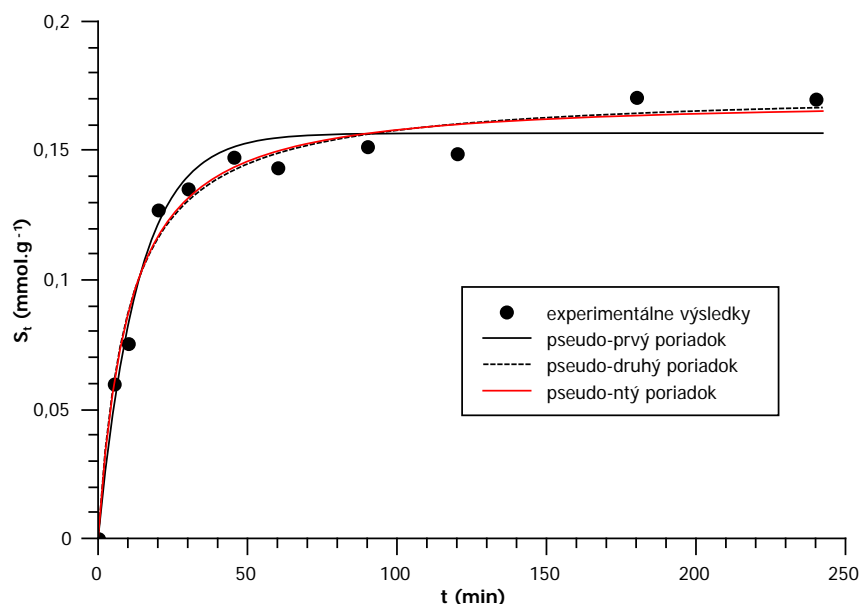
Výsledky a diskusia

Experimenty bioakumulácie prebiehali 15 dní. Po uplynutí tejto doby bola biomasa rozložená pôsobením kyselín a analyzovaná ICP OES. Najvyššia bioakumulačná kapacita bola 112 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ sušiny pri počiatkovej koncentrácii 240 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (Tab. 1). Pred aj po ukončení experimentu bolo v systéme merané pH živného média. Prostredie z mierne kyslého (pH 5,6) prešlo počas kultivácie do zásaditého (pH 6,5 – 8), teda metabolity *A. clavatus* boli zásaditého charakteru.

Tab. 1 Bioakumulácia Bi(III) mikroskopickou vláknitou hubou *A. clavatus* po 15 dňoch statickej kultivácie pri konštantnej teplote 25 °C (n=3)

Počiatočný obsah Bi(III) ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Hmotnosť sušiny po 15 dňoch kultivácie (g)	Obsah celkového Bi v sušine po 15 dňovej kultivácii \pm SD ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)
4	0,3389	0,73 \pm 0,08
40	0,3659	10,71 \pm 0,70
140	0,3715	30,21 \pm 0,84
190	0,3927	37,86 \pm 1,38
240	0,1115	112,11 \pm 23,60

Experimenty biosorpcie bizmutu na peletizovanú biomasu *A. clavatus* boli realizované za konštantnej teploty 25 °C. Rýchlosť reakcie bola hodnotená modelmi pseudo-prvého [3], pseudo-druhého [4] a pseudo-*nt*ého poriadku [5]. Priebeh adsorpcie bol rýchly, čo zodpovedá na metabolizme nezávislému dejú, a kationy bizmutu majú k povrchu biomasy pomerne vysokú afinitu. Rovnováha bola dosiahnutá už po 50 min. biosorpcie (Obr. 1). Vypočítané hodnoty parametrov rýchlostných rovníc sú uvedené v Tab. 2. Na základe štatistického hodnotenia získaných výsledkov s použitím Akaikeho informačného kritéria je zrejmé, že model pseudo-druhého poriadku najlepšie opisuje priebeh reakcie biosorpcie Bi(III) na peletizovanú biomasu *A. clavatus*.

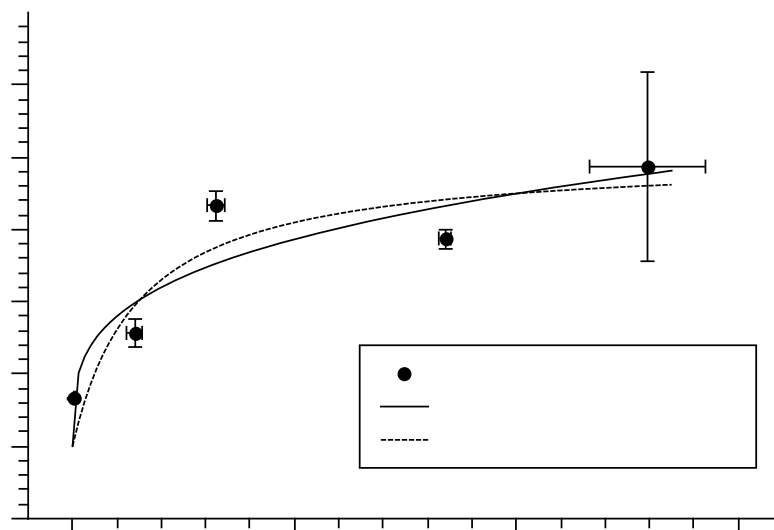


Obr. 1 Kinetika biosorpcie Bi(III) na biomasu *A. clavatus* (počiatočná koncentrácia Bi(III) 0,39 mmol.l⁻¹, teplota 25 °C, 120 ot.min⁻¹)

Tab. 2 Kinetické parametre sorpcie Bi(III) na mikrobiálnu biomasu *A. clavatus* (počiatočná koncentrácia Bi(III) 0,39 mmol.l⁻¹)

	Poriadok reakcie	Rýchlostná konštanta	S _{eq} (mmol.l ⁻¹)	R ²	Akaikého váha
pseudo-prvý	1	0,074	0,157	0,97	0,25
pseudo-druhý	2	0,583	0,173	0,98	0,66
pseudo-ntý	1,81	0,409	0,170	0,98	0,09

Adsorpčné izotermy, vyjadrené z experimentálnych výsledkov biosorpcie Bi(III), ktoré opisujú vzťah medzi rovnovážnou koncentráciou sorbátu v roztoku (C_{eq}) a naviazaným množstvom sorbátu na biomase (S_{eq}), sú uvedené na Obr. 2. V tejto práci sme použili na hodnotenie adsorpčných vlastností biomasy Langmuirov [6] a Freundlichov [7] model. Maximálna sorpčná kapacita (S_{max}), vyjadrená z Langmuirovej izotermy, bola 0,40 mmol.l⁻¹. Hodnota Freundlichovej konštanty, ktorá vyjadruje sorpčnú kapacitu sorbentu pri jednotkovej rovnovážnej koncentrácii adsorbátu v roztoku, bola približne 0,35 mmol.g⁻¹. Sorpčná kapacita fungálnej biomasy je účinnejšia než sorbent na báze aktívneho uhlia pripravený z kokosových šupín, ktorého hodnota S_{max} pre Bi(III) bola približne 0,26 mmol.g⁻¹ [8], dokonca aj ako polymérne sorbenty napr. modifikovaná polyuretánová pena, ktorej sorpčná kapacita bola 0,19 mmol.g⁻¹ [9].

**Obr. 2** Sorpcia Bi(III) na biomasu *A. clavatus*. V grafe sú uvedené štandardné odchýlky (SD).

Tab. 3 Parametre izoteriem

Modely izoteriem	K_F (mmol.g ⁻¹)	n	S_{max} (mmol.g ⁻¹)	K_L	R^2	Akaikeho váha
Freundlich	0,35	3,35	-	-	0,85	0,52
Langmuir	-	-	0.40	6,72	0.84	0,48

Záver

Procesy biosorpcie a bioakumulácie sú považované za alternatívne techniky odstraňovania znečisťujúcich látok. Experimenty, zamerané na porovnanie bioakumulačnej a biosorpčnej kapacity rôznych druhov biomasy, umožnia posúdenie ich vhodnosti na využitie pre remediačné technológie. V práci sme venovali pozornosť procesom bioakumulácie a biosorpcie bizmutu mikrobiálnou biomasou *A. clavatus*. Maximálna dosiahnutá bioakumulačná kapacita biomasy *A. clavatus* bola 112 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ sušiny. Bioakumulačná kapacita rástla so stúpajúcou počiatočnou koncentráciou. Reakčná kinetika biosorpcie bola hodnotená modelmi pseudo-prvého, pseudo-druhého a pseudo-ntého poriadku, pričom priebeh reakcie najlepšie opisoval model pseudo-druhého poriadku. Rovnováha bola dosiahnutá už po 50 min. biosorpcie. Maximálna sorpčná kapacita biomasy *A. clavatus* bola 0,40 mmol.g⁻¹.

Pod'akovanie

Táto práca vznikla v rámci riešenia projektov finančne podporených grantmi Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVV LPP-0038-06 a Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied VEGA 1/0860/11, VEGA 1/1155/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Yang N., Sun H., (2011) Bismuth: Environmental Pollution and Health Effects. In: Jerome O. Nriagu (Ed.). Encyclopedia of Environmental Health. Elsevier, Burlington, p. 414
- [2] Gadd G. M. (2004) Geoderma 122, p. 109
- [3] Lagergren S. (1898) K. Sven. Vetenskapsakad. Handl. 24, p. 1
- [4] Ho Y.S., McKay G. (1999) Process Biochem. 34, p. 451
- [5] Özer A. (2007) J. Hazard. Mater. 141, p. 753
- [6] Langmuir I. (1916) J. Am. Chem. Soc. 38, p. 2221
- [7] Freundlich F.M.H. (1906) J. Phys. Chem. 57A, p. 385
- [8] Sartape A., Mandhare A., Salvi P., Pawar D., Raut P., Anuse M., Kolekar S. (2012)

Chin. J. Chem. Eng. 20, p. 768

- [9] El-Shahawi M.S., Al-Sibaai A.A., Al-Saidi H.M. et al. (2012) Fast, Selective Removal and Determination of Total Bismuth (III) and (V) in Water by Procaine Hydrochloride Immobilized Polyurethane Foam Packed Column Prior to Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry. In: Zafar F., Sharmin E. (eds.) Polyurethane, InTech, p. 281

Strategické plánovanie rozvoja mikroregiónu Biela Orava s ohľadom na mienku vybraných hlavných aktérov v území

Stanislava Brnkaľáková¹, Viera Baštáková²

*Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra krajinnej ekológie,
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika; stanislava.brnka@gmail.com*

Abstract

Changes happening in the society have influenced lifestyle of a man significantly. In the past, people were living and working in the nature and using what was offered to them. Today, bigger part of population lives in urban environment and goes to nature to relax and recover. Value of natural environment has been increased significantly and society development is constantly moving forward and it is increasingly putting emphasis on the space. Therefore, it is necessary to regulate areas development, find a way of harmonic coexistence of mankind and nature and a match among aims and resources of the society under constantly changing conditions. In the recent past, main task of regional state politics was to bridge the gaps among individual regions. Today the aim of regional, spatial and strategic development planning is to make the most of these disparities and to draw particular attention to the unique territory.

KLúčové slová: mikroregión; regionálny rozvoj; strategické plánovanie; dotazníkový prieskum

Úvod a formulácia cieľa

Problematika regionálneho rozvoja je dnes veľmi aktuálnou témou. Regionálna politika sa snaží eliminovať narastajúce disparity medzi stagnujúcimi a rozvinutými regiónmi sformované ich neidentickým vývojom a zvyšovať ich konkurencieschopnosť [1]. Jej úlohou je zabezpečiť komplexný priestorový, ekonomický, sociálny a kultúrny rozvoj cieľavedomým pôsobením štátnej správy a samospráv na centrálnej, regionálnej a miestnej úrovni [2, 3, 4]. Pri strategickom plánovaní regionálneho rozvoja sú kľúčovými krokmi formulácia priorít a cieľov, analýza východísk, koncepcia postupu a samotná realizácia plánu [5, 6]. Do procesu plánovania rozvoja regiónov vstupuje okrem strategického, aj krajinné a územné plánovanie. Ich spoločným cieľom je zmysluplné a optimálne využívanie krajiny s dodržiavaním princípov udržateľnosti, ochrany prírodných a kultúrnych hodnôt. Okrem toho chránia aj záujmy jednotlivca a hľadajú formy realizácie záujmov spoločnosti [7]. V procese strategického plánovania regionálneho rozvoja a určenia priorít smerovania vývoja regiónu zohráva dôležitú úlohu spoločný konsenzus partnerov. Pre získanie najobjektívnejšej a najtransparentnejšej vízie rozvoja územia na lokálnej úrovni sa preto v súčasnosti do popredia dostávajú nové demokratické nástroje plánovania, ako je decentralizované rozhodovanie a participácia obyvateľstva, ktoré dôverne riešené územie pozná a do plánovacieho procesu môže priniesť tzv. „interné know-how“ [8].

Naším záujmovým územím v riešení načrtnutej problematiky regionálneho rozvoja je najsevernejší a najchladnejší mikroregión Slovenska, Biela Orava. Napriek významnej poľnohospodárskej a ekostabilizačnej funkcii Bielej Oravy existuje viacero oblastí, na ktoré

sa treba v procese plánovania jej rozvoja prednostne zamerať. Cieľom skúmania v mikroregióne Biela Orava bolo prostredníctvom dotazníkového prieskumu získať informácie o súčasnosti a perspektívach vývoja mikroregiónu vo vzťahu k možnostiam skvalitnenia života a uplatneniu koncepcie udržateľného rozvoja z pohľadu hlavných aktérov v území.

Materiál a metódy

Mikroregión Biela Orava ležiaci v okrese Námestovo v Žilinskom kraji je jedinečný pre jeho vidiecky charakter, vzácnu prírodu, vysoký potenciál rozvoja cestovného ruchu a bohatú kultúrnu tradíciu. Mikroregión tvorí 23 vidieckych obcí a mesto Námestovo. Výmera územia je 690,5 km². Takmer celé územie (85 %) spadá pod chránenú krajinnú oblasť Horná Orava [9]. V lete sa cestovný ruch orientuje do rekreačného a športového centra, Oravskej priehrady a v zime ponúka širokú škálu lyžiarskych aktivít rozmiestnenú rovnomerne po celom území. Napriek týmto prednostiam mikroregión patrí do kategórie s najmenej rozvinutou infraštruktúrou a vzhľadom na odľahlú polohu od rozvinutých regiónov má nízku hodnotu polohového potenciálu. Nevýhodnú polohu územia taktiež znásobuje susedstvo s ekonomicky marginálnym regiónom na poľskej strane [10].

Pre účely výskumu bola vybraná interorgatívna metóda – dotazník, ktorý je vhodný najmä pri hromadnom získavaní informácií, ale aj názorov a postojov k problémom [11]. Otázky boli zostavené na základe prác [12, 13] zameraných na percepciu a možnosti udržateľného rozvoja mikroregiónu. Základný súbor tvorili miestni predstavitelia rozhodovacej sféry (predstavitelia samosprávy obcí a miest (11) a mienkotvorné osobnosti zo skupiny učiteľov (11) a podnikateľov (11) s dobrým prehľadom o miestnych, resp. regionálnych problémoch. Skúmaný súbor tvorilo celkovo 33 respondentov. Zber dát sa uskutočnil počas rokov 2012-2013. Respondenti boli oslovení osobne alebo elektronicky (e-mailom) a požiadaní o vyplnenie dotazníka. Odpovede boli následne rozanalyzované spolu s analýzou prírodných a socioekonomických pomerov záujmového územia. Na základe výsledkov boli navrhnuté strategické postupy, ktoré by prispeli k rozvoju mikroregiónu Biela Orava.

Výsledky a diskusia

Vyplnené dotazníky sme získali od 33 respondentov. Získať odpovede na otázky v dotazníku bolo náročné, nakoľko komunikácia s respondentmi nebola jednoduchá, stretli sme sa často s neochotou dotazník vyplniť. Ako hlavnú príčinu respondenti uvádzali časové

dôvody alebo pracovnú zaneprázdnenosť. Získané údaje z dotazníkov sme kvantitatívne vyhodnotili. V tabuľkách je uvedený počet odpovedí v absolútnych početnostiach.

Z vyhodnotenia mäkkých dát vyplýva, že všetky skupiny respondentov pokladajú za najväčšie výhody bývania v obci pokojný život (22), blízky kontakt s prírodou (20) a dopravnú dostupnosť (10). Respondenti uviedli ako iné výhody bývania v obci prítomnosť Oravskej priehrady a možnosť bývania v rodinných domoch. Vyhodnotenie odpovedí reprezentuje tabuľka 1.

Tab. 1 Hlavné výhody bývania v obci

<i>výhody bývania</i>	podnikatelia	predstavitelia samosprávy obcí	učitelia	spolu
<i>pokojný život</i>	8	7	7	22
<i>blízky kontakt s prírodou</i>	5	7	8	20
<i>dopravná dostupnosť</i>	2	6	2	10
<i>kvalita poskytovaných služieb</i>	1	1	1	3
<i>pracovné možnosti</i>	2	2	3	7
<i>obec sa nachádza na CHKO</i>	1	0	2	3
<i>iné</i>	2	1	0	3

Za najväčšiu nevýhodu bývania v obci je zo strany oslovených respondentov považovaný nedostatok pracovných príležitostí (19), nedostatok služieb (12) a nedostatočný kultúrno-spoločenský život (11). Za nevýhodu považujú respondenti taktiež rozdrobenosť pozemkov a chýbajúce športovo – rekreačné zariadenia (klzisko, plaváreň, cykloturistický chodník). Ďalšie odpovede respondentov prináša tabuľka 2.

Tab. 2 Nevýhody bývania v obci

<i>nevýhody bývania</i>	podnikatelia	predstavitelia samosprávy obcí	učitelia	spolu
<i>vysoké finančné nároky na bývanie</i>	0	2	0	2
<i>nedostatok pracovných príležitostí</i>	6	7	6	19
<i>slabá spolupráca so samosprávou obce</i>	3	0	0	3
<i>nedostatok služieb</i>	2	4	6	12
<i>zlá kvalita životného prostredia</i>	2	1	0	3
<i>zlé dopravné možnosti k obvodným úradom</i>	2	0	0	2
<i>nedostatočný spoločensko-kultúrny život</i>	2	4	5	11
<i>vysoká intenzita kamiónovej dopravy</i>	0	1	0	1
<i>iné</i>	1	1	0	2

Cieľom prieskumu bolo tiež zistiť, v čom vidia respondenti hlavné rozvojové možnosti obce/mikroregiónu, ktoré by prispeli k skvalitneniu ich života a v čom vidia hlavné obmedzenia v rozvoji obce/mikroregiónu.

Väčšina respondentov za hlavné rozvojové možnosti považuje vidiecku turistiku (21), eko/agroturistiku (15) a rozvoj služieb (12). Respondenti vidia možnosť v rozvoji Bielej Oravy aj v zachovaní a rozvinutí tradičných remesiel (11), poľnohospodárstve (10) a lesnom hospodárstve (6). Za aktivity, ktoré by podporili budúci rozvoj mikroregiónu považujú účastníci prieskumu hlavne vytvorenie vhodných podmienok pre rozvoj cestovného ruchu (18), novú bytovú výstavbu (12), vybudovanie záujmových centier (10), zvýšenie efektívnosti poľnohospodárskej produkcie (7), vybudovanie športovísk (7) a zlepšenie propagácie obce (7). Za hlavné obmedzenia rozvoja mikroregiónu pokladajú oslovení nedostatok financií (19) a nedostatok pracovných príležitostí (16). Respondenti sa prikláňajú aj k názoru, že rozkvetu mikroregiónu bráni pasivita miestneho obyvateľstva (9). Zaujímavým poznatkom je, že iba 1 respondent považuje za obmedzenie rozvoja polohu mikroregiónu v chránenom území a prekvapivo za negatívum respondenti nepovažujú ani výskyt obce v málo rozvinutom regióne (túto odpoveď označili len dvaja).

Podľa respondentov nedostatok pracovných príležitostí a financií spôsobuje stagnáciu rozvoja mikroregiónu. Mladí ľudia s vysokoškolským vzdelaním tu nenachádzajú profesijné uplatnenie a nie sú motivovaní mesačnou mzdou, preto mikroregión opúšťajú. Veľké firmy ako Johnson controls, s.r.o. (elektrotechnický priemysel), ZTS Strojárne, a.s. (strojárka výroba), Makyta Púchov, a.s. (šitie odevov), Avex Production (elektronická výroba) prispievajú k znižovaniu nezamestnanosti, ale zároveň aj k znečisťovaniu životného prostredia [14]. Mikroregión vzhľadom na vysokú nezamestnanosť a nízku mesačnú mzdu je náchylný na prílev nových zahraničných investorov. Ak si má ale toto územie zachovať svoju neobyčajnosť, jeho rozvoj by sa mal uberať smerom vidieckej turistiky, eko/agroturistiky a väčšej propagácie tradičných remesiel a kultúrnych pamiatok. Respondenti sa k týmto rozvojovým možnostiam prikláňajú, ale problémom je nedostatok financií. Úlohou obcí je preto vytvoriť podmienky na získanie peňažných prostriedkov z fondov Európskej únie. Európsky regionálny rozvojový fond podporuje zaostávajúce rurálne a urbánne regióny a jeho cieľom je ich znovu oživiť [15]. Pre rozvoj súkromného sektora, v oblasti služieb a cestovného ruchu, je dôležité vybudovanie kvalitnej cestnej infraštruktúry.

Vzhľadom na menšiu intenzifikáciu poľnohospodárskej výroby a zachované prírodné oblasti má mikroregión väčšie predpoklady pre rozvoj ekologického poľnohospodárstva ako južné regióny. Zvýšenie konkurencieschopnosti Bielej Oravy by sa mohlo doceliť zavedením

vhodných udržateľných systémov v poľnohospodárstve a lesníctve, ktoré zvýšia kvalitu života v mikroregióne [16]. V súčasnosti existuje ekologické poľnohospodárstvo len v obciach Hruštín a Vasil'ov.

Keďže Biela Orava je pohraničný región, prílev turistov by mohol vzrásť aj z poľskej strany. Zatiaľ existuje len malá, nie veľmi intenzívna a slabo propagovaná cezhraničná spolupráca medzi obcami. Nielen cezhraničná, ale aj vzájomná spolupráca obcí a ďalších subjektov na území Slovenskej republiky je pre tento región dôležitá. Vzájomnú spoluprácu obcí v mikroregióne väčšina respondentov hodnotí ako dobrú (13) a 7 respondentov považuje túto spoluprácu za pasívnu. Hodnotenie spolupráce obcí/mikroregiónov na miestnej/regiónálnej úrovni ilustruje tabuľka 3 a na medzinárodnej úrovni tabuľka 4.

Tab. 3 Spolupráca obcí na miestnej/regiónálnej úrovni

Vzájomná spolupráca obcí/mikroregiónov	podnikatelia	predstavitelia samosprávy obcí	učitelia	spolu
<i>výborná</i>	0	1	0	1
<i>dobrá</i>	5	4	4	13
<i>pasívna</i>	3	1	3	7
<i>neviem</i>	3	3	4	10

Tab. 4 Spolupráca obcí na medzinárodnej úrovni

Cezhraničná spolupráca obcí/mikroregiónov	podnikatelia	predstavitelia samosprávy obcí	učitelia	spolu
<i>výborná</i>	1	2	1	4
<i>dobrá</i>	6	7	2	15
<i>pasívna</i>	3	0	5	8
<i>neviem</i>	1	2	3	6

Záver

Úlohou mikroregiónu je cieľná spolupráca obyvateľov vidieka, získanie vzájomnej dôvery partnerstva, delenie si kompetencií a zdieľanie spoločných problémov i ziskov. Vyvrcholením takejto spolupráce obcí by malo byť vytvorenie takého spoločenstva, ktoré by zastupovalo samosprávu, štátnu správu a súkromný sektor. Dotazníkový prieskum ukázal, že v mikroregióne výrazne absentuje intenzívna spolupráca jednotlivých subjektov, či už samospráv s obyvateľmi, obcí mikroregiónu navzájom, alebo spolupráca s okolitým územím mikroregiónu. Preto dosiahnutie rozkvetu cestovného ruchu, zvýšenie životnej úrovne miestneho obyvateľstva a súčasné zachovanie identity Bielej Oravy nie je možné bez recipročnej komunikácie. Komunikáciu a participáciu miestneho obyvateľstva v rámci

plánovacích procesov môžeme považovať za jeden z dôležitých predpokladov skvalitnenia života, ochrany prírody a udržateľného rozvoja mikroregiónu Biela Orava.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Stričík M. (2011) Regionálny rozvoj. Ekonóm, Bratislava, p. 11
- [2] Finka M. (2000) Prehľad systému územného plánovania v Slovenskej republike. In: Finka M., Petriková D. Priestorový rozvoj a plánovanie v kontexte európskej integrácie. Road, Bratislava, p. 83
- [3] Samson Š. a kol. (2001) Regionálna ekonomika. EF TU, Košice, p. 78
- [4] Marshall T. (1993) European Planning Studies. 1(1), p. 69
- [5] Blašková M. (2005) Strategické plánovanie. Vývoj a vybrané problémy. Ekonóm, Bratislava, p. 30
- [6] Kováč B., Komrska J. (2000) Aktuálny vývoj teórie urbanizmu a nové trendy v priestorovom plánovaní. Road, Bratislava, p. 74
- [7] Štepanková R., Heinischová M. (2009) Urbanizmus a územné plánovanie. SPU, Nitra, p. 9
- [8] Klamár R. (2007) Strategické plánovanie rozvoja mikroregiónu Ptava. Fakulta humanitných a prírodných vied PU, Prešov, p. 52
- [9] Rusnák M., Kollár, D.(2010) Orava na starých pohľadniciach. Dajama, Bratislava, p. 96.
- [10] Ira V., Andráško, I. (2010) XV. česko-slovenský geografický akademický seminár: Časovo-priestorové aspekty regionálnych štruktúr ČR a SR. Štúrovo, SR, p. 101
- [11] Chrenščová V. (2011) Acta EnvironmentalicaUniversitatisComenianae. 19(2), p. 5
- [12] Chrenščová V. (2009) Acta EnvironmentalicaUniversitatisComenianae. 17(1), p. 37
- [13] Huba M., IRA V. (2000) Stratégia trvalo udržateľného rozvoja vo vybraných regiónoch. STUŽ/SR, Bratislava, p. 55
- [14] Plán hospodárskeho a sociálneho rozvoja mesta Námestovo na obdobie 2007 – 2013 [Citované: marec 2013] <<http://www.namestovo.sk/uploads/fck/file/PHSR%20NAMESTOVO%202007-2013.pdf>>
- [15] Matthews L. (2000) Regionálne disparity a regionálny rozvoj. In: Finka M., Petriková D. Priestorový rozvoj a plánovanie v kontexte európskej integrácie. Road, Bratislava, p. 112
- [16] Magdoff F. (2007) RenewableAgriculture and FoodSystems. 22(2), p. 109

Zaujímavé peľové objekty na rašelinisku PR Nad Šenkárkou

Malvína Čierniková, Ivana Vykouková

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra pedológie, Mlynská dolina, 84215 Bratislava, Slovenská republika; ciernikova@fns.uniba.sk

Abstract

Peat is a source of a much information. First it provides insight into the current status of occurrence of various plant species and communities and on the other hand palynological research approach the presence of these plant species and communities in the past. Therefore we did a palynological research in the peat in Nature Reserve Nad Šenkárkou in 2010. The age of this peat is about 10 300 years, which falls into the period of preboreal. The most frequent pollen grains belonged to species as *Betula pubescens*, *Fagus sylvatica* and *Alnus glutinosa*. From the pollen spectrum we suppose that in the time of formation of the peat, there were forest biotopes on the locality.

Key words: peat; palynological characteristic; pollen grains; pollen spectrum

Úvod a formulácia cieľa

Rašeliniská sú na Slovensku považované za veľmi vzácne, ohrozené a často reliktné spoločenstvá, ktoré predstavujú významné biotopy pre mnohé unikátne druhy rastlín a živočíchov, hlavne bezstavovcov. Pozornosť by sa však mala venovať aj informáciám ukrytým v hlbokých vrstvách rašeliny. Tieto nám poskytujú peľové zrná rastlín, ktoré sa vďaka vlastnostiam rašeliny zakonzervovali a poskytujú nám údaje o vegetácii minulých geologických období. Štúdiu peľových zrn sa venuje vedný odbor palynológia, ktorá je jednou z pomocných disciplín historickej geobotaniky, ktorá sa zaoberá vývojom rastlinnej pokrývky v priebehu predchádzajúcich období a určuje, determinuje a priraduje jednotlivé peľové zrná ku konkrétnym rastlinným druhom a čeľadím. Súbor všetkých nálezov, ktoré v preparáte determinujeme a počítame, sa nazýva peľové spektrum. Takéto peľové spektrá sa z každej vzorky percentuálne vyhodnotia a graficky znázornia v tzv. peľovom diagrame. Konečným výstupom peľovej analýzy je však až vyhodnotenie výsledkov z peľového diagramu.

Územie PR Nad Šenkárkou sa nachádza asi 5 km západne od obce Limbach v okrese Bratislava – vidiek. V Malých Karpatoch sa prechodné štádiá rašelinísk vyskytujú veľmi vzácne. Rašelinisko patrí do vegetačnej formácie *Sphagnetum*, ktoré vzniká na miestach s hladinou podzemnej vody vystupujúcou na povrch [1].

Cieľom príspevku je poukázať na rozmanité zastúpenie peľových zrn, na ich základné determinačné znaky a v neposlednom rade, zdôrazniť dôležitosť vedného odboru palynológie.

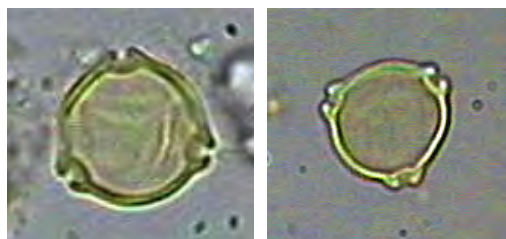
Materiál a metódy

Vzorky na laboratórne spracovanie sme odoberali pôdnym vrtákom. Základné princípy a postupy palynologického výskumu sme prebrali z práce Jankovskej [2]. Pre laboratórne postupy sme si vybrali metódu s hydroxidom draselným a hexametafosforečnanom sodným [3]. Pri tejto metóde zohráva kľúčovú úlohu hexametafosforečnan sodný, ktorý rozruší organické zhluky. Pri ďalšom spracovaní sme vzorky zaliali čistým glycerínom na vytvorenie trojrozmerného priestoru v preparáte, ktorý je mimoriadne dôležitý pri determinácii peľových zrn. Pri určovaní peľových zrn a ich zaraďovaní do taxonomických jednotiek sme používali určovacie kľúče a fotografické prílohy [4, 5, 6]. Postupovali sme od najvrchnejšej vrstvy (0–10cm) k najspodnejšej. Celkovo sme zhotovili 25 preparátov. Posledná, šiesta vrstva (od 50 do 60 cm) sa nedala použiť na ďalšie palynologické spracovanie, pretože ju tvoril len základný substrát a žiadna rašelina. Preparáty sme prezerali pri zväčšení 400x.

Výsledky a diskusia

Pri palynologickom hodnotení sme sa venovali druhom a čeľadiam, ktoré mali podstatnejšie zastúpenie. Peľové zrná delíme na stromové (*arbor pollinum*) a nestromové (*non arbor pollinum*). Medzi najčastejšie zastúpené stromové peľové zrná (obr. 1 – 17) patria nižšie uvedené. Na ich bližšie určenie sme použili prácu Vačka [7], ktorý uvádza priemerné veľkosti a ich základné charakteristiky.

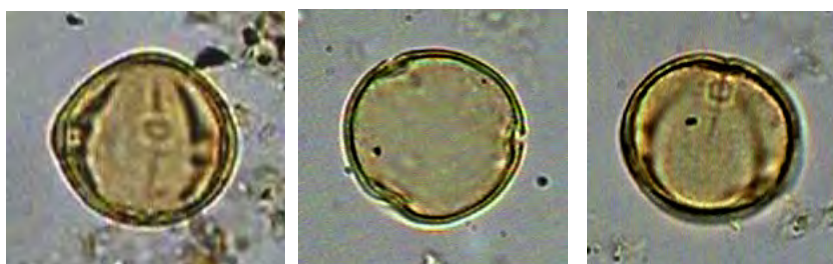
BREZA BIELA (*Betula pubescens*)



Obr. 1, 2 : Peľové zrná brezy (zväčšenie 400x)

BUK LESNÝ (*Fagus sylvatica*)

Obr. 3, 4, 5: Peľové zrná buka (zväčšenie 400x)

DUB (*Quercus*)

Obr. 6, 7, 8: Peľové zrná duba (zväčšenie 400x)

JELŠA LEPKAVÁ (*Alnus glutinosa*)

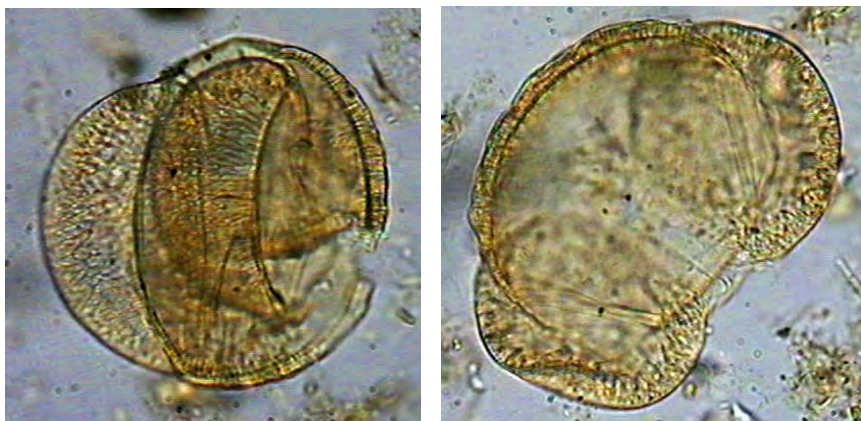
Obr. 9, 10, 11: Peľové zrná jelše (zväčšenie 400x)

BOROVICA (*Pinus*)

Obr. 12, 13: Peľové zrná borovice (zväčšenie 400x)

SMREK (*Picea*)

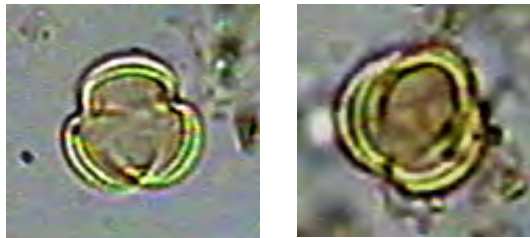
Obr. 14, 15: Peľové zrná smreku (zväčšenie 400x)

JEDĽA (*Abies*)

Obr. 16, 17: Peľové zrná jedle (zväčšenie 400x)

Nestromové peľové zrná

Kým pri peľových analýzach peľových zŕn drevín sa skoro vždy určujú rody, prípadne druhy, v skupine nestromových peľových zŕn (obr. 18 – 25) určujeme okrem výnimiek iba čeľade. Ich prítomnosť v peľových spektrách nemá preto pre stratigrafiu a rekonštrukciu porastov takú indikačnú hodnotu ako peľové zrná drevín. Vo väčšine prípadov iba dokresľujú vzťah medzi oboma skupinami (AP : NAP). Niektoré druhy môžu priblížiť podmienky stanovišťa a pomáhajú nám tak predstaviť si rôzne detaily o prostredí.

POACEAEObr. 18, 19, 20: Peľové zrná z čeľade *Poaceae* (zväčšenie 400x)*Artemisia*Obr. 21, 22: Peľové zrná *Artemisia* (zväčšenie 400x)

Spóry

Obr. 23: *Sphagnum*
(zväčšenie 400x)Obr. 24: *Pteridium*
(zväčšenie 400x)Obr. 25: *Polypodiaceae*
(zväčšenie 400x)**Záver**

Údaje získané z peľovej analýzy nám poskytujú možnosť predstaviť si akými zmenami prechádzal vegetačný kryt počas rôznych geologických období. Najčastejšie sa jedná o neskorý glaciál a holocén. Na to, aby sme mohli tieto peľové analýzy uskutočňovať, je potrebné venovať veľkú pozornosť peľovým zrnám. Keďže majú veľmi dobré konzervačné vlastnosti, stávajú sa základným prvkom pre peľovú analýzu. Každá rastlina má iné peľové zrno, líšiac sa veľkosťou, počtom otvorov, rôznymi lemami, atď. Každé je jedinečné a ich usporiadanie v rašeline a konkrétny počet zastúpených čeľadí nám utvára obraz o vegetácii v minulosti. V spolupráci

s inými vednými odbormi ako sú napríklad archeológia a paleobotanika je možné predstaviť si obraz krajiny niekoľko tisíc rokov dozadu, či už bola človekom ovplyvnená, alebo nie.

Pod'akovanie

Tento príspevok finančne podporil OP Výskum a vývoj – projekt Centrum excelentnosti integrovanej protipovodňovej ochrany územia, ITMS 26240120004, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Hrbatý J. (1994) Přírodní rezervácia Nad Šenkárkou, Inventarizačný výskum (Prílohy) – Agentúra životného prostredia Banská Bystrica, pobočka Trnava, p. 11
- [2] Jankovská V. (1997) Možnosti využití pylové analýzy. Lesnická práce 76/10, Praha, p. 366-367.
- [3] Gabrielová, N. (1986) Laboratorní metody v mikropaleontologii. Metodická příručka Ústředního ústavu geologického 4, p. 10
- [4] Reille M. (1999) Pollen et Spores d'Europe et d'Afrique du nord. Laboratoire de botanique historique et palynologie, Marseilles, p. 535
- [5] Rybníčková E. (1974) Die Entwicklung der Vegetation und Flora im südlichen Teil der Böhmisc. Mährischen Höhe während des Spätglazials und Holozäns. Vegetace ČSSR A 7. Academia, Praha, p. 163
- [6] Demske D. et al. (2012) Atlas of pollen, spores and further non-pollen palynomorphs recorded in the glacial-interglacial late Quaternary sediments of Lake Suigetsu, central Japan, Quaternary International, doi 10.1016/j.quaint.2012.02.002
- [7] Vačko R. (2000) Postglaciálny vývoj lesov Ždiarskej brázdy. (Dizertačná práca) Bratislava, Univerzita Komenského, 2000, p. 130

Výskyt invázných druhov rastlín vo vegetácií ramien rieky Nitry v okrese Topoľčany

Marek Gális

*Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Fakulta prírodných vied, Katedra ekológie a environmentalistiky, Tr. A. Hlinku 1, 949 74 Nitra, Slovenská republika
marek.galis@ukf.sk*

Abstract

The success of invasion of plant species in the new region largely depend on the dispersal ability. River arms are valuable habitats. During the field survey of four river arms of the river Nitra within the Topoľčany district, we found the presence of 12 invasive plant species. Dominant numbers of habitats were invaded by species *Helianthus tuberosus* and *Impatiens parviflora*. The largest number of invasive species was present in the arm Zátíšie. The identified species were found mainly in the river arm bank vegetation.

KLúčové slová: invázne druhy rastlín; riečne ramená; rieka Nitra; okres Topoľčany

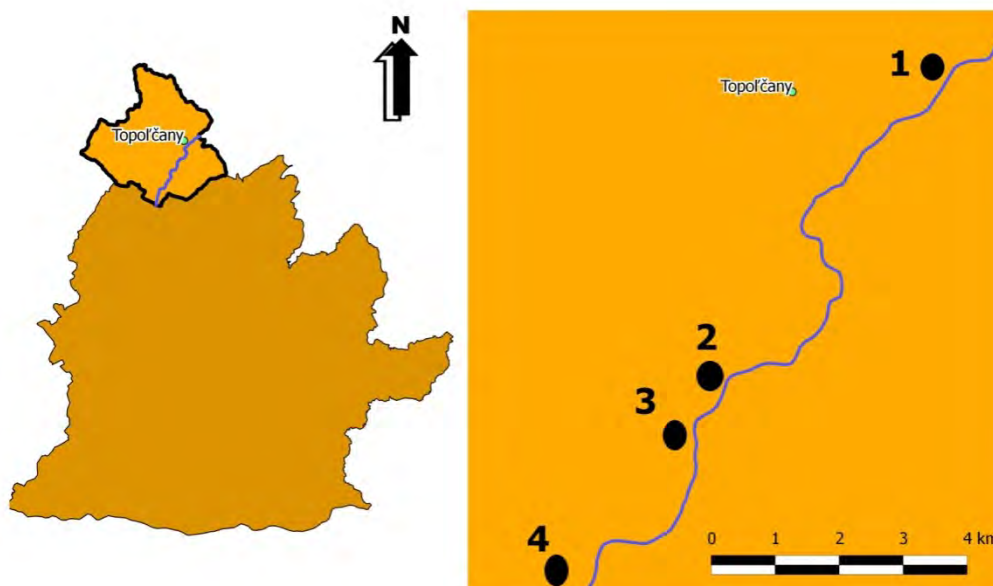
Úvod a formulácia cieľa

Invázia rastlinných druhov (označovaných tiež ako alochtónne, cudzokrajné, exotické druhy, neofyty, buriny, plevele, a pod.) do nových stanovišť predstavuje aktuálny problém prejavujúci sa v najväčšom rozsahu na lokálnej úrovni. Vodné toky môžeme považovať za typický príklad biokoridoru, pozdĺž ktorého dochádza k rýchlemu prenosu materiálu (živín) a disperzii organizmov aj do okolitej krajiny [1]. Dôležitým procesom spojeným so samotnou riekou sú povodne. Tie umožňujú rozšírenie diaspór rastlinných druhov do okolitej krajiny a v poslednom rade spôsobujú rozsiahlu disturbanciu existujúcich stanovišť [2,3]. Staré riečne ramená predstavujú cenné biotopy. Vznikli regulačnými úpravami, ktoré majú za následok vznik rady odstavených ramien, tvorených pôvodným starým korytom [4]. Brehové porasty takýchto ramien majú rovnaké abiotické podmienky aké sú u riek: dostatok živín a prítomnosť vody, čo inváznym druhom napomáha pri uchytení a ďalšom šírení [5].

Cieľom príspevku je zhodnotiť výskyt a rozšírenie invázných druhov rastlín v brehovej vegetácií ramien rieky Nitry v rámci okresu Topoľčany. Samotné územie bolo vybrané aj z dôvodu, že úsek rieky Nitry je pomerne silne invadovaný spoločensťami nepôvodných rastlinných druhov [2]. Je teda predpoklad zvýšeného výskytu týchto druhov aj v blízkych ramenách rieky.

Materiál a metódy

Mapovanie výskytu invázných druhov rastlín prebehlo počas vegetačného obdobia v roku 2012. Skúmané ramená sa nachádzajú v blízkosti rieky Nítry v rámci okresu Topoľčany (Obr. 1). Počas terénneho prieskumu sme hodnotili výskyt, abundanciu populácií invázných druhov rastlín v brehovom poraste ramien a prípadné šírenie ich jedincov do okolitej poľnohospodárskej krajiny. Veľkosť populácie sme určovali podľa semikvantitatívneho hodnotenia: J - jednotlivé exempláre, S - skupiny, MS - malé skupiny, VPZ - veľké plošné zárasty. Invázne druhy sú klasifikované podľa Zoznamu nepôvodných, invázných a expanzívnych cievnatých rastlín Slovenska [6] a určované podľa Príručky na určovanie vybraných invázných druhov rastlín [7]. Nomenklatúra zistených taxónov je zjednotená podľa práce Zoznam nižších a vyšších rastlín Slovenska [8].



Vysvetlivky: 1-Zátišie, 2-Chrabranské rameno, 3-Belanov kút, 4-Ludanické rameno

Obr. 1 Sledované ramená rieky Nítry v rámci okresu Topoľčany

Celkovo sme v území hodnotili štyri ramená rieky: 1. Zátišie (k.ú. Topoľčany), 2. Chrabranské rameno (k.ú. Chrabrany), 3. Belanov kút (k.ú. Čeladince), 4. Ludanické rameno (k.ú. Ludanice) (Obr. 2). Ramená boli vybrané z dôvodu, že v prípade ramien: Zátišie (1,22 ha), Chrabranské rameno (0,5 ha) a Ludanické rameno (1,62 ha) sa jedná o ramená využívané na rybolov, nachádzajú sa v blízkosti zastavaných území obce - je tu predpoklad šírenia invázných druhov z blízkych záhrad. U týchto ramien je relatívne stabilná hladina vody a majú stály prítok. Belanov kút (2,56 ha) bol vybraný z dôvodu, že sa jedná o mŕtve

rameno rieky Nitry patriace do kategórie - Prírodná rezervácia (PR). U tohto ramena bolo počas výskumu pozorované vyschnutie hladiny, z dôvodu že nemá stály prítok a jeho hladina závisí od výšky hladiny podzemnej vody.

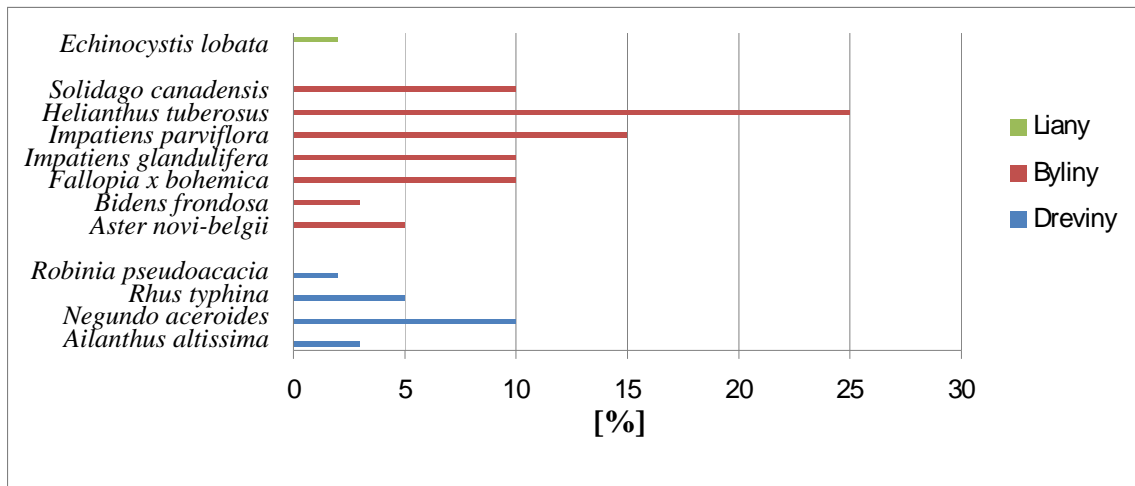


Obr. 2 Skúmané ramená: (1) Zátiešie, (2) Chrabranské rameno, (3) Belanov kút, (4) Ludanické rameno Foto: Gális, 2012

GPS súradnice ramien: Zátiešie ($48^{\circ} 34' 5'' / 18^{\circ} 11' 51,6''$), Chrabranské rameno ($48^{\circ} 31' 21'' / 18^{\circ} 9' 22,9''$), Belanov kút ($48^{\circ} 30' 49'' / 18^{\circ} 9' 55''$), Ludanické rameno ($48^{\circ} 29' 32'' / 18^{\circ} 7' 34''$).

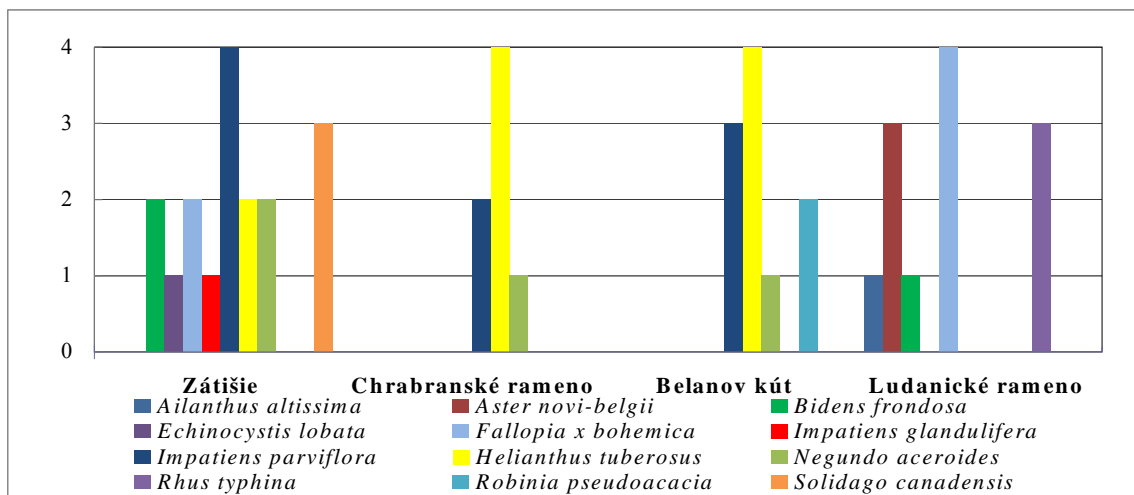
Výsledky a diskusia

Počas terénneho prieskumu vybraných ramien rieky Nitry sme zaznamenali prítomnosť 12 invázných druhov rastlín: pajaseň žliazkatý (*Ailanthus altissima*), astra novobelgická (*Aster novi-belgii*), dvojzub listnatý (*Bidens frondosa*), ježatec laločnatý (*Echinocystis lobata*), pohánkovec český (*Fallopia x bohemica*), netýkavka žliazkatá (*Impatiens glandulifera*), netýkavka malokvetá (*I. parviflora*), slnečnica hl'úznatá (*Helianthus tuberosus*), javorovec jaseňolistý (*Negundo aceroides*), sumach pálkový (*Rhus typhina*), agát biely (*Robinia pseudoacacia*) a zlatobyľ kanadská (*Solidago canadensis*). V území boli identifikované 4 druhy nepôvodných drevín, 7 druhov bylín a 1 druh liany (Obr. 3).



Obr. 3 Percentuálny podiel zaznamenaných invázných druhov rastlín v území

V sledovaných ramenách bol najčastejšie zaznamenaný výskyt druhu *Helianthus tuberosus*, ten vytváral viacero plošných zárastov v ekotónovom pásme ramien. Pomerne značnú početnosť dosahovali z bylín aj druhy: *Impatiens glandulifera*, *I. parviflora* a *Solidago canadensis* a kríženec *Fallopia x bohemica*. Zvyšné druhy sa vyskytovali v území fragmentárne, dosahovali zastúpenie len do 3%. Z drevín dominuje *Negundo aceroides* (10%), z lian *Echinocystis lobata* s 3% podielom. Taktiež sme hodnotili prítomnosť invázných druhov rastlín v jednotlivých ramenách. Na základe zvoleného rozdelenia sme mohli vyhodnotiť do akej miery je dané rameno invadované konkrétnymi inváznymi druhmi (Obr. 4).



Vysvetlivky: 1 - jednotlivé exempláre, 2 - skupiny, 3 - malé skupiny, 4 - veľké plošné zárusty

Obr. 4 Zastúpenie invázných druhov v sledovaných ramenách

Z jednotlivých ramien bol najväčší počet (8) invázných druhov zaznamenaný v ramene Zátiešie, najmenší počet (3) sa nachádzal v Chrabranskom ramene. Najčastejšie prítomným druhom v brehovom poraste ramien bol *Helianthus tuberosus* spolu s *Impatiens parviflora*. Rameno Zátiešie je pomerne silne invadované, nachádzalo sa tu až 8 z 12 invázných druhov. Dominujú druhy bylín na čele s *Impatiens parviflora* a *Solidago canadensis*. Chrabranské rameno sa vyznačuje najmä prítomnosťou druhu *Helianthus tuberosus*. Podobné druhové zastúpenie sa vyskytuje aj v ramene Belanov kút. V ekotónovom pásme dominujú *Helianthus tuberosus* spolu s *Impatiens parviflora*. Ludanické rameno sa svojim druhovým zložením najviac odlišuje od ostatných. V jeho blízkosti sa vyskytovali prevažne dreviny *Ailanthus altissima* a *Rhus typhina*. Zároveň sme u každého ramena sledovali vzdialenosť výskytu invázných druhov od hladiny vody a prípadné šírenie druhov do okolitej, zväčša poľnohospodárskej krajiny. Prevažná väčšina druhov sa vyskytovala v tesnej blízkosti vodnej hladiny: *Bidens frondosa*, *Impatiens glandulifera*, *Echinocystis lobata*. V ekotónovom pásme ramien a vodného toku sa vyskytovali: *Helianthus tuberosus*, *Impatiens parviflora*, *Robinia pseudoacacia* a *Solidago canadensis*. Z hľadiska potenciálneho šírenia druhov do okolitej krajiny, bola pozorovaná rozsiahla disperzia druhu *Helianthus tuberosus*. Jedinci druhu sa vyskytovali a prenikali aj do neďalekej poľnohospodárskej krajiny.

Zaznamenané invázne druhy dominovali v stanovištiach brehových porastov, vzniknutých ako dôsledok úpravy brehov a výrubu prirodzeného brehového porastu. Takto vzniknuté stanovišťa vytvárali vhodné podmienky pre introdukcii druhov v území umožňujúc exponenciálne šírenie po dosiahnutí len niekoľkých vhodných lokalít [9]. Ďalším dôležitým faktorom bola v prípade Ludanického ramena prítomnosť obce a rodinných záhrad, ako potenciálnych zdrojov invázných druhov. V tomto prípade bol zaznamenaný prienik druhov *Aster novi-belgii* a *Fallopia x bohemica* do brehových porastov ramena.

Záver

Hlavnými faktormi rýchleho šírenia invázných druhov rastlín pozdĺž brehových biotopov sú vysoké množstvo vyprodukovaných semien a ich šírenie prostredníctvom vody pričom najprv dochádza k vytvoreniu primárneho ohniska druhov a až druhotne k šíreniu pozdĺž toku a do okolitej krajiny [10]. V štyroch sledovaných ramenách rieky Nítry v rámci okresu Topoľčany sme zistili prítomnosť 12 invázných druhov rastlín. V území dominujú najmä druhy *Helianthus tuberosus* (prenikajúci aj do okolitej krajiny) a *Impatiens parviflora*, tvoriace často súvislé veľkoplošné zárasty. Invázne druhy sa vyskytovali prevažne v brehových porastoch ramien, v dôsledku dostupnosti živín, ale aj narušenia stanovišť.

Blízkosť vodného toku, zastavaných území mesta a obcí, antropické zásahy a potenciálne riziko záplav určujú silný predpoklad na introdukciu a prípadnú disperziu už prítomných invázných druhov do okolia.

Pod'akovanie

Tento príspevok vznikol vďaka podpore projektu VEGA 1/0232/12: Súčasný stav využívania krajiny a zmeny kontaktných zón vodných plôch vo vzťahu k biodiverzite.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Vrhovšek D., Korže A. V. (2008) Ekoremediácie kanaliziranih vodotokov. Limnos d. o. o. & Univerza v Mariboru, Filozofska fakulteta, Mednarodni center za sekoremediacije, Ljubljana & Maribor, p. 219
- [2] Fehér A. (2001) Invázne správanie sa rastlín v povodí rieky Nitry, Dizertačná práca, FZKI SPU v Nitre, p.161
- [3] Matějček T. (2009) Rozšíření invazních neofytů v břehové vegetaci vodních toků. Dizertační práce, katedra fyzické geografie a geoekologie, Přírodovědecká fakulta UK, Praha, p.131
- [4] Adámek Z. (1997) Rybářství ve volných vodách. East publishing, a.s., Praha, p. 5
- [5] Hood W. G., Naiman R. J. (2000, Plant Ecology, p. 148
- [6] Cvachová A., Gojdičová E., Karasová, E. (2002) Zoznam nepôvodných, invázných expanzívnych cievnatých rastlín Slovenska, Ochrana prírody, Banská Bystrica, p. 59
- [7] Cvachová A., Chromý P., Gojdičová E. et al. (2002) Príručka na určovanie vybraných invázných druhov rastlín, ŠOP SR, Banská Bystrica, p.62
- [8] Marhold K., Hindák F. (1998) Zoznam nižších a vyšších rastlín Slovenska. Veda, Bratislava, p. 687
- [9] Pyšek P., Prach K. (1993) Journal of Biogeography, 20, p.413
- [10] Pyšek P., Prach K. (1994) How Important are Rivers in Supporting Plant Invasions? In: De Waal, L.C. (eds.) Ecology and Management of Invasive Riverside Plants, John Wiley & Sons Ltd, p. 19

Štúdium bioakumulácie, fytotoxicity a predpoved' mobility a fytoprístupnosti ortuti pomocou aplikácie jednoduchej extrakčnej metódy (0,11 M kyselina octová) v systéme pôda-rastlina (*Hordeum vulgare* L.)

Michal Hlodák¹, Martin Urík¹, Peter Matúš¹, Marek Bujdoš¹, Ingrid Hagarová¹, Katarína Boriová¹, Marin Senila²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Ústav laboratórneho výskumu geomateriálov, Mlynská dolina G, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
michal.hlodak@gmail.com

²Institutul de Cercetări pentru Instrumentație Analitică, Donath St. 67, Cluj-Napoca, 400293-Rumunsko

Abstract

In our work we studied transfer, bioaccumulation and phytotoxicity of mercury in barley (*Hordeum vulgare* L.) grown on primarily non-contaminated (low background value of mercury), calcareous, humus-rich soil from Slovakia to which we added aqueous solution of water-soluble mercuric salt (HgCl₂) with various concentrations. The experiment was held under laboratory conditions within 7 days. The study also included application of single extraction method (0,11 M acetic acid) to soil samples in order to obtain easily available (or phytoavailable) pool of mercury. The „phytoavailable“ mercury content in soils was correlated with total mercury content in plants for each concentration. Obtained positive correlation relationship indicates, that application of 0,11 M acetic acid is effective method to predict phytoavailable pool of mercury in contaminated soils.

Key words: barley; mercury; bioaccumulation; single extraction; phytoavailability

Úvod a formulácia cieľa

Štúdium transferu a bioakumulácie a fytotoxicity ortuti v systéme pôda-rastlina patrí v posledných desaťročiach k vyhľadávaným témam vo vedeckých kruhoch [1, 2, 3]. Keďže celková koncentrácia ortuti v pôde nie je automaticky smerodajná pre vyhodnotenie jej mobility a potenciálnej prístupnosti pre rastliny a rizika z toho vyplývajúceho, záujem sa sústreďuje predovšetkým na aplikáciu metód umožňujúcich získať jednotlivé frakcie ortuti viazané na pôdne zložky a pomocou nich poznať správanie sa ortuti v systéme pôda-rastlina. Na získanie „fytoprístupnej“ frakcie ortuti sú používané rôzne analytické metódy, zahŕňajúce širokú škálu jednoduchých alebo sekvenčných extrakcií s následným stanovením pomocou vybraných inštrumentálnych analytických metód [4, 5, 6]. Je snaha vyhodnotiť efektívnosť jednotlivých extrakčných metód pri získavaní „fytoprístupných“ frakcií ortuti pomocou korelácie nimi extrahovateľnej ortuti z pôd s ortuťou akumulovanou v biomase rastlín rastúcich na týchto pôdach [7].

Cieľom tejto práce je štúdium bioakumulácie a fytotoxicity ortuti v jačmeni (*Hordeum vulgare* L.) kultivovanom na karbonátovej pôde s vysokým obsahom humusu s rôznou,

sekundárne optimalizovanou, koncentráciou ortuti a následné vyhodnotenie efektívnosti jednoduchej extrakčnej metódy (0,11 M kyselina octová) pri predpovedaní mobility a fytopristupnosti ortuti v systéme pôda-rastlina.

Materiál a metódy

Pôda, aplikovaná v experimente ako rastový substrát, pochádzala z lokality v blízkosti bývalej tehelne pri Senci (SV od mesta Senec). Odobratá bola vrchná časť (cca 20 cm) A-horizontu pôdy, ktorá bola následne klasifikovaná ako pôdny subtyp černoziem modálna, var. karbonátová. Odobratá pôda bola ponechaná na voľné sušenie v laboratórnych podmienkach.

Do 300 ml plastových kelímok (25 ks) bolo pridané po 200 g vysušenej (na konštantnú hmotnosť) a preosiatej pôdy (sito 0,5 cm). Do 20 kelímok s pôdou (kultivačných) bolo zasiate po 10 semien jačmeňa (*H. vulgare* L.). Následne bolo do každého kelímka (aj do 5 ks kontrolných kelímok – bez rastliny) pridané po 60 ml vodného roztoku s rôznou koncentráciou ortuti (príprava z HgCl_2) tak, aby finálna koncentrácia ortuti v pôde bola v rozsahu 0–130 mg.kg^{-1} Hg (5 koncentračných rozsahov). Pre každú koncentráciu bolo použitých 5 ks kelímok (4 ks kultivačných + 1 kontrolný bez rastliny). Kultivácia jačmeňa prebiehala v laboratórnych podmienkach pri stálej teplote 25°C a optimalizovaných svetelných podmienkach (16 h svetla počas 24 h). Po uplynutí prvých 3 dní experimentu bolo do každého kelímka pridané po 20 ml vodovodnej vody (kvôli udržaniu vlhkosti pôdy zodpovedajúcej približne poľnej vodnej kapacite).

Po 7 dňoch bol experiment ukončený, rastliny boli rozdelené na nadzemné časti a korene, bola zmeraná ich dĺžka, hmotnosť a obsah chlorofylov (*a*, *b*) v nadzemných častiach pomocou VIS spektrofotometra (SP-300, Optima, Japonsko) (cca 1 cm^2 z každej nadzemnej časti rastliny bol daný do 96 %-ného etanolu na 24 h a následne bola zmeraná absorbanca pri vlnovej dĺžke 649 a 665 nm) a boli ponechané na voľné sušenie pri stálej teplote 25 °C. Za rovnakých podmienok boli sušené aj pôdy. Totálny obsah ortuti v pôdach aj rastlinných častiach (ortuť bola stanovovaná len v nadzemných častiach) bol meraný pomocou atómovej absorpčnej spektrometrie studených pár CV AAS (AMA-254, Altec, ČR) pri vlnovej dĺžke 254 nm v roztoku po ich 5-dňovom otvorenom rozklade v konc. HNO_3 pri laboratórnej teplote, ale aj priamou aplikáciou CV AAS na tuhé vzorky pôd a rastlín (bez ich rozkladu). Pre vyššie koncentrácie ortuti muselo byť pri priamom meraní použité riedenie tuhých vzoriek s vyčisteným a vysušeným jemnozrnným Al_2O_3 z dôvodu obmedzeného kalibračného rozsahu prístroja (0,17 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ – 1,67 mg.kg^{-1} pre max. 300 mg navážku vzorky).

Správnosť výsledkov pre totálny obsah ortuti bola overená pomocou priamej CV AAS analýzy certifikovaných referenčných materiálov (CRM) pôd (SO-2, SO-4, Montana soil 2710, Montana soil 2711) a listov topoľa (GBW 07604) v roztoku po ich otvorenom rozklade v konc. HNO_3 pri laboratórnej teplote.

„Fytopristupná“ ortuť v pôde bola získaná pomocou extrakcie 0,11 M kyselinou octovou. Táto extrakcia zahŕňa aplikáciu 40 ml $0,11 \text{ mol.l}^{-1}$ kyseliny octovej (kyslá extrakcia) na 1 g vysušenej pôdy. Extrahované vzorky (v polyetylénových nádobkách) boli počas 16 hodín (trvanie extrakcie) trepané na trepačke a následne centrifugované pri 2500-3000 ot./min počas 20 minút. Supernatant bol opatrne zliaty a následne v ňom bol stanovený obsah ortuti pomocou metódy CV AAS (AMA-254).

Efektivita 0,11 M kyseliny octovej pre predpovedanie množstva „fytopristupnej“ ortuti v analyzovaných pôdach bola identifikovaná pomocou korelácie ortuti v suchej biomase nadzemných častí rastlín s „fytopristupnou“ ortuťou v pôdach.

Pôdne a chemické analýzy rastového substrátu

V pôde bola stanovená, podľa zaužívaných metodík, aktívna a výmenná pôdna reakcia ($\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}} - 7,98$; $\text{pH}_{\text{KCl}} - 7,45$), obsah humusu (4,9 %) a fónová koncentrácia ortuti ($0,061 \text{ mg.kg}^{-1}$).

Výsledky a diskusia

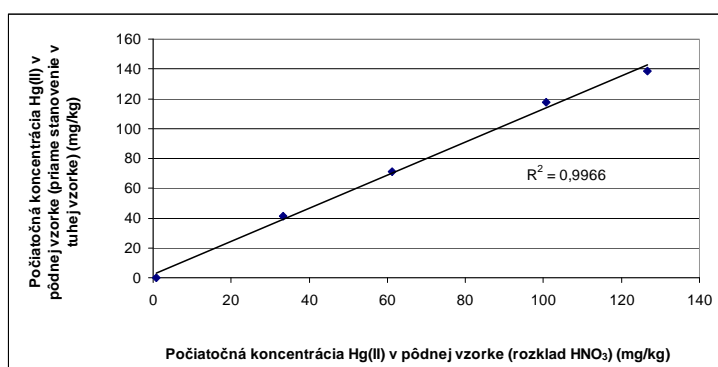
Ilustračná fotografia experimentu zreteľne poukazuje na inhibičný účinok zvyšujúcej sa koncentrácie ortuti v pôde na rast rastlín jačmeňa (*H. vulgare* L.). Inhibícia rastu sa výraznejšie prejavovala pri koncentrácii ortuti v pôde nad 50 mg.kg^{-1} (**Obr. 1**).



Obr. 1 Ilustračná fotografia experimentu (koncentrácia ortuti v pôde sa zvyšuje zľava doprava)

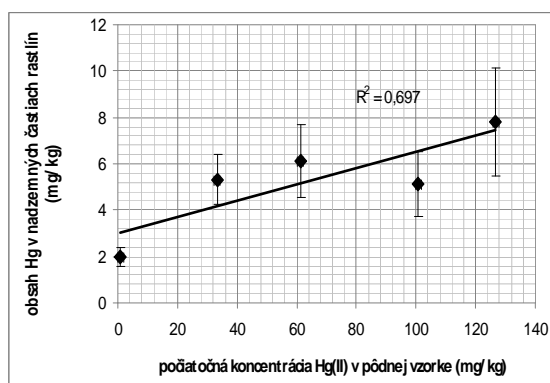
Počiatočná koncentrácia ortuti v pôde meraná priamo v tuhej vzorke významne

korelovala s hodnotami nameranými v roztoku po rozklade konc. HNO_3 (**Obr. 2**). Výsledky, zmerané v roztoku po rozklade pôdy konc. HNO_3 , boli ale mierne znížené oproti hodnotám celkového obsahu ortuti, získanými priamou aplikáciou CV AAS. Uvedené rozdiely súvisia zrejme s nedokonalým rozkladom pôdnej vzorky pri laboratórnej teplote, resp. s čiastočným únikom pár ortuti počas 5-dňového otvoreného rozkladu s HNO_3 . Podobné rozdiely v totálnych koncentráciách ortuti, zmeranými oboma spôsobmi, boli získané aj pre rastlinné vzorky. Z uvedených dôvodov bolo v ďalších meraniach použité priame stanovenie celkovej ortuti v tuhých vzorkách pôd a rastlín bez ich rozkladu, ktorého správnosť bola navyše overená priamou CV AAS analýzou CRM. (**Obr. 2**).



Obr. 2 Vyhodnotenie korelácie medzi počiatočnou koncentráciou Hg (II) v pôdnej vzorke ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) stanovenou v roztoku po rozklade pôdy konc. HNO_3 a počiatočnou koncentráciou Hg (II) v pôdnej vzorke ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) stanovenou priamo v tuhej vzorke pomocou CV AAS

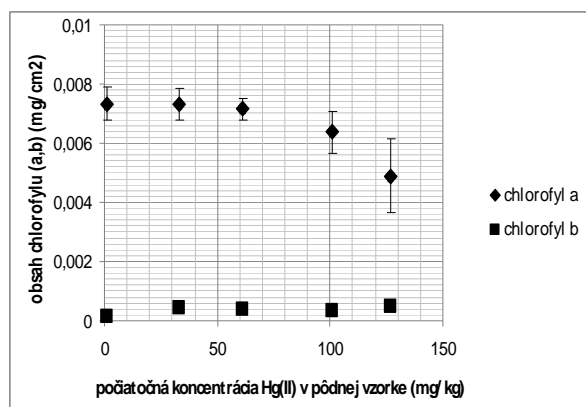
Obsah ortuti v nadzemných častiach rastlín jačmeňa pozitívne koreloval so zvyšujúcou sa počiatočnou koncentráciou ortuti v pôde. Hodnota obsahu ortuti v nadzemných častiach bola však takmer totožná pri koncentrácii ortuti v pôde $33,3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a $100,7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (**Obr. 3**).



Obr. 3 Vyhodnotenie závislosti medzi počiatočnou koncentráciou Hg (II) v pôdnej vzorke ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a celkovým obsahom ortuti v nadzemných častiach rastlín ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

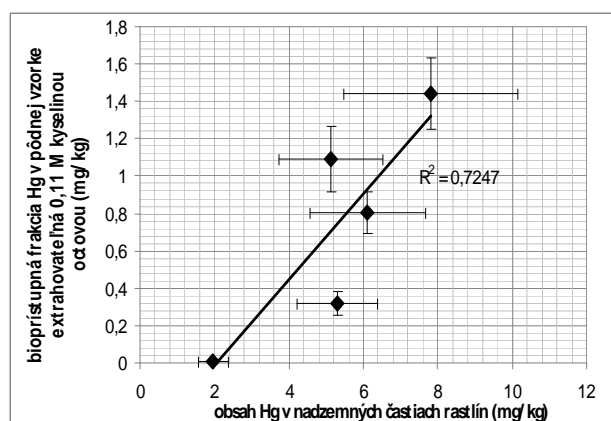
Obsah chlorofylu *a* v nadzemných častiach rastlín s narastajúcou koncentráciou ortuti

v pôde klesal, čo sa prejavilo najmä pri vyšších koncentráciách ortuti, kým obsah chlorofylu *b* zostal relatívne konštantný (**Obr. 4**).



Obr. 4 Vyhodnotenie závislosti medzi počiatkovou koncentráciou Hg (II) v pôdnej vzorke ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a obsahom chlorofylu (*a,b*) v nadzemných častiach rastlín jačmeňa ($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$).

Bola zistená pozitívna korelácia medzi celkovým obsahom ortuti v nadzemných častiach rastlín jačmeňa a obsahom „fytoprístupnej“ ortuti v pôdach, čo však treba interpretovať opatrne v dôsledku vypočítaných vyšších hodnôt relatívnych štandardných odchýlok (RSD) v intervale 20 až 30 % pri hodnotách ortuti v nadzemných častiach rastlín a 13 až 35 % pri hodnotách „fytoprístupnej“ ortuti v pôdach, ako aj kvôli možnosti vstupu ortuti do rastlín cez vzduch (pary ortuti) (**Obr. 5**). Pomerne vysoké hodnoty RSD sa dajú okrem „problematického analytu“ zdôvodniť aj prípadnou nedostatočnou homogenizáciou analyzovaných rastlinných a pôdných vzoriek.



Obr. 5 Korelácia medzi celkovým obsahom ortuti v nadzemných častiach rastlín ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a obsahom ortuti v pôde ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) extrahovanej 0,11 M kyselinou octovou.

Záver

Náš experiment potvrdil fytotoxický účinok ortuti, čo sa prejavilo inhibíciou rastu kultivovaných rastlín jačmeňa (*Hordeum vulgare* L.) a znížením obsahu chlorofylu *a*, zatiaľ čo obsah chlorofylu *b* zostal relatívne konštantný. Bol preukázaný transfer a bioakumulácia ortuti v nadzemných častiach rastlín. Je však, najmä v prípade pôd s nízkou koncentráciou ortuti, obtiažne určiť vstup ortuti do rastlín (z pôdy alebo zo vzduchu).

Zistená pozitívna korelácia medzi ortuťou akumulovanou v nadzemných častiach rastlín jačmeňa a ortuťou extrahovanou jednoduchou extrakciou 0,11 M kyselinou octovou môže indikovať efektívnosť tejto extrakčnej metódy pri predikcii obsahu fytopristupnej ortuti v kontaminovaných pôdach.

PodĎakovanie

Práca bola podporená grantom VEGA 1/0860/11 a grantom APVV SK-RO-0004-12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Moreno-Jiménez E., Gamarra R., Carpena-Ruiz R.O. et al. (2006) *Chemosphere* 63, p. 1969
- [2] Moreno-Jiménez E., Peñalosa J.M., Esteban E. et al. (2007) *J. Plant Nutr. Soil Sc.* 170, p. 485
- [3] Suszcynsky E.M., Shann J.R. (1995) *Environ. Toxicol. Chem.* 14, p. 61
- [4] Millán R., Gamarra R., Schmid T. et al. (2006) *Sci. Total Environ.* 368, p. 79
- [5] Sánchez D.M., Quejido A.J., Fernández M. et al. (2005) *Anal. Bioanal. Chem.* 381, p. 1507
- [6] Wang X., Shan X., Zhang S. et al. (2004) *Chemosphere* 55, p. 811
- [7] Kubová J., Matúš P., Bujdoš M. et al. (2008) *Talanta* 75, p. 1110

Využitie podkladových máp vytvorených v prostredí GIS v posudzovaní vplyvov na životné prostredie

Erika Igondová

Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra krajinnej ekológie, Mlynská dolina B-2, 84215 Bratislava, Slovenská republika; erika.igondova@gmail.com

Abstrakt

This work deals with the use of the underlying maps created in environment of GIS (Geographic Information Systems) for the EIA (Environmental Impact Assessment) and EcIA (Ecological Impact Assessment). Taking the example of the area where the planned road I/64 Kľače – Šuja is and inside defined zone of expecting negative impacts range caused by influence of road linear construction (2 km) it evaluates the current landscape structure (land use) and compares the spatial differentiation of the individual landscape structure categories. It creates a map of positive elements on the base of individual landscape structure categories, elements of natural protection and territorial system of ecological stability and evaluates their spatial distribution. According to [4] it generates the example of potential ecological impacts map of the proposed road. It talks about the potential use of these types of maps for the process of Environmental impact assessment.

KLúčové slová: EIA; GIS; krajinná štruktúra; pozitívne prvky; ekologické vplyvy; navrhovaná cesta

Úvod a formulácia cieľa

Posudzovanie vplyvov na životné prostredie je proces identifikácie, predikcie, hodnotenia a zmiernenia environmentálnych, sociálnych a iných relevantných vplyvov navrhovaných projektov a konkrétnych aktivít (EIA) ako aj navrhovaných plánov a programov (SEA, Strategic Environmental Assessment) pred rozhodovacím procesom a pred uskutočnením záväzkov [10].

EcIA je „proces identifikácie, kvantifikácie a hodnotenia potenciálnych vplyvov definovaných akcií na ekosystémy alebo ich komponenty“. Je dôležitým nástrojom pre zachovanie a dosiahnutie trvalo udržateľného rozvoja. Hlavné využitie EcIA je v širšej pôsobnosti hodnotenia vplyvov na životné prostredie [3, 13].

V posledných rokoch sa miera aplikácie GIS technológií pre proces posudzovania vplyvov na životné prostredie neustále zvyšovala. Vo vzťahu k jednotlivým fázam EIA, môžu byť použité buď priamo alebo ako podporný nástroj vo všetkých fázach tohto procesu. Okrem toho GIS technológie môžu byť využité ako nástroj na následné monitorovanie vplyvov, manažment projektu a adaptívne riadenie [2, 6]. Jednou z hlavných funkcií GIS je zber dát, ktorého výsledkom je vytvorenie databázy.

Pre EcIA by takáto databáza mala pozostávať z mapy krajinnej štruktúry, topografickej mapy, mapy ochrany prírody a krajiny, pôdnej mapy, geologickej mapy a klimatickej mapy. Kvalita a presnosť mapy krajinnej štruktúry by mala byť limitujúcim faktorom pre nasledovné ekologické hodnotenie [5].

Vo všetkých fázach rozvoja cestnej dopravy od výstavby cez využívanie a údržbu ciest je ovplyvňovaný fyzický a chemický stav pôd, tok vody, kvalita ovzdušia a vody, ako aj rastliny a živočíchy. Vplyvy ciest na životné prostredie takisto závisia aj od prevládajúcej krajinnej štruktúry teda vytváranie máp krajinnej štruktúry je preto jedným z vhodných mapových podkladov pri hodnotení vplyvov [4]. Cieľom tejto práce je vytvorenie mapy krajinnej štruktúry a mapy pozitívnych prvkov vyskytujúcich sa v území a porovnanie priestorovej distribúcie jednotlivých kategórií prvkov v rámci vymedzeného územia popri navrhovanom obchvate cesty I/64 Kľače – Šuja a zhodnotenie využitia týchto podkladových máp pre proces posudzovania vplyvov (EIA) a pre ekologické hodnotenie (EcIA).

Materiál a metódy

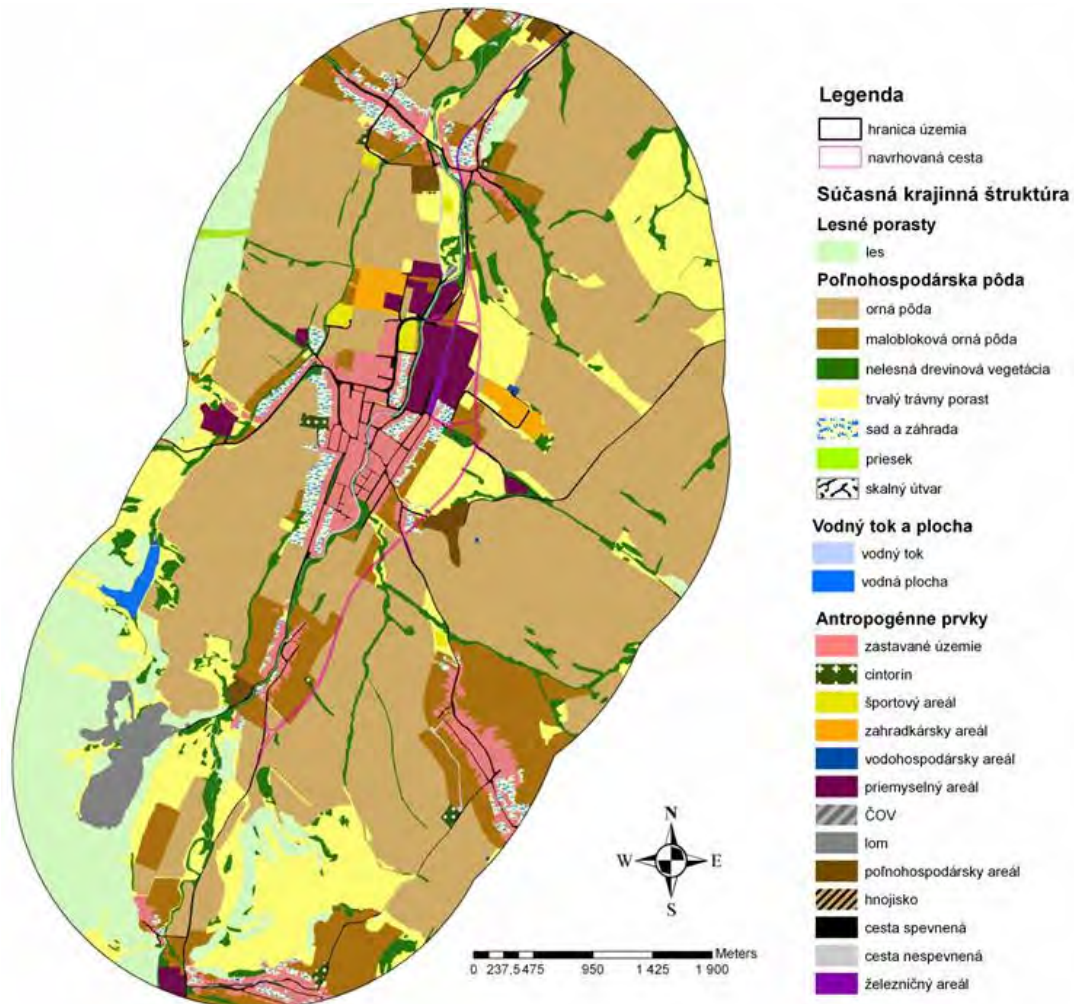
Ako modelové územie bolo zvolené územie v okolí navrhovaného obchvatu cesty I/64 Kľače – Šuja, ktoré sa nachádza medzi obcami Kľače, Rajec, Šuja, Ďurčiná a Rajecká Lesná medzi Lučanskou Malou Fatrou a Strážovskými vrchmi.

Pri hodnotení ekologických vplyvov spevnených ciest je zóna vplyvu obyčajne asymetrická, rozširuje sa von na oboch stranách cesty. Vzdialenosť vplyvu varíruje v závislosti od druhu, lokality a typu disturbancie. Vymedzené územie bolo 2 km okolo plánovaného obchvatu cesty I/64 Kľače – Šuja z hľadiska predpokladaného dosahu negatívnych vplyvov líniovej cestnej stavby. V programe ArcGIS 9.3. bola vytvorená mapa súčasnej krajinnej štruktúry, mapa pozitívnych prvkov v území na základe dostupných vrstiev, podkladových ortofotomáp a terénneho prieskumu. Z jednotlivých kategórií prvkov krajinnej štruktúry boli vybraté pozitívne prvky, ku ktorým boli priradené prvky ochrany prírody, prírodných zdrojov a územného systému ekologickej stability na základe čoho bola vytvorená mapa pozitívnych prvkov v území. Podľa [4] bol vytvorený príklad mapy priestorového dosahu vybraných potenciálnych ekologických vplyvov navrhovanej cesty na biotu.

Výsledky a diskusia

Súčasnú krajinnú štruktúru skúmaného územia tvorí 23 prvkov (Obr. 1) rozdelených do 4 kategórií (lesné porasty, poľnohospodárska pôda, vodný tok a plocha, antropogénne

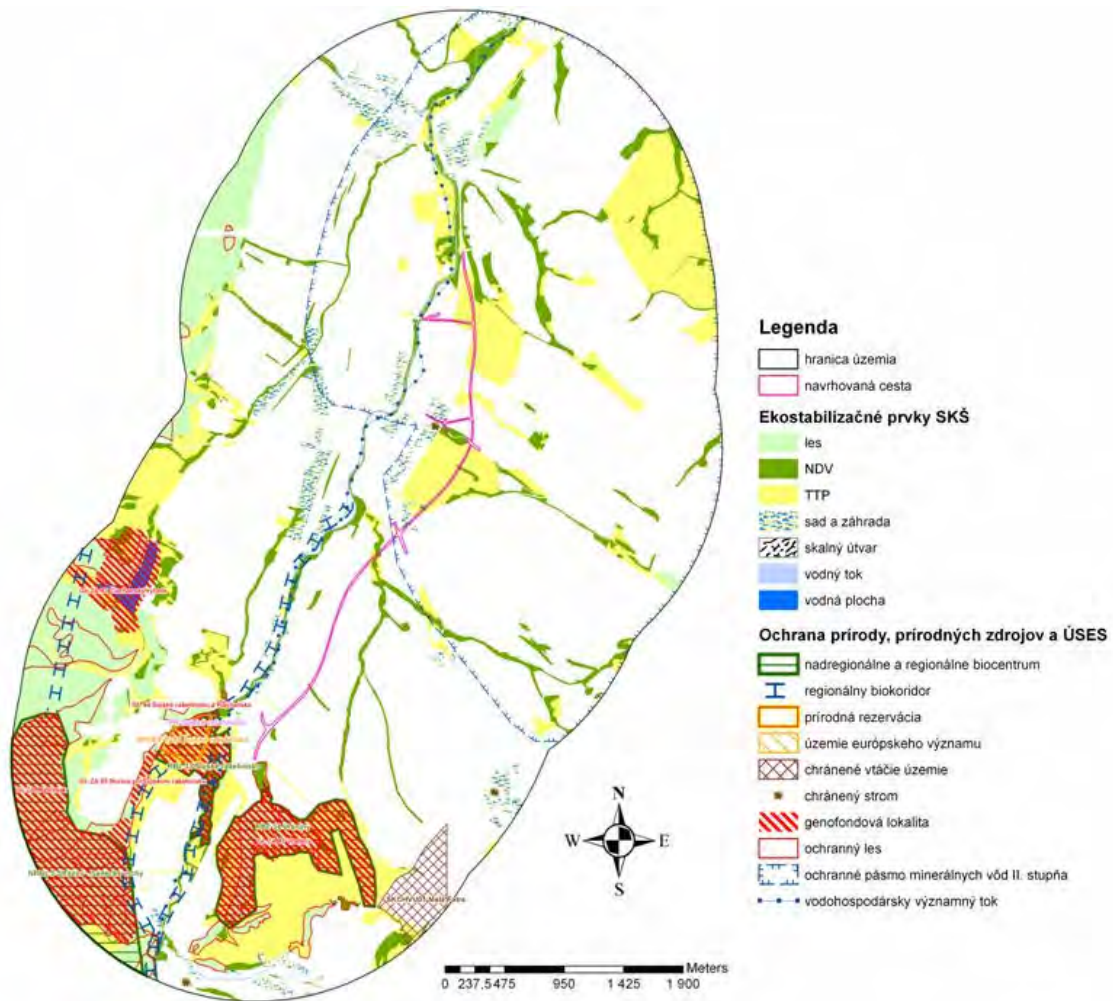
prvky). Najväčšie zastúpenie v území majú orná pôda, trvalé trávnaté porasty a les. Celková rozloha územia je 3276,08 ha. Prevažná väčšina záberu plánovaného obchvatu je tvorená ornou pôdou, trvalými trávnatými porastmi (TTP) a maloblokovou ornou pôdou.



Obr. 1 Mapa súčasnej krajinej štruktúry v okolí plánovaného obchvatu cesty I/64 Kľače – Šuja na základe [9]

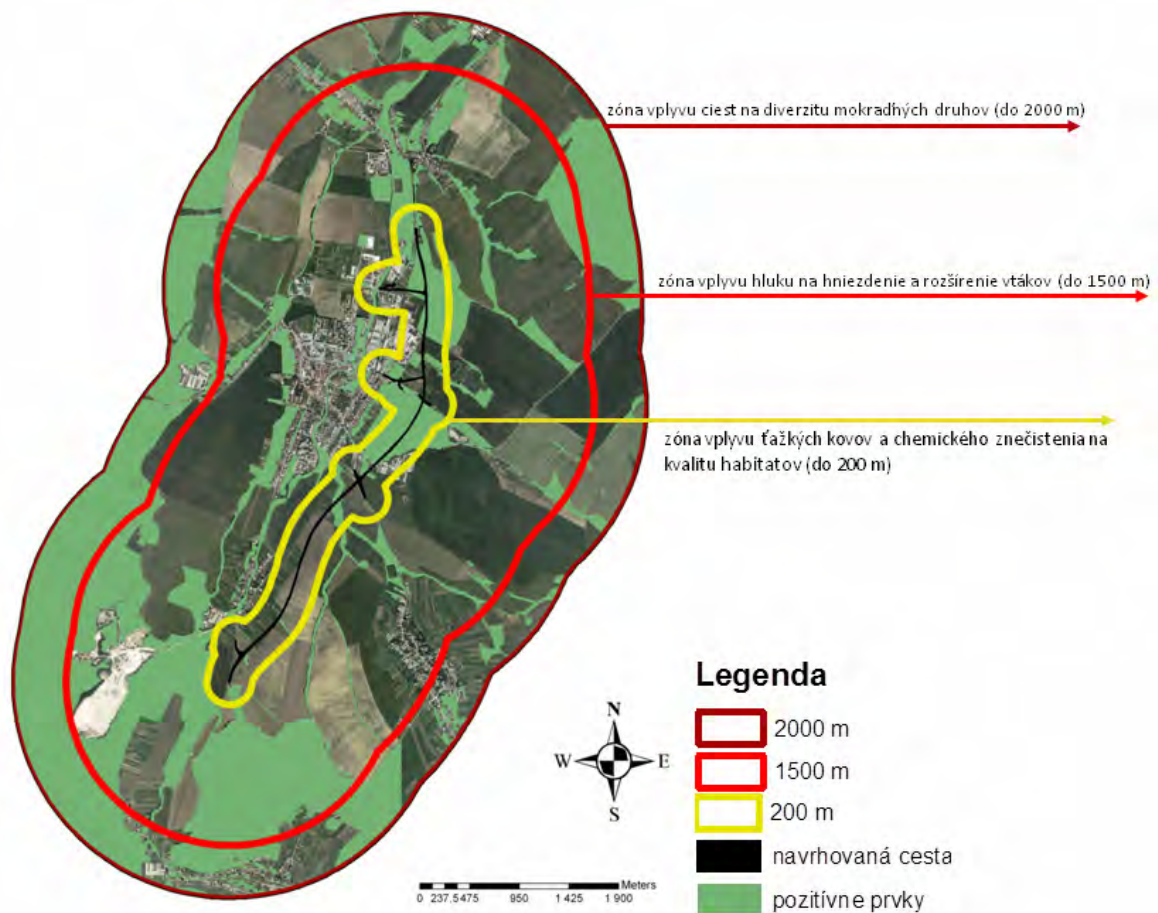
V mape pozitívnych prvkov (Obr. 2) boli premietnuté ekostabilizačné prvky súčasnej krajinej štruktúry (les, nelesná drevinová vegetácia (NDV), TTP, sad a záhrada, skalný útvar, vodný tok, vodná plocha), prvky ochrany prírody, prírodných zdrojov a krajiny (prírodná rezervácia, územie európskeho významu, chránené vtáčie územie, chránený strom, ochranný les, ochranné pásmo min. vôd a vodohospodársky významný tok) a prvky územného systému ekologickej stability (nadregionálne a regionálne biocentrum, regionálny biokoridor a genofondové lokality). Z toho najväčšiu plochu zaberalo ochranné pásmo minerálnych vôd, TTP a les. V území sa nachádza regionálny biokoridor s dĺžkou 4,41 km

a vodohospodársky významný tok Rajčanka s dĺžkou 9,3 km. Medzi regionálne biocentrá patrí Strážov a Vraniny. Genofondové lokality v území sú Borina pri Šujskom rašelinisku, Sрниak, Čierňanský rybník a Rajčanka. Do územia zasahuje aj Chránené vtáčie územie (CHVÚ) Malá Fatra. Najcennejšie z hľadiska ochrany v území je Šujské rašelinisko, ktoré je zároveň regionálnym biocentrom, územím európskeho významu (ÚEV), maloplošným chráneným územím ako aj genofondovou lokalitou [7, 8, 11, 12, 14].



Obr. 2 Mapa pozitívnych prvkov krajiny v okolí plánovaného obchvatu cesty I/64 Kľače – Šuja na základe [7, 8, 11, 12, 14]

Mapa zón potenciálnych ekologických vplyvov navrhovanej cesty bola vytvorená podľa štúdie príkladov intenzity vplyvov spevnených ciest na biotu [4] a jej priemet s pozitívnymi prvkami v krajine je znázornený na obr. 3. Takáto mapa nám hovorí o priestorovom dosahu možných negatívnych vplyvov vo vymedzenom území.



Obr. 3 Príklad mapy zón možných ekologických vplyvov navrhovanej cesty podľa [4]

Záver

GIS je veľmi efektívnym nástrojom na zhromažďovanie, manažovanie a analýzu dát ako aj na ich vizualizáciu. Znižuje subjektivitu procesu prípravy EIA a zabezpečuje transparentnosť rozhodovania sa medzi možnými variantmi [1]. Predkladaný príspevok sa zaoberal využitím mapy krajinnej štruktúry, ktorá by mala byť jedným z podkladov pre proces posudzovania vplyvov, pretože poskytuje ucelený pohľad na územie. Mapa pozitívnych prvkov vyskytujúcich sa v sledovanom území hovorí o prvkoch v krajine, ktoré nemožno pri posudzovaní vplyvov zanedbávať. Tieto mapy by tak isto mali byť jedným z podkladov pre hodnotenie negatívnych vplyvov činností, a teda aj ciest, na okolitú krajinu, pretože nám dávajú základné informácie o štruktúre územia. Mohli by sa využiť najmä pre potreby ekologického hodnotenia vplyvov a teda pre potreby skúmania dopadu vplyvov ciest na ekosystémy. Posledným výstupom je príklad mapy vzdialenosti možných ekologických

vplyvov navrhovanej cesty, ktorá na základe zobrazenia vzdialeností potenciálnych vplyvov na biotu by mohla byť vhodným podkladom pre podnet na vypracovanie ďalších štúdií, ktoré by sa zameriavali na hodnotenie vplyvov na biotu a na monitoring.

Pod'akovanie

Tento článok vznikol vďaka podpore prideleného Grantu UK číslo UK/94/2013.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Agrawal M. L., Dikshit A. K. (2002) *Indian Cartographer*, 22, p. 266
- [2] Atkinson, S.F., Canter, L.W., Mangham, W.W. (2008) Special Topic Meeting on Assessing and Managing Cumulative Environmental Effects, International Association for Impact Assessment, November 6-9, Calgary, Alberta, Canada
- [3] Burdge, R. J. (1991) *Impact Assessment Bulletin* 9 (4), p. 93 - 105
- [4] Committee on Ecological Impacts of Road Density, 2005. *Assessing and Managing the Ecological Impacts of Paved Roads*, The National Academies Press, Washington D. C. (www.nap.edu), 294 p.
- [5] Gontier M. (2005) Integrating landscape ecology in environmental impact assessment using GIS and ecological modeling. In: Tress B., Tress G., Opdam, P. (eds.) *From landscape research to landscape planning*, Springer, Wageningen UR Frontis series, ISSN 1573-4544;
- [6] Joao E.M., Fonseca, A. (1996) *Impact Assessment*, 14 (4), p. 371-387
- [7] Kristinik S., Krajč P. et al. (2008) *Územný plán mesta Rajec*, p. 175
- [8] Mederly P., Krautschneider J., Sýkora F. et al. (2008) *Projekt jednoduchých pozemkových úprav v k. ú. Rajecká Lesná*
- [9] *ortofotomapy 2002*
- [10] Pavličková K., Kozová M., Miklošovičová A. et al. (2009) *Posudzovanie vplyvov na životné prostredie, vysokoškolský učebný text, UK v Bratislave*, p. 122
- [11] Rybáriková R., Blažek R., Huljak K. et al. (1997) *MÚSES Rajec*
- [12] SAŽP (2006) *RÚSES okresov Žilina, Bytča, Kysucké Nové mesto*
- [13] Treweek J. (1995) *Impact Assessment*, p. 289 – 315
- [14] ŠOP SR

Štúdium transferu niklu z pôd do rastlín v geochemicky anomálnych oblastiach centrálno-karpatského paleogénu a magurskej časti flyšového pásma Slovenska

Martin Kolesár

Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra geochémie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovensko; kolesar@fns.uniba.sk

Abstrakt

Some soils in the Central Carpathian Paleogene basin and Magura Formation of Eastern Slovakia are characterized by geochemically anomalous nickel content. In these soils nickel is mobile and available to plants, depending most on soil condition. Plants readily take up nickel that is dissolved in the soil solutions. Subsequently Ni may be translocated from the roots and accumulated in the tops of the plant. Ni content in leaves, needles and cereal grains of plants in studied area often exceeding 10 mg.kg^{-1} . Transfer factor (TF) has been helpful for knowing transfer of Ni from soil to plant. This transfer in plants depends on several soil properties. In this relationship important factors are mostly Fe and Al content in soil as well as the proportion of clay fraction, cation-exchange capacity (CEC), and soil acidity (pH). Each plant species is unique in relation to intake of trace elements from soil, so we cannot apply the same formula for every plant safely.

KLúčové slová: *geogénne anomálne koncentrácie niklu; mobilita niklu; transferový faktor; pôdne vlastnosti*

Úvod

Priemerný obsah niklu je v pôdach Slovenska približne rovnaký ako jeho priemerný obsah udávaný pre svetové pôdy. Bazálny geochemický obsah Ni na Slovensku pre A-horizonty pôd je hodnota 25 mg.kg^{-1} a pre C-horizont 28 mg.kg^{-1} [1]. Nielen stúpajúca koncentrácia tohto prvku s hĺbkou pôdneho profilu, ale taktiež v niektorých prípadoch jeho asociácia s chrómom, kobaltom, vanádom, mangánom, alebo horčíkom potvrdzuje jeho geogénny pôvod. Najväčšie koncentrácie presahujúce 35 mg.kg^{-1} Ni v pôdach (limitná A hodnota pre Ni v pôdach SR) [2] sa viažu na flyšové pásmo a centrálno-karpatský paleogén. Tieto pôdy sa vyvinuli na materských horninách, ktoré boli podľa doterajších poznatkov derivované z detritu ultrabázických hornín. Ide o výrazne geogénne kontaminované pôdy, ktoré vykazujú znaky tzv. serpentinitických pôd. Obsahy Ni v povrchových horizontoch týchto pôd presahujú miestami 600 mg.kg^{-1} [3].

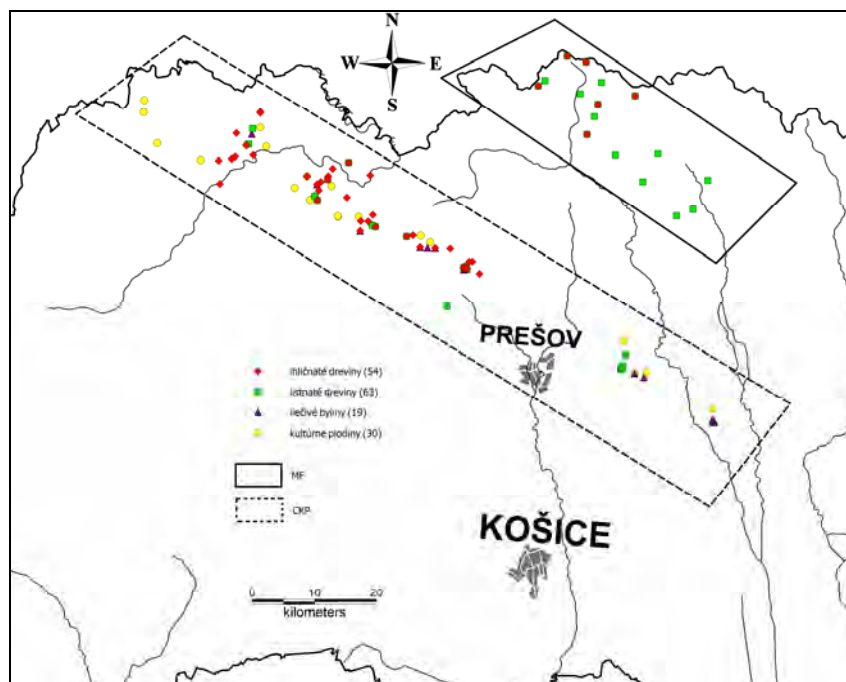
Ni sa v skúmaných pôdach viaže prevažne na ílovú frakciu, alebo na oxidy Fe a Mn. Vplyvom pôdnych faktorov sa nikel dokáže uvoľňovať do pôdneho roztoku a je bioprístupný pre rastliny. Vysoké obsahy tohto prvku v asimilačných orgánoch lesných drevín na Slovensku boli zistené práve vo flyšových oblastiach na SV a SZ krajiny [4]. Spočiatku im bol prisudzovaný antropogénny charakter, avšak neskoršie štúdie jasne potvrdili, že sa jedná

o geogénny pôvod [3]. Priemerná koncentrácia Ni v skúmaných rastlinách tejto oblasti je $6,6 \text{ mg.kg}^{-1}$. Najvyššie nameranú koncentráciu Ni sme potvrdili v ihličí *Abies alba* ($34,5 \text{ mg.kg}^{-1}$). V porovnaní s priemernou hodnotou pre tento druh na Slovensku udávaný Maňkovskou [4] je to takmer 10 násobne vyššia koncentrácia. Nielen u tohto druhu, ale u väčšiny typických lesných drevín, bylín a obilnín odoberaných na skúmaných lokalitách koncentrácie Ni prekročovali fónové hodnoty.

Popri možných druhových rozdieloch, na prístupnosť Ni do rastlín vplýva celý rad pôdnych faktorov. Pri posúdení týchto faktorov sme vychádzali z tzv. transferového faktora. Cieľom tejto práce bolo práve štúdium vplyvov rôznych pôdnych vlastností na prestup Ni do rastliny.

Opis skúmanej lokality

Vzorky rastlín boli odoberané v zóne centrálno-karpatského paleogénu (CKP) a magurského flyšu (MF), na miestach kde boli potvrdené anomálne koncentrácie Ni v pôdach. Odberné miesta v CKP spadali do územia tiahnuceho sa zo SZ, od poľských hraníc, smerom na JV až k Vranovu nad Topľou. Je to úzky pás, ktorý sa rozprestiera na západ pozdĺž bradlového pásma. V oblasti MF bolo územie situované v severnom cípe trojuholníka medzi mestami Bardejov, Zborov a Svidník (obr. 1).



Obr. 1 Mapa lokalizácie odberných miest rastlinných vzoriek v CKP (156) a MF (36)

Materiál a metódy

Zmesné vzorky pôd boli odoberané zo 4 až 5 miest po obvode štvorca (20x20m) pôdnym vrtákom z povrchových horizontov, v množstve 2 - 3 kg. Boli vysušené v laboratórnych podmienkach, mierne podrvené a sitované za sucha na získanie frakcie pod 2 mm. Z rastlín boli odoberané listy, stonky a ihličie. Z obilnín sa zberali zrná. Analyzovaných bolo celkovo 23 druhov rastlín. Jednalo sa o typické voľne rastúce dreviny a byliny, ako aj kultúrne plodiny. Z listnatých drevín boli odobraté listy týchto druhov: *Fagus sylvatica*, *Carpinus betulus*, *Quercus* spp., *Betula pendula*, *Salix alba*, *Populus alba*, *Fraxinus excelsior* a *Acer pseudoplatanus*. Z ihličnanov sa zberalo ihličie stromov: *Picea abies*, *Abies alba*, *Pinus sylvestris* a *Larix decidua*. Zástupcov liečivých bylín tvorili: *Taraxacum officinale*, *Agrimonia eupatoria* a *Plantago lanceolata*. Z kultúrnych plodín boli odobraté vzorky: *Medicago sativa*, *Avena sativa*, *Brassica napus*, *Glycine max*, *Hordeum vulgare*, *Secale cereale*, *Solanum tuberosum* a *Triticum sativum*.

Pôdne i rastlinné vzorky boli analyzované metódou ICP-ES, resp. ICP-MS v laboratóriách ACME Analytical Laboratories Ltd., Vancouver (Kanada). Zrnitosť, obsah karbonátov, obsah organickej hmoty, kationová výmenná kapacita, nasýtenie sorpčného komplexu pôd boli merané v analytických laboratóriách Výskumného ústavu pôdoznanectva a ochrany pôdy Bratislava.

Výsledky a diskusia

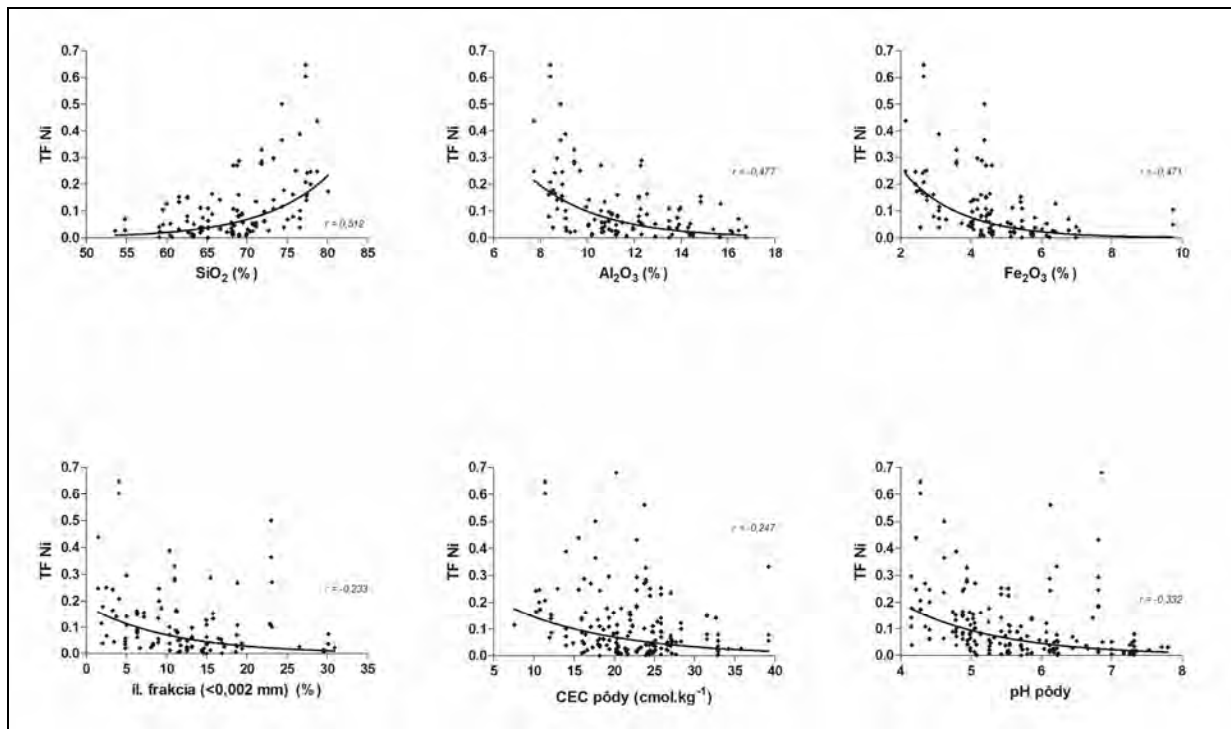
Na určenie schopnosti rastlín translokovať nikel z pôd sme použili vzťah medzi jeho totálnou koncentráciou v pôde a rastline. Pomer totálneho obsahu Ni v rastline a pôde sa zvykne označovať ako bioakumulačný koeficient (BAC), index bioakumulácie (IBA) alebo transferový faktor (TF) [5]. Termín transferový faktor bol definovaný Freytagom [6]:

$$TF = \frac{C \text{ rastliny (sušina)}}{C \text{ pôdy (sušina)}}$$

[1.]

TF je bezrozmerná veličina vyjadrujúca hodnotu predpokladaného príjmu prvku rastlinou z pôdy za rovnovážnych podmienok. Čím je táto hodnota väčšia, tým je väčší i príjem prvku rastlinou. V našom prípade sa hodnoty TF u Ni pohybovali v rozmedzí 0,003 –

0,68. Nebol zistený prípad akumulácie tohto prvku študovanými rastlinami, keďže hodnoty boli nižšie ako 1. Najvyššie priemerné hodnoty TF Ni boli zistené u listnatých drevín, a to predovšetkým u *Carpinus betulus* a *Fagus sylvatica*.



Obr. 2 Závislosť medzi pôdnymi vlastnosťami a TF Ni (180 vzoriek)

Na príjem Ni z pôdy do rastliny majú vplyv predovšetkým vlastnosti pôdneho substrátu, na štúdium ktorých sme sa v príspevku zamerali najviac. Spomedzi chemických vlastností pôd prejavoval najvyššie korelácie s TF Ni podiel hlavných pôdotvorných oxidov (SiO_2 , Al_2O_3 a Fe_2O_3), obsah ílovej zložky v pôde, kationová výmenná kapacita (CEC) a pôdna reakcia (pH) (Obr. 2). Z vysokej pozitívnej korelácie medzi obsahom kremíka v pôde a TF Ni vyplýva skutočnosť, že nielen chemická vlastnosť pôdy, ale i jej fyzikálna, a to zrnitostné zloženie má významný vplyv na príjem Ni rastlinami. SiO_2 sa totiž viaže na piesčitú frakciu a jeho obsah teda stúpa v zrnitostnejšie ľahších pôdach. Keďže kationy Ni^{2+} sa nedokážu sorbovať na piesčitú frakciu budú sa v pôde nachádzať vo vymeniteľnej forme – prístupnej pre rastliny. Príjem Ni do rastlín bude naopak klesať v pôdach s prevahou ílovej frakcie, čo potvrdzuje aj nami zistená korelácia medzi ílovou frakciou a TF Ni. Nikel sa v pôde veľmi ochotne viaže na ílovú frakciu, ktorá má vysokú sorpčnú kapacitu [7]. V ílovitých pôdach bude teda Ni imobilizovaný vplyvom sorpcie na ílovú zložku pôdy a menej prístupný

pre rastliny. V takýchto pôdach je taktiež vyššia CEC a to sa odrazilo aj na vzťahu medzi ňou a TF Ni, ktorý klesal so stúpajúcou hodnotou CEC. Najvyššie negatívne korelácie boli zistené medzi TF Ni a obsahmi Fe a Al v pôde. Vplyv oxihydroxidov Fe a Mn na bioprístupnosť Ni je zásadný pre väzbu Ni na tieto látky v pôdach [5]. Významnú pozitívnu koreláciu medzi obsahom Fe a Al v pôde a obsahom Ni potvrdili viacerí autori [8,9]. Vo väčšine prípadov hrá dôležitú rolu v miere bioprístupnosti prvku z pôdy do rastliny pôdna reakcia. I pre naše vzorky platí skutočnosť, že so znižujúcou sa hodnotou pH stúpa príjem Ni rastlinami. S jej stúpajúcou hodnotou dochádza v pôde k tvorbe málo rozpustných komplexov Ni a teda k zníženiu jeho prístupnosti pre rastliny [10].

Záver

Vplyv pôdnych vlastností, predovšetkým chemizmus pôdotvorných substrátov a ich fyzikálne vlastnosti sú rozhodujúcim faktorom ovplyvňujúcim pohyblivosť niklu a jeho príjem rastlinami rastúcimi na geogénne kontaminovaných pôdach CKP a MF. Prítomnosť seskvioxidov a ílu má významný dosah na väzbu Ni^{2+} iónov v pôde a jeho zníženú bioprístupnosť pre biotu, čo dokazuje aj vysoká negatívna korelácia medzi Fe a Al obsahom v pôde a transferovým faktorom Ni. Pôdy s prevahou ílovej frakcie a vysokou kationovou výmennou kapacitou majú všeobecne nižšie transferové faktory Ni ako piesčité pôdy, v ktorých je vyšší obsah SiO_2 . Nikel je všeobecne menej pohyblivý v alkalickějších pôdach ako v kyslých, čo dokazuje aj negatívna korelácia medzi pH a TF Ni. S klesajúcou hodnotou pôdnej reakcie stúpal príjem Ni do rastlín. Okrem pôdnych faktorov je treba brať do úvahy taktiež druhovú odlišnosť a kumulačné schopnosti rastliny. Najvyššie TF Ni a celkové obsahy Ni v asimilačných orgánoch rastlín sa nachádzali predovšetkým u drevín, a to u *Carpinus betulus* a *Fagus sylvatica*. Celkové koncentrácie Ni v listoch, ihličí alebo zrne rastlín rastúcich na „serpentinických“ pôdach CKP a MF na Slovensku sú výrazne väčšie v porovnaní s obsahmi v rastlinách rastúcich na nekontaminovaných pôdach. Študované vzorky rastlín nezriedka obsahujú 20 až 30 $mg \cdot kg^{-1}$ Ni vo svojich pletivách. Môže to predstavovať potenciálnu hrozbu pre zdravie nielen rastlín, ale taktiež živočíchov a ľudí žijúcich v tejto oblasti.

Pod'akovanie

Ďakujem doc. RNDr. O. Ďuržovi, CSc. a doc. RNDr. J. Čurlíkovi, CSc. za rady a pomoc pri písaní tohto príspevku. Táto práca vznikla v rámci projektov Agentúry na

podporu výskumu a vývoja č. APVV-0231-07: „*Biogeochemické aspekty transférov potenciálne toxických stopových prvkov vo flyšových pôdach východného Slovenska a ich environmentálne dôsledky*“ a grantom UK/237/2012 riešených na Katedre geochemie PriF UK.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Čurlík J., Šefčík P. (1999) Geochemický atlas Slovenskej republiky časť V. – Pôdy, MŽP SR, Bratislava, p. 41
- [2] Rozhodnutie MP SR č. 531/1994-540 o najvyšších prípustných hodnotách škodlivých látok v pôde a o určení organizácií oprávnených zisťovať skutočné hodnoty týchto látok
- [3] Čurlík J., Ďurža O., Jurkovič E. et al. (2011) Geogénna kontaminácia chrómom a niklom a „serpentinické“ pôdy v oblasti centrálnokarpatskej paleogénnej panvy východného Slovenska. *Mineralia Slov.*, 43, p. 365
- [4] Maňkovská B. (1996) Geochemický atlas Slovenskej republiky. Časť I: Lesná biomasa, MŽP SR, Bratislava, p. 68
- [5] Kabata-Pendias A., Pendias H. (2001) Trace elements in Soils and Plants, CRC Press, London, p. 42
- [6] Freytag J. (1986) Bestimmung von Transferfaktoren Boden/Pflanze einiger Elemente und Untersuchungen über deren Abhängigkeit von ausgewählten Bodeneigenschaften. *Hamburger Bodenkundliche Arbeiten* 1, p. 50
- [7] Rinklebe J., Franke C., Neue H. (2007) Aggregation of floodplain soils as an instrument for predicting concentrations of nutrients and pollutants. *Geoderma*, vol. 141, p. 216
- [8] Echevarria G., Massoura S. T., Sterckeman T. et al. (2006) Assessment and control of the bioavailability of nickel in soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(3), p. 644
- [9] Cheng Ch., Jien S., Iizuka Y., Tsai H., Hseu Y. Ch. Z. (2011) Pedogenic Chromium and Nickel Partitioning in serpentine soils along a Toposequence, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 75, p. 666
- [10] Yusuf M., Fariduddin Q., Hayat S. et al. (2011) Nickel: An Overview of Uptake, Essentiality and Toxicity in Plants. *Bull Environ. Contam. Toxicol.*, 86, p. 2

Ohodnotenie vybraných mimoprodukčných funkcií pôdy na katastrálnom území obce Bielovce

Marianna Kollárová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra pedológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika; kollarovam@fns.uniba.sk

Abstract

Seven billion people depend on soil. This proof its immense value. Soil provides number of non-productive functions that mankind even does not realized. Not all these functions are included into this evaluation. This work is focused on evaluation of the following non-productive functions as are accumulation, filtration, transformation, and socio-economic function.

Key words: *productive function of soil; evaluation of non-productive functions of soil*

Úvod a formulácia cieľa

Pôda vzniká dlhé tisícročia, na jej charakter, druh a typ vplýva niekoľko závažných faktorov a to: klíma, zrážky, materská hornina, geografické činitele, flóra a fauna, podzemná i povrchová voda a samozrejme človek. Každým trvalým záberom pôdy dochádza nielen ku zničeniu produkčnej funkcie ale aj mimoprodukčných.

Cieľom tohto príspevku je poukázať na významnosť mimoprodukčných funkcií pôdy a ohodnotiť vybrané z nich. Každá z mimoprodukčných funkcií pôdy má osobitý význam a je nevyhnutná pre správne fungovanie ekosystému.

Materiál a metódy

Skúmaným územím bolo katastrálne územie obce Bielovce, ktorá sa nachádza na juhu levického okresu, 28 km od Levíc a 25 km od Šiah. Obec susedí s katastrom: Ipeľský Sokolec, Šalov a Pástovce a z južnej strany s Maďarskou republikou, kde hranicu medzi nimi tvorí rieka Ipeľ. Rozloha celého k.ú. Bielovce je 1138 ha, z toho lesné pôdy tvoria 13 ha, zastavané plochy 41 ha a vodné a ostatné plochy 16 ha [1].

Bielovce sú intenzívne využívané ako poľnohospodársko-lesná krajina, pričom v krajine celkovo prevažuje veľkobloková orná pôda [2]. Pôdne typy a ich zastúpenie je: regozeme (25,2% územia), fluvizeme (19,9 % územia), hnedozeme (19,7 % územia), černozeme (18,5 % územia), čiernice (3,1 % územia), kambizeme (0,6 % územia), gleje (0,3 % územia), kultizeme (1,5 % územia), antrozeme (4,8 % územia) a nevyvinuté a neplodné

pôdy (5,5 % územia) je podľa Mederlyho [1] kategória pôdnych typov černoziemí, fluvizemí, hnedozemí a regozemí, ktorých produkčná funkcia nie je využívaná.

Pre vyjadrenie hodnoty produkčnej funkcie bol použitý súčasný systém bonitovaných pôdno-ekologických jednotiek BPEJ a to pomocou stránky www.podnemapy.sk [3] a publikácie Linkeša [4] a pre vyjadrenie hodnoty mimoprodukčných funkcií a to - akumulčná, filtračná, transformačná a socioekonomická - boli použité publikácie Bujnovského [5] a [6], mapy s potrebnými údajmi z portálu www.podnemapy.sk [3] a výsledky z laboratórneho rozboru vzoriek odobratých na spomínanej lokalite.

Schopnosť pôdy akumulovať spočíva v zadržiavaní vody, organických látok, humusu, energie a živín. Pri hodnotení tejto funkcie má patričný vplyv aj zloženie pôdy a sklon reliéfu.

Filtračná funkcia zabraňuje kontaminácií atmosféry a hydrosféry a tým zabraňuje vstupu kontaminantov do potravinového reťazca. Na filtračnej funkcii sa podieľajú adsorpčné, mechanické sily a v neposlednom rade chemické procesy [7]. Táto funkcia nie je nevyčerpatel'ná. Môže dôjsť k zaplneniu pôdnych pórov koloidmi, k vyčerpaniu sorpčnej schopnosti, budú sa hromadiť škodliviny a tým vznikne tzv.chemická časovaná bomba [8].

Transformačná funkcia spočíva v premene organických a anorganických látok na energie. Zabezpečuje kolobeh látok a prvkov v prírode prostredníctvom živých organizmov a rôznych chemických procesov [7].

Socioekonomickú funkciu je možné vyjadriť týmito potenciálmi, ktoré pôda poskytuje: je energetickou zásobárňou, poskytuje obnoviteľné a neobnoviteľné zdroje, vytvára priestor pre ľudské aktivity - poľnohospodárstvo a lesné hospodárstvo, rozvoj infraštruktúr, dopravnej siete, športových a rekreačných areálov, vojenských priestorov, tvorí historické médium a v neposlednom rade vytvára obrovskú génovú rezervu. Bielovce patria medzi poľnohospodársko-lesnú krajinu, neprebíha tu žiadna ťažba a ani pozemok tu nie je žiadny na predaj, preto bola pôda ohodnotená ako zdroj energie prostredníctvom oxidovaťel'ného uhlíka.

Výsledky a diskusia

Samotná produkčná funkcia, ktorá bola vyčíslená pre všetky pôdne typy v katastrálnom území obce Bielovce podľa systému BPEJ, má hodnotu 188 448 750 Sk, t.j. zaokrúhlene 6 255 353 € (pri použití kurzu 30,126 Sk = 1 €) [9].

Mimoprodukčné funkcie pôdy boli vyjadrené len pre najviac zastúpené pôdne druhy a to pre regozeme, fluvizeme, hnedozeme a černoze [10].

Akumulčná funkcia bola ohodnotená na 6 203 078 €. Pri jej hodnotení zohral úlohu

sklon terénu, čo súvisí s infiltračnými pomermi a obsahom humusu, pretože na rovine je väčšie množstvo humusu a tým je aj vyššia akumulčná schopnosť ako na svahu.

Filtračná funkcia bola vyjadrená zvlášť pre organické a zvlášť pre anorganické kontaminanty, na procese sa podieľajú v rovnakom 50% pomere a výsledná hodnota bola 5 924 849 €.

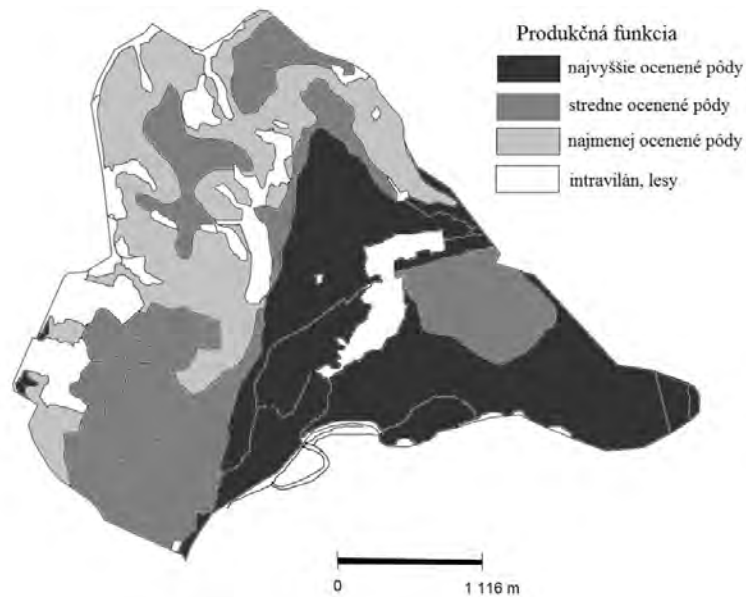
Pre ohodnotenie schopnosti transformovať organické polutanty sa vychádzalo z predpokladu, že veľmi vysoká schopnosť pôd transformovať organické polutanty sa rovná hodnote nákladom potrebných na očistenie kontaminovanej pôdy. Zo skúseností európskych krajín s dekontamináciou pôd vyplýva, že náklady sú približne 20 € za tonu. Pre poľnohospodárske pôdy na Slovensku sú náklady približne 10,2 mld. €. Pre jeden meter štvorcový bola vypočítaná suma 0,40 € za m² [6]. V našom prípade sme použili spomínanú hodnotu pre fluvizeme, hnedozeme a černozeme a pre regozeme bola pridelená nižšia hodnota 0,20 € za m² kvôli nízko humóznemu a nevýraznému humusovému horizontu. Konečná hodnota transformačnej funkcie bola 3 483 040 €.

Pre vyjadrenie hodnoty socioekonomickej funkcie sme zvolili spôsob pomocou prepočtu množstva oxidovateľného uhlíka na objem pôdy v každom horizonte, podľa Vilčekovho prepočtu [11] bolo zistené koľko MJ energie sa v najviac zastúpených pôdnych typoch v Bielovciach vyprodukuje a na vyjadrenie konkrétnej hodnoty bola použitá súčasná cena elektrickej energie pre DD-bežné domácnosti [12]. Takto možno vyjadriť hodnotu pôdy Bieloviec ako zdroj energie na 58 348 194 € [10]. Táto vysoká hodnota odráža aj fakt, že cena elektrickej energie u nás nie je práve najnižšia.

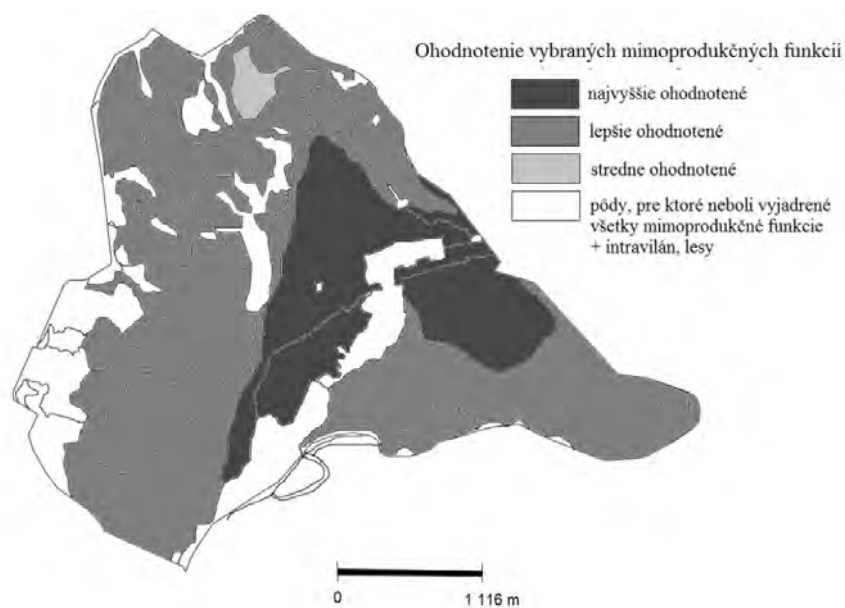
V tabuľke 1 je uvedený prehľadný súhrn všetkých hodnotených funkcií zoradených zostupne a obrázky 1 a 2 porovnávajú súčasné hodnotenie produkčnej funkcie a ohodnotenú vybranú mimoprodukčnú funkciu. Pri porovnaní tej istej parcely na 1 a 2 obrázku, je viditeľný rozdiel maximálne o jeden stupeň, napr. pri produkčnej funkcii je parcela označená ako stredne produkčná a na obr.2 je označená ako jedna z najlepšie ohodnotených mimoprodukčných funkcií.

Tab. 1 Súčet všetkých vyhodnotených funkcií pôdy so zaokrúhlením na celé čísla

Funkcia	Cena funkcie na území Bieloviec
Socioekonomická	58 348 194 €
Produkčná	6 255 353 €
Akumulačná	6 203 078 €
Filtračná	5 924 849 €
Transformačná	3 483 040 €
Spolu	80 214 514 €



Obr.1 Produkčná funkcia [10]



Obr.2 Ohodnotenie vybraných mimoprodukčných funkcií [10]

Záver

Súčasnú oceňovanie pôd vychádza z produkčnej funkcie. Na základe bonitovaných pôdno-ekologických jednotiek je každému homogénemu územiu s rovnakými vlastnosťami a štruktúrou pridelená určitá suma za m². Podľa BPEJ je cena poľnohospodárskej pôdy v Bielovciach 6 255 353€. Táto hodnota však nie je upravovaná o infláciu.

Pri použití len niektorých vybraných mimoprodukčných funkcií, a to konkrétne akumuláčnej, filtračnej, transformačnej a socioekonomickej bola hodnota územia 73 959 161

€. Táto suma tvorí takmer 12-násobok produkčnej funkcie.

Mimoprodukčné funkcie sú úzko prepojené s produkčnou schopnosťou. Pri trvalom zastavaní územia sa environmentálne funkcie eliminujú, alebo úplne zničia, čo má samozrejme dopad aj na biodiverzitu, ekológiu a aj na ľudské zdravie.

Pod'akovanie

Tento príspevok finančne podporil OP Výskum a vývoj – projekt Centrum excelentnosti integrovanej protipovodňovej ochrany územia, ITMS 26240120004, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Mederly P. a kol. (2008) Projekt pozemkových úprav v katastrálnom území Bielovce, Miestny územný systém ekologickej stability v obvode projektu pozemkových úprav sprievodná správa. REGIOPLÁN Nitra - krajinnoekologické štúdie a expertízy, Nitra, p. 97
- [2] Lauko P. a kol. (2009) Projekt pozemkových úprav v k.ú. Bielovce. Etapa: 1/d). Všeobecné zásady funkčného usporiadania územia v obvode projektu pozemkových úprav. 1.1. Technická správa. január 2009, Levice, Nitra, p. 79
- [3] Pôdny portál [Citované: 19.5.2010]
<http://www.podnemapy.sk/bpej/viewer.htm>
- [4] Linkeš V., Pesrún V., Džatko M. (1996) Príručka pre používanie máp bonitovaných pôdno-ekologických jednotiek. Výskumný ústav pôdnej úrodnosti, Bratislava, p. 103
- [5] Bujnovský R., Balkovič J., Barančíková G., et al. (2009) Hodnotenie a oceňovanie ekologických funkcií poľnohospodárskych pôd Slovenska. Výskumný ústav pôdoznalectva a ochrany pôdy v Bratislave, p. 72
- [6] Bujnovský R., Vilček J., Blaas G., et al. (2011) Hodnotenie kapacít pôdy a efektov z jej využívania. Výskumný ústav pôdoznalectva a ochrany pôdy v Bratislave, p. 70
- [7] Vilček J., Hronec O., Bedrna Z. (2005) Environmentálna pedológia. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre v spolupráci s Výskumným ústavom pôdoznalectva a ochrany pôdy v Bratislave, Nitra, p. 298
- [8] Bedrna Z. (2002) Environmentálne pôdoznalectvo. Veda, Bratislava, p. 352

- [9] Kollárová M. (2010) Bonitácia pôd, problémy a perspektívy na príklade katastrálneho územia Bielovce. (Bakalárska práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava
- [10] Kollárová M. (2012) Zahnutie environmentálnych funkcií pôd do hodnotenia bonity pôd v katastrálnom území obce Bielovce. (Diplomová práca) Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, p. 85
- [11] Vilček J. (2006) Energetický potenciál poľnohospodárskych pôd: kritérium hodnotenia a využívania krajiny. Výskumný ústav pôdoznanectva a ochrany pôdy, Bratislava, p. 81
- [12] Západoslovenská energetika [Citované: 1.5.2012]
http://www.zse.sk/index.php?www=sp_file&id_item=862

Vybrané problémy priestorovej variability hydraulických parametrov pôd Borskej nížiny

Michal Kupec¹, Peter Stradiot², Štefan Rehák²

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra pedológie, Mlynská dolina 842 15 Bratislava, Slovenská republika; michal.kupec@fns.uniba.sk

² Výskumný ústav vodného hospodárstva, Nábřežie arm. gen. L. Svobodu 5, 812 49 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Infiltration measurements of the soil were conducted using the double ring infiltrometer at representative sites across the valley of Borská nížina. The value of saturated hydraulic conductivity was determined for the part of the soil profile 0 - 30 cm. Data from the project 'Optimization of the agroecosystem water regime in the region of Záhorská valley' was added to the measured set of data, which was analyzed using statistic methods, evaluating the probability distribution type and setting the representative value of saturated hydraulic conductivity as an input parameter into simulation models.

Kľúčové slová: nasýtená hydraulická vodivosť; rozdelenie početnosti; Borská nížina

Úvod a formulácia cieľa

Nasýtená hydraulická vodivosť je kvantitatívnou charakteristikou schopnosti vodou nasýtenej pôdy prepúšťať vodu [1]. Pre danú pôdu je nasýtená hydraulická vodivosť konštantná a závisí najmä od veľkosti pórov. Pre ľahké pôdy nadobúda spravidla väčšiu hodnotu ako pre pôdy ťažké. Priemerné hodnoty hydraulickej vodivosti sa pohybujú pre piesky 500 – 5000 cm.den⁻¹, íly 1 – 100 cm.den⁻¹, rašeliny 1 - 1000 cm.den⁻¹[2].

Pôdy Borskej nížiny vznikali prevažne na kvartérnych substrátoch eolických pieskov a aluviálnych sedimentov. Prevládajú zrnitostne ľahké piesočnaté pôdy (až 83% plochy), stredne ťažké hlinité a prachovité pôdy zaberajú okolo 15% a ťažké ílovité pôdy asi 2% územia [3]. Hydrofyzikálne charakteristiky pôd sa vyznačujú veľkou priestorovou variabilitou. Cieľom bolo stanovenie reprezentatívnej hodnoty nasýtenej hydraulickej vodivosti ako vstupného parametra do modelu Daisy [4] pre účely simulovania vodného režimu pôd.

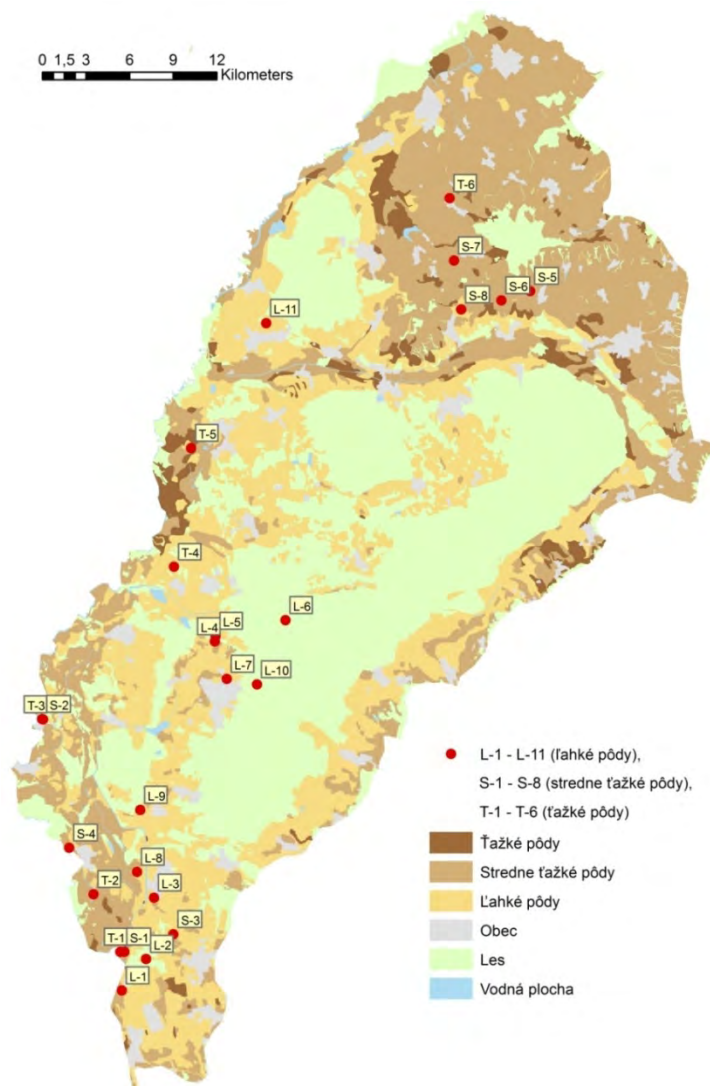
Materiál a metódy

V rámci územia bolo vyčlenených 12 reprezentatívnych lokalít na základe príslušnosti k pôdnemu druhu, pôdnemu typu a spôsobu využívania krajiny, doplnené boli o ďalších 13

pôdnych sond z projektu Optimalizácia vodného režimu agroekosystému v regióne Záhorkej nížiny [5] (**Obr. 1**).

Na meranie hydraulickej vodivosti nasýteného pórovitého prostredia bola použitá metóda dvoch sústredných valcov (double ring infiltrometer Eijkelkamp), založená na meraní množstva vody infiltrovanej do pôdy za určitý čas. Stanovuje sa infiltrované množstvo vody z vnútorného valca, voda vo vonkajšom valci zabezpečuje vertikálnu infiltráciu vody z vnútorného valca. Počas infiltrácie je povrch pôdy pokrytý súvislou vrstvou vody (infiltrácia z výtopy), rýchlosť infiltrácie sa časom znižuje až k ustálenej rýchlosti infiltrácie, ktorá je blízka nasýtenej hydraulickej vodivosti [6].

Súbory nameraných hodnôt nasýtenej hydraulickej vodivosti (**Tab. 1**) sa vyhodnocovali pomocou metód štatistickej analýzy (histogram rozdelenia početnosti, testy dobrej zhody).



Obr. 1 Lokalizácia pôdnych sond na záujmovom území Borskej nížiny

Tab. 1 Hodnoty nasýtenej hydraulickej vodivosti K stanovené v teréne pre časť pôdneho profilu 0 – 30 cm

sonda	K [mm.min ⁻¹]	K [cm.d ⁻¹]	sonda	K [mm.min ⁻¹]	K [cm.d ⁻¹]
L-1	3,000	432,00	S-1	1,800	259,20
L-2	1,800	259,20	S-2	10,002	1440,29
L-3	1,800	259,20	S-3	2,500	359,93
L-4	1,980	285,12	S-4	0,167	24,08
L-5	1,020	146,88	S-5	0,442	63,71
L-6	3,960	570,24	S-6	0,194	27,92
L-7	13,800	1987,20	S-7	0,495	71,24
L-8	0,714	102,79	S-8	0,221	31,85
L-9	0,300	43,14	T-1	0,018	2,59
L-10	0,945	136,05	T-2	4,020	578,88
L-11	1,955	281,58	T-3	3,000	432,00
			T-4	1,317	189,65
			T-5	0,201	29,00
			T-6	0,358	51,60

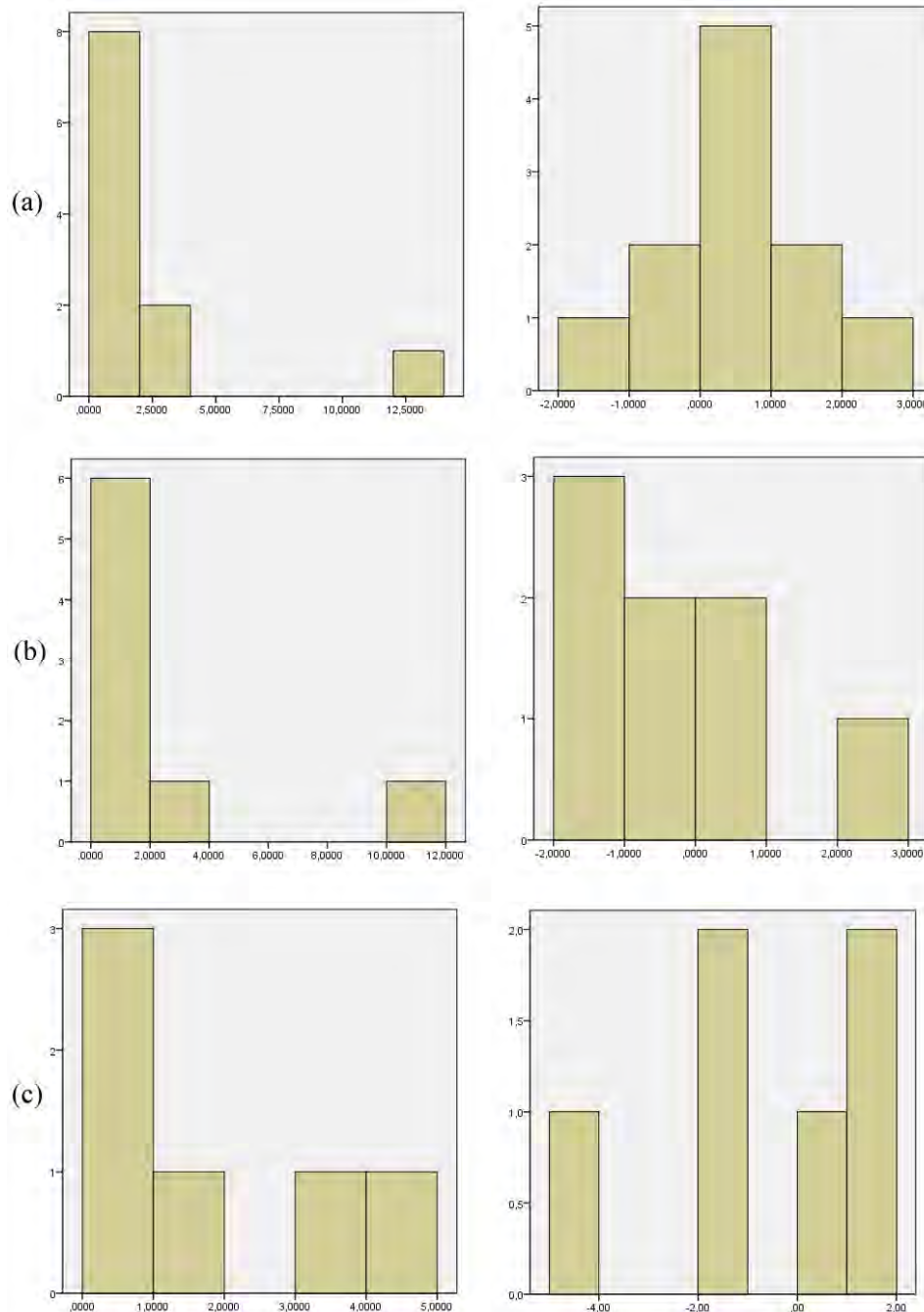
Výsledky a diskusia

Hodnoty hydraulických vodivostí získané infiltračným testom pre časť pôdneho profilu 0 – 30 cm boli hodnotené štatistickou analýzou pomocou grafického zobrazenia empirických hodnôt hustoty rozdelenia, kvantil-kvantilového grafu a testov dobrej zhody (Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk). Analýzou sa určila príslušnosť jednotlivých súborov hydraulickej vodivosti k logaritmicke-normálnemu rozdeleniu pravdepodobnosti (**Tab. 2**, **Obr. 2, 3**).

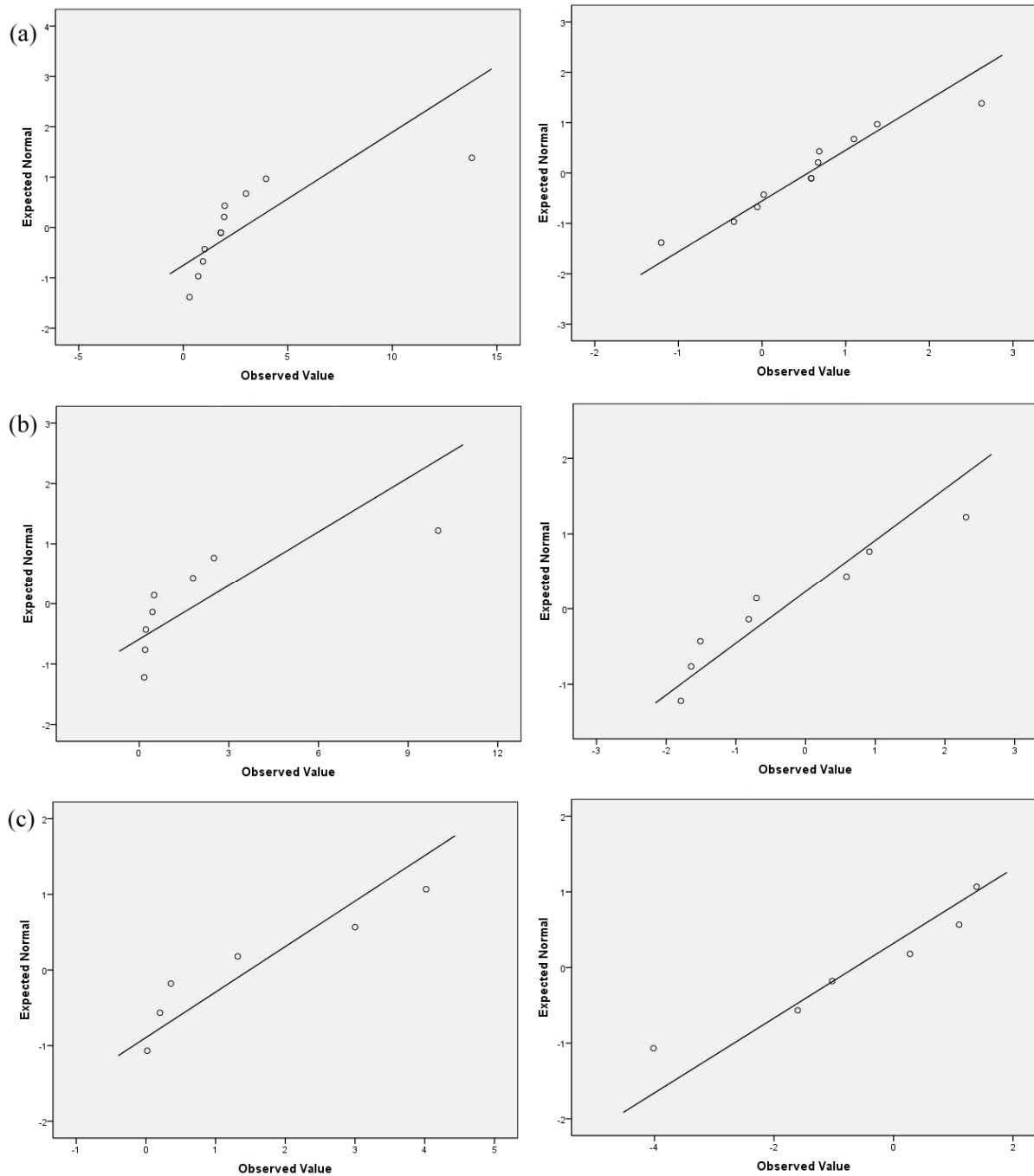
Tab. 2 Štatistické charakteristiky hodnôt hydraulickej vodivosti pôdy K [mm.min⁻¹] pre normálne a log-normálne rozdelenie pravdepodobnosti

Normálne rozdelenie	Stredná hodnota	Štandardná odchýlka	Medián	Šikmosť	Špicatosť	Kolmogorov-Smirnov Sig. (α=0,05)	Shapiro-Wilk Sig. (α=0,05)
Lahké pôdy	2,843	3,781	1,8	2,881	8,844	0,003	0
Stredne ťažké pôdy	1,977	3,355	0,469	2,486	6,429	0,02	0
Ťažké pôdy	1,486	1,663	0,838	0,851	-1,166	0,2	0,182
Log-normálne rozdelenie	Stredná hodnota	Štandardná odchýlka	Medián	Šikmosť	Špicatosť	Kolmogorov-Smirnov Sig. (α=0,05)	Shapiro-Wilk Sig. (α=0,05)
Lahké pôdy	0,55	0,992	0,588	0,399	1,402	0,2	0,781
Stredne ťažké pôdy	-0,331	1,461	-0,76	0,847	-0,327	0,2	0,264
Ťažké pôdy	-0,647	2,023	-0,376	-0,893	0,315	0,2	0,54

Za hodnotu hydraulickej vodivosti reprezentatívnu pre účely využitia v matematických modeloch sa odporúča hodnota mediánu logaritmicko-normálneho rozdelenia, nakoľko ide o hodnotu približne totožnú so stanovením v laboratórnych podmienkach [6], [7]. Niekoľkonásobne väčšie hodnoty K z terénnych meraní potvrdzujú, že pri vsakovacích testoch hrá dominantnú úlohu prúdenie preferenčnými cestami vytvorenými činnosťou zoodafónu, rastlinných koreňov, prípadne vyplývajúce z niektorých fyzikálnych vlastností pôdy (napučiavanie, zmršťovanie).



Obr. 2 Histogram normálneho rozdelenia pravdepodobnosti pre hodnoty K (vľavo) a $\ln K$ (vpravo) [$\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$] pre ľahké pôdy (a), stredne ťažké pôdy (b) a ťažké pôdy (c)



Obr. 3 Kvantil-kvantilový graf pre hodnoty K (vľavo) a $\ln K$ (vpravo) [$\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$] pre ľahké pôdy (a), stredne ťažké pôdy (b) a ťažké pôdy (c)

Záver

Hodnoty nasýtenej hydraulickej vodivosti pôd stanovené v terénnych podmienkach sa vyznačujú značnou priestorovou variabilitou aj v rámci samotného pôdneho druhu. Sú spravidla oveľa vyššie ako hodnoty stanovené v laboratórnych pokusoch ako dôsledok existencie preferenčných ciest pri prúdení vody v prírodných podmienkach. Ako

reprezentatívna hodnota nasýtenej hydraulickej vodivosti bola vybraná hodnota mediánu logaritmicko-normálneho rozdelenia pravdepodobnosti. Charakteristiky nasýtenej hydraulickej vodivosti pôd Borskej nížiny budú použité ako vstupné parametre do simulačného modelu Daisy. Pre ich ďalšie spresnenie bude potrebné porovnanie terénnych meraní s laboratórne stanovenými hodnotami K.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Velebný V., Novák V. (1989) *Hydropedológia*. Slovenská vysoká škola technická, Bratislava, SR, p. 115
- [2] Kutílek M. (1978) *Vodohospodárska pedologie*. SNTL – Státní nakladatelství technické literatury, Praha, ČR, p. 176
- [3] Kubíček F., Kalivodová E., Bedrna Z., et al. (2001) *Príroda prihraničného regiónu Záhoria*. Slovenská ekologická spoločnosť SAV, Bratislava, SR, p. 13
- [4] Abrahamsen P., Hansen S. (2000) *Environ. Modell. Softw.* 15, p. 313
- [5] Šanta M. (1998) *Optimalizácia vodného režimu agroekosystému v regióne Záhorskej nížiny (záverečná správa)*. ETIRS, Bratislava, SR
- [6] Rehák Š., Janský L., Nováková K. (2006) *Fyzika pôdy II*. Univerzita Komenského, Bratislava, SR, p. 48
- [7] Šútor J. (1986) *Vodohosp.* čas. 34(1), p. 95
- [8] Šútor J. (1986) *Vodohosp.* čas. 34(3), p. 284

Distribúcia potenciálne toxických prvkov v urbánných pôdach Bratislavy

Lucia Lachká, Veronika Tatarková, Roman Tóth

Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra geochémie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovensko; lachka@fns.uniba.sk

Abstract

Potentially toxic elements naturally occur in soils, but their contents are increased in urban environment due to anthropogenic activities. The main sources of urban soil contamination with potentially toxic elements are chemical, energetic, building and blowing industry, engineering, traffic and municipal waste incineration plants. Contaminated urban soils can pose significant risks to human health through dust inhalation, soil ingestion, and dermal contact. The primary objectives of the present study were: to assess concentrations of potentially toxic elements in soils of nursery schools, to investigate relationships between potentially toxic elements and physicochemical properties of soils, to identify the main possible sources.

Kľúčové slová: *potenciálne toxické prvky; urbánne pôdy; zdroj znečistenia*

Úvod a formulácia cieľa

Potenciálne toxické prvky (PTP) sa bežne vyskytujú v pôdach, ale vplyvom antropogénnych aktivít sa ich obsahy spravidla zvyšujú v urbánnom prostredí. Antropogénne zdroje PTP môžu byť bodové, ktoré sú v blízkosti miesta znečistenia, alebo difúzne, kedy môže dochádzať k rozptýleniu PTP na pomerne veľké vzdialenosti od zdroja [1].

Zvýšená prítomnosť PTP v urbánnom prostredí môže byť dôležitým zdrojom vstupu PTP do organizmu a to cestou inhalácie prachu, orálnym príjmom pôdy alebo dermálnym kontaktom. Niektoré PTP majú nežiaduce zdravotné účinky, zvlášť pre deti, vzhľadom na ich nízku telesnú hmotnosť a vyvíjajúcu sa nervovú sústavu [2]. Dvory materských škôlok a ihriská sú miesta, kde deti strávia väčšinu času a prichádzajú do kontaktu s pôdou. Vzhľadom nato, že deti patria k najohrozenejšej skupine z hľadiska pôsobenia PTP na organizmus, v štúdiu sme sa zamerali na výskum pôd z areálov materských škôlok v Bratislave.

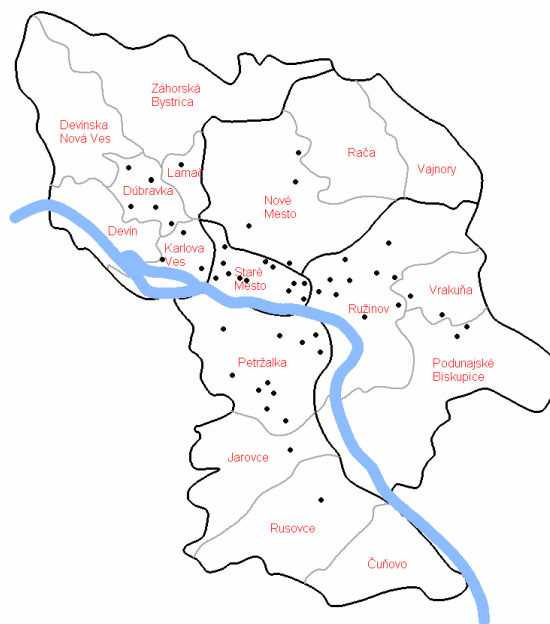
Hlavnými cieľmi štúdie bolo zhodnotenie výskytu PTP v pôdach materských škôlok, zistenie závislostí medzi koncentraciami PTP a fyzikálno-chemickými vlastnosťami pôd, identifikovať potenciálne zdroje znečistenia pôd PTP.

Materiál a metódy

Bratislava, hlavné mesto Slovenskej republiky, leží na juhozápade krajiny. Na území Bratislavy sa rozkladajú tri fyzicko-geografické oblasti, a to Malé Karpaty, Záhorská nížina (súčasť Viedenskej panvy) a Podunajská nížina (súčasť Malej dunajskej panvy). Podnebie

Bratislava patrí do oblasti teplej až mierne teplej s nevýraznou zimou a teplým letom o priemernej teplote $10,3^{\circ}\text{C}$. Priemerný ročný úhrn zrážok sa pohybuje medzi 500–650 mm, prevládajú severozápadné vetry [3]. Rozloha mesta je $367,584 \text{ km}^2$ a žije tu 465 327 obyvateľov. Významné zdroje znečistenia životného prostredia v Bratislave sú odvetvia priemyslu ako chemický, energetický, strojársky, stavebný a sklársky priemysel, ďalej spaľovne komunálneho odpadu a doprava.

Vzorky pôd z materských škôlok boli odobraté z rôznych častí Bratislavy. Celkovo pre štúdium bolo použitých 52 pôdnych vzoriek, pričom jedna vzorka pochádzala zo záhradkárskej pôdy v blízkosti križovatky Prievoz. Odberové miesta sú zaznačené na obr. 1.



Obr. 1 Mapa odberových miest

Po odstránení trávnatého pokryvu bolo odobratých v priemere 12 cm povrchovej pôdy. Pred analýzou sa vzorky vysušili pri izbovej teplote a následne preosali cez sito s veľkosťou oka 2 mm. Zrnitostné zloženie pôd bolo analyzované podľa zvolenej metodiky [4]. Fyzikálne a chemické vlastnosti použitých pôd sú uvedené v tab. 1. Pôdne vzorky sa analyzovali pre prítomnosť Cu, Zn, Cd, Pb, Hg, Fe a As v akreditovaných laboratóriách EL spol. s r.o. v Spišskej Novej Vsi. Výsledky analýz PTP boli vyhodnotené podľa limitných hodnôt rizikových prvkov v poľnohospodárskej pôde, ako uvádza zákon č. 220/2004 Z.z. [5], pretože v legislatíve ochrany pôd chýba zákon hodnotiaci limitné hodnoty sledovaných rizikových prvkov v urbánnych pôdach.

Na spracovanie získaných výsledkov z laboratórnych experimentov boli použité štatistické metódy. Korelačnou analýzou sme zistili závislosti medzi premennými. Výstupy v podobe tabuliek a grafov boli použité na interpretáciu výsledkov.

Tab. 1 Fyzikálne a chemické vlastnosti pôd

	MIN	MAX	MED
pH (H₂O)	5,881	8,018	7,609
pH (KCl)	5,301	7,528	7,157
TOC (%)	0,794	3,226	1,793
Piesok [%] >0,25 mm	10,91	66,04	38,28
Piesok [%] 0,25–0,05 mm	6,92	41,80	23,175
Prach [%] 0,05–0,01 mm	5,73	31,29	21,765
Prach [%] 0,01–0,001 mm	4,54	24,71	13,04
Íl [%] <0,001 mm	0,04	20,02	2,7

Výsledky a diskusia

Z 52 pôdnych vzoriek patrí 12 vzoriek do kategórie piesočnatá (s obsahom častíc <0,01 mm do 10%), 35 do kategórie hlinito-piesočnatá (10–20% častíc <0,01 mm) a 5 do kategórie piesočnato-hlinitá (20–30% častíc <0,01 mm). Podľa obsahu humusu patria pôdy do tried s veľmi nízkym (0,5–1%) až vysokým (3–5%) obsahom humusu. Tab. 2 zobrazuje výsledky z analýzy PTP a limitné hodnoty rizikových prvkov v pôdach. Hodnoty pH pôd boli v rozmedzí od 5,88 do 8,02 s priemernou hodnotou 7,61 – pôdy sú slabo kyslé až slabo alkalické.

Získané hodnoty z analýzy PTP boli porovnané s limitnými hodnotami rizikových prvkov v poľnohospodárskej pôde [5]. K prekročeniu limitných hodnôt prišlo v 24 pôdnych vzorkách (Cu 10 krát, Zn 12 krát, Pb 16 krát, Cd 3 krát, As 4 krát, Hg 13 krát), ostatných 28 pôdnych vzoriek bolo bez prekročenia. Najčastejšie zvýšené limitné hodnoty vykazovali Cu, Zn, Pb a Hg. Z jednotlivých častí Bratislavy boli bez prekročených limitných hodnôt pôdne vzorky z častí Lamač, Karlova Ves, Vrakuňa, Podunajské Biskupice, Rusovce, Jarovce.

Naopak v časti Staré mesto, boli prekročené limitné hodnoty v 10 z 12 pôdnych vzoriek (Cu, Zn, Pb, Cd, As, Hg), podobne v časti Ružinov 8 z 10 pôdnych vzoriek (Zn, Pb, As, Cd, Hg) a v časti Nové mesto 3 zo 4 pôdnych vzoriek (Cu, Zn, Pb, Hg). V časti Dúbravka prišlo k prekročeniu limitnej hodnoty pre Cu a Pb v 1 pôdnej vzorke z 5, v Petržalke 2 z 11

pre Hg a Zn, limitné hodnoty však boli prekročené len mierne. Namerané koncentrácie PTP boli vyššie ako priemerné koncentrácie z Geochemického atlasu SR pre C-horizonty pôd [6], preto môžeme konštatovať, že zdroje PTP sú prevažne antropogénneho pôvodu.

Tab. 2 Výsledky z analýzy PTP a limitné hodnoty rizikových prvkov v pôde (v mg.kg⁻¹)

	Cu	Zn	Pb	Cd	As	Hg	Fe
MED	21	72	19	0,27	7,21	0,105	13893
MIN	9	33	11	0,18	2,69	0,024	7173
MAX	67	551	183	0,84	11,93	0,431	21070
SD	12,593	75,899	24,933	0,117	2,158	0,095	2573,739
LH¹	30	100	25	0,4	10	0,15	-
LH²	60	150	70	0,7	25	0,5	-
LH³	-	-	200	10	25	10	-

Limitné hodnoty rizikových prvkov v poľnohospodárskej pôde [5] – ¹ pôdny druh piesočnatá, hlinito-piesočnatá, ² pôdny druh piesočnato-hlinitá, hlinitá, ³ limitné hodnoty pre rizikové prvky v pôdach detských ihrísk podľa Spolkového zákona o ochrane pôdy [3].

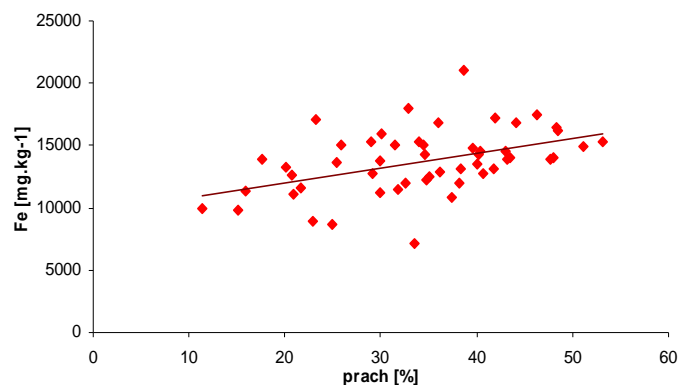
Na kontaminácii pôdy v časti Dúbravka sa môžu podieľať závody Technického skla a blízka skládka, na ktorú sa ukladal prevažne stavebný odpad z výstavby sídliska. Časti Nové mesto a Ružinov sú zaťažené lokalizáciou chemických závodov a ich skládok odpadov, energetiky, dopravnej infraštruktúry vzhľadom na zvýšené koncentrácie prvkov Pb, Zn, Cd, As, Hg, podobne Staré mesto je zaťažené emisiami z dopravy.

Keďže v slovenskej legislatíve chýba zákon, ktorý by hodnotil limitné hodnoty rizikových prvkov v urbánnej pôde, na porovnanie sú uvedené v tab. 2 limitné hodnoty pre rizikové prvky v pôdach detských ihrísk podľa Spolkového zákona o ochrane pôdy [3]. Žiadna z nameraných hodnôt tieto limitné hodnoty neprekračuje.

Z výsledkov korelačnej analýzy PTP s vlastnosťami pôdnej matrice bolo zistené, že Hg, Pb, Zn a Cu medzi sebou významne pozitívne korelujú. Konkrétne Pb, Zn a Hg, ktoré korelovali medzi sebou ($p=0,6795-0,7502$ pri $\alpha<0,001$), nám poukazujú na zdroj kontaminácie, a to dopravu a priemysel. Napriek tomu, že neboli stanovené významné korelácie medzi uvedenými prvkami a hodnotami pH, je predpoklad, že pri znížení hodnoty pH sa vyššie uvedené prvky a Cd budú v pôde mobilizovať.

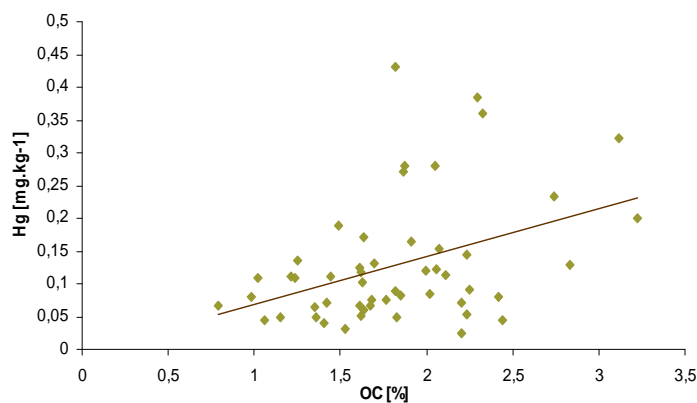
Arzén sa prevažne vyskytuje v aniónovej forme a preto je predpoklad, že so zvyšujúcimi sa hodnotami pH jeho koncentrácia v pôde rastie ($p=0,6055$ pri $\alpha<0,001$).

Obsah Fe sa zvyšuje s nárastom jemnej frakcie, čo dokazuje pozitívna korelácia Fe a prachu ($p=0,4615$ pri $\alpha<0,001$) (obr. 2) a negatívna pre Fe a piesok ($p=-0,4010$ pri $\alpha<0,01$). Rovnako to platí i pre As, keď sa jeho obsah zvyšuje s nárastom podielu prachovej frakcie ($p=0,4758$ pri $\alpha<0,001$) a znižuje sa s nárastom podielu pieskovej frakcie ($p=-0,3836$ pri $\alpha<0,01$).



Obr. 2 Závislosť medzi koncentráciou Fe a obsahom prachových častíc v pôde

Pozitívna korelácia vyšla medzi koncentráciou Hg a obsahom organickej hmoty ($p=0,3989$ pri $\alpha<0,01$), čo vysvetľuje afinita Hg k organickej hmote (obr. 3).



Obr. 3 Závislosť medzi koncentráciou Hg a obsahom organickej hmoty v pôde

Záver

Zistené zvýšené hodnoty PTP v pôde iba poukazujú na pravdepodobnosť výskytu možných rizík, ale nemusia v skutočnosti predstavovať výskyt nepriaznivých účinkov. Či zvýšené koncentrácie PTP budú mať nepriaznivý účinok, závisí na forme výskytu jednotlivého prvku a jeho biodostupnosti, ktoré sa odvíjajú od pôdnych vlastností a to pH, obsahu organického uhlíka a od zrnitostného zloženia pôdy [7].

Práca poskytuje informáciu o výskyte PTP v pôdach materských škôlok Bratislavy a o možných zdrojoch znečistenia. Zistením celkových koncentrácií v pôdach a porovnaním s jednotlivými pôdnymi vlastnosťami (zrnitosťné zloženie, obsah organického uhlíka, hodnota pH) môžeme do budúcnosti predpokladať správanie sa prvkov pri zmene jednotlivých vlastností pôd.

Najčastejšie zvýšené koncentrácie vykazovali Cu, Zn, Pb, Hg, pričom najväčšími zdrojmi znečistenia pravdepodobne budú emisie z chemických závodov a dopravy, odpadového hospodárstva a energetiky.

Vzhľadom na to, že areály materských škôlok patria k najrizikovejším územiám z hľadiska kvality pôdy, je nevyhnutný neustály monitoring a ďalšie štúdium foriem výskytu a dostupnosti jednotlivých PTP.

PodĎakovanie

Práca bola podporená projektom VEGA 1/0492/11.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Čurlík J., Jurkovič Ľ. (2012) Pedogeochemia, Univerzita Komenského v Bratislave, p. 228
- [2] Ljung K., Selinus O., Otabbong E. (2006) Sci. Total Environ. 366, p. 749
- [3] Sobocká J. (2007) Urbánne pôdy (Príklad Bratislavy), Výskumný ústav pôdoznanectva a ochrany pôdy, Bratislava, p. 174
- [4] Fiala K., Kobza J., Matúšková Ľ., Brečková V., Makovníková J., Barančíková G., Búrik V., Litavec T., Houšková B., Chromaničová A., Váradiová D., Pechová B. (1999) Závazné metódy rozborov pôd. Čiastkový monitorovací systém pôd, Výskumný ústav pôdoznanectva a ochrany pôdy, Bratislava, p. 142
- [5] Zákon č. 220/2004 Z.z.: Zákon 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. (Novelizovaný 1. 11. 2009, Z. č. 219/2008 Z.z.)
- [6] Čurlík J., Šefčík P. (1999) Geochemický atlas SR, časť V – Pôdy, Výskumný ústav pôdoznanectva a ochrany pôdy, Bratislava, 100 s., 83 máp
- [7] Xiao-san L., Shen Y., Xiang-dong L. (2012) Appl. Geochem. 27, p. 995

Účinnok akumulácie Mn a Ni v *Arabidopsis thaliana* na vybrané rastové parametre a architektúru koreňa

Alexandra Lešková¹, Ricardo F.H. Giehl², Agáta Fargašová¹, Nicolaus von Wirén², Slavomír Čerňanský¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra environmentálnej ekológie, Mlynská dolina B-2, 84215, Bratislava 4, Slovenská republika; leskovaa@fns.uniba.sk

²Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research Department of Plant Physiology and Cell Biology, Correnstrasse 3, 06466, Gatersleben, Spolková republika Nemecko

Abstract

We investigated the root system architecture of *Arabidopsis thaliana* exposed to elevated concentrations of manganese and nickel. First visible symptoms of elevated Mn appeared to be a repression in lateral root growth and formation, accompanied by reduced primary root growth and decreased biomass. On the other hand, excess Ni supply mainly suppressed primary root growth, while no reduction in the growth of lateral roots or number of lateral roots per primary roots was observed. Root biomass decreased under high Ni supply but only a slight reduction of shoot biomass occurred. Mn accumulated primarily in the shoots, while Ni was stored mostly in the roots. Both Mn and Ni accumulated into toxic concentrations in the plant tissues.

Kľúčové slová: architektúra koreňa, fytotoxicita, mangán, nikel

Úvod a formulácia cieľa

Mangán a nikel sú pre rastliny esenciálnymi kovmi. Mangán je nevyhnutnou súčasťou mangánovho klastru v kyslík vyvíjajúcom komplexe fotosystému II, je kofaktorom Mn-superoxiddismutázy, katalyzuje aktivitu oxalát oxidázy (germin) v obilninách a tiež mnohých iných enzýmov [1]. Nikel je nevyhnutný pre správnu funkciu rôznych enzýmov, napríklad metyl-koenzým M reduktázy, superoxid-dismutázy, ureázy alebo glyoxylázy závislej od niklu [2]. Kým obsah Mn v grame sušiny výhonkov, postačujúci pre zdravý rast rastliny, je približne 50 µg, v prípade Ni postačuje 0,1 µg [3]. Pod touto hodnotou rastliny trpia nedostatkom uvedených živín. Na druhej strane sa vysoké koncentrácie Mn a Ni prejavujú typickými znakmi toxicity, v prípade Mn je to hnednutie listov a chloróza listov pôsobením Ni. Kým toxické účinky kovov sú najlepšie viditeľné na úrovni rastu a biomasy nadzemných častí rastlín, morfológické zmeny koreňového systému ostanú často bez povšimnutia. Pochopenie vývinu a architektúry koreňa nesie v sebe potenciál pre zvýšenie výnosov poľnohospodárskej výroby a optimalizáciu poľnohospodárskeho využitia krajiny [4].

Relatívne málo sa vie o účinkoch Mn a Ni na rastlinný druh *Arabidopsis thaliana*. Tento druh je vďaka modelovou rastlinou mnohých biologických výskumov, no výskum

fytotoxicity je smerovaný skôr na poľnohospodársky významné druhy. Keďže fyziológia *A. thaliana* je pomerne dobre preštudovaná, doplnenie poznatkov o fytotoxicite ťažkých kovov poskytne priestor pre iné vedné odbory, ako molekulárna biológia alebo genetika a teda aj aplikačné smery. Preto je cieľom tejto práce preskúmať účinky Mn a Ni na *A. thaliana*, s dôrazom na architektúru koreňového systému a distribúciu a akumuláciu sledovaných kovov.

Materiál a metódy

Druh *Arabidopsis thaliana* sme predkultivovali 7 dní na Petriho miskách s 10 hodinovým denným svetelným intervalom. Ako kultivačné médium sme použili ½ Murashige a Skoog médium obohatené 0,5 % sacharózou, solidifikované s 1 % Difco agarom [5]. Hodnotu pH kultivačného média sme upravili s 5 mol.dm⁻³ KOH na 5,6 ± 0,1. Semenáčiky sme premiestnili do média s opísaným zložením (kontrola) alebo do média obohateného o rôzne koncentrácie Mn²⁺ (0,045 až 2,000 mmol.dm⁻³) vo forme MnSO₄.H₂O (Merck, Nemecko) a Ni²⁺ (0 až 100 μmol.dm⁻³) vo forme NiSO₄.6H₂O (Fluka AG, Sigma-Aldrich, Nemecko).

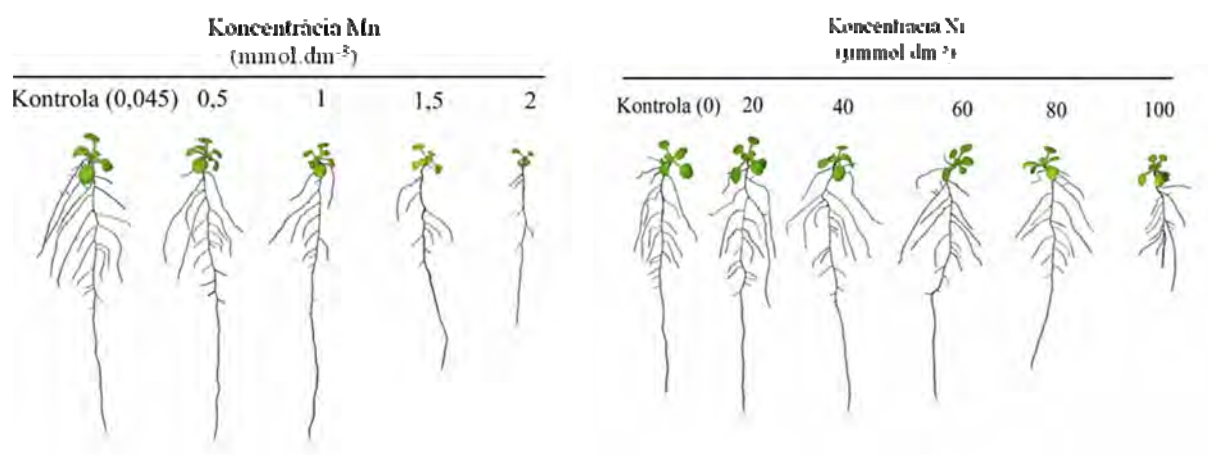
Po uplynutí 10 dní sme kvantifikovali dĺžku hlavného koreňa a bočných koreňov a hustotu bočných koreňov pomocou softwaru WinRHIZO Pro V. 2009c. Odvážili sme čerstvú biomasu koreňov a výhonkov. Biomasu sme vysušili pri 65 °C a odvážili sušinu koreňov a výhonkov.

Koncentrácie Mn a Ni v sušine koreňov a výhonkov sme stanovili prostredníctvom ICP-OES (atómová emisná spektrometria s indukčne viazanou plazmou).

Rozdiely medzi jednotlivými skupinami (kontrola, testované koncentrácie) sa štatisticky hodnotili Tukeyho testom ($p < 0,05$) v štatistickom programe Sigmaplot 11.0. Písmeno „a“ demonštruje najvyššiu hodnotu, nižšie hodnoty sa označujú odlišnými písmenami podľa abecedného poradia a zároveň vyjadrujú štatisticky významný rozdiel. Rovnaké písmená značia, že dané súbory dát nie sú štatisticky odlišné od ostatných.

Výsledky a diskusia

Architektúra koreňového systému *A. thaliana* sa menila vystavením zvyšujúcim sa koncentráciám Mn alebo Ni (Obr. 1). Vysoké koncentrácie Mn viedli k významnému poklesu dĺžky aj hustoty bočných koreňov už od 1 mmol.dm⁻³ Mn, kým rast hlavného koreňa sa zredukoval až od 1,5 mmol.dm⁻³ Mn (Tab. 1).



Obr. 1 Architektúra koreňového systému *A. thaliana* vystavená zvyšujúcim sa koncentraciám Mn a Ni

Tab. 1 Morfológia koreňa *A. thaliana* vystavená zvyšujúcim sa koncentraciám Mn. V tabuľke sú uvedené aritmetické priemery so štandardnými odchýlkami. HK - hlavný koreň, BK - bočné korene, písmená demonštrujú štatisticky významné rozdiely pri $p < 0,05$

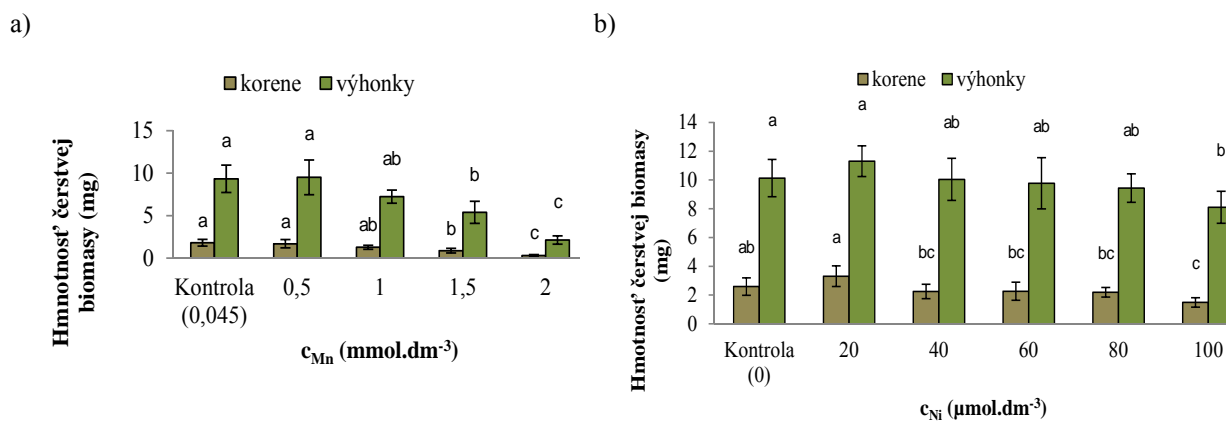
c_{Mn} (mmol.dm ⁻³)	0,045	0,500	1,000	1,500	2,000
Dĺžka HK (cm)	7,51±0,64a	7,85±0,71a	7,40±0,78a	6,34±1,28b	4,31±0,89c
Hustota bočných koreňov (počet BK. dĺžka HK ⁻¹)	2,89±0,27a	2,56±0,35a	2,18±0,35b	1,92±0,40b	1,21±0,59c
Priemerná dĺžka BK (cm)	0,83±0,28a	0,77±0,21ab	0,59±0,16bc	0,48±0,17c	0,19±0,11d

Morfológia koreňov *A. thaliana* pôsobením Ni bola ovplyvnená odlišným spôsobom. Pri 100 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ Ni bolo pozorované značné skrátenie hlavného koreňa, ale rast bočných koreňov alebo ich relatívna hustota sa nemenila (Tab. 2). Len hustota bočných koreňov *A. thaliana* pri najvyššej koncentrácii Ni stúpala v dôsledku stáleho počtu bočných koreňov na zníženú dĺžku koreňov.

Tab. 2 Morfológia koreňa *A. thaliana* vystavená zvyšujúcim sa koncentraciám Ni. V tabuľke sú uvedené aritmetické priemery so štandardnými odchýlkami. HK - hlavný koreň, BK - bočné korene, písmená demonštrujú štatisticky významné rozdiely pri $p < 0,05$

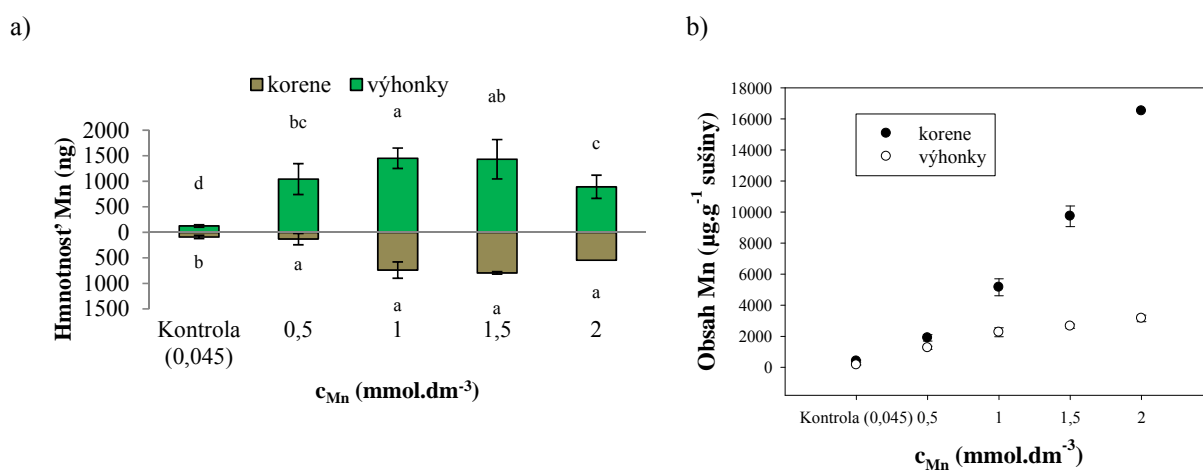
c_{Ni} ($\mu\text{mol.dm}^{-3}$)	0	20	40	60	80	100
Dĺžka HK (cm)	6,98±0,65ab	7,54±0,54a	7,28±1,87ab	6,91±0,65b	6,06±0,69c	2,84±0,64d
Hustota bočných koreňov (počet BK. dĺžka HK ⁻¹)	2,85±0,54b	2,62±0,43b	2,67±1,27b	2,68±0,43b	2,85±0,50b	4,74±1,38a
Priemerná dĺžka BK (cm)	0,86±0,16ab	0,92±0,17a	0,86±0,15ab	0,79±0,14b	0,81±0,11b	0,77±0,18b

Čerstvá biomasa koreňov aj výhonkov *A. thaliana* poklesla významne od 1,5 mmol.dm⁻³ Mn (Obr. 2a) a až expozícia 100 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ Ni spôsobila významný pokles biomasy koreňov, ale len mierny pokles biomasy výhonkov.



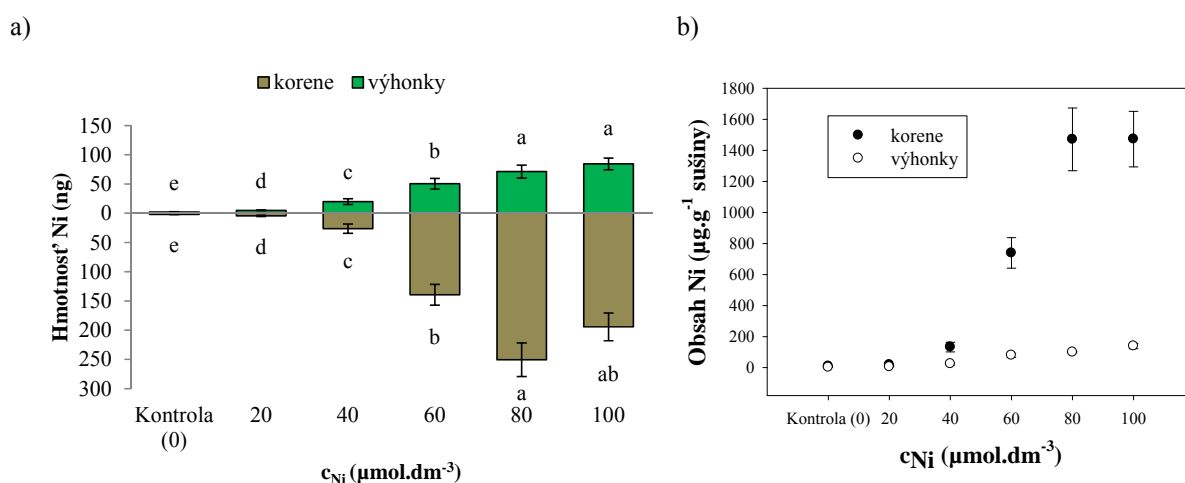
Obr. 2 Vplyv zvyšujúcich sa koncentrácií a) Mn a b) Ni na hmotnosť čerstvej biomasy *A. thaliana*. V grafe sú uvedené aritmetické priemery so štandardnými odchýlkami. Písmená demonštrujú štatisticky významné rozdiely pri $p < 0,05$

Z Obr. 3a vyplýva, že sa Mn akumuloval predovšetkým vo výhonkoch, a obsahy Mn mali stúpajúci trend, a to v koreňoch aj vo výhonkoch (Obr. 3b). Toto zistenie bolo potvrdené aj v experimente s *Triticum aestivum*, kde sa Mn akumuloval predovšetkým v listoch [6]. V priemere približne 2 mg Mn g^{-1} ($36,4 \text{ μmol Mn g}^{-1}$) sušiny výhonkov sa prejaví viditeľnými symptómami toxicity nadzemnej časti rastlín [7]. Táto hodnota bola prekročená v našich experimentoch po aplikácii 1 mmol.dm^{-3} Mn, čo korešponduje s prvými pozorovanými toxickými príznakmi Mn. Pozorovaný úbytok biomasy nadzemných častí rastlín po vystavení Mn je pravdepodobne dôsledkom vysokej miery akumulácie Mn v týchto častiach rastliny.



Obr. 3 a) Hmotnosť a b) obsah Mn akumulovaného v *A. thaliana* po vystavení zvyšujúcim sa koncentráciám Mn. V grafe sú uvedené aritmetické priemery so štandardnými odchýlkami. Písmená demonštrujú štatisticky významné rozdiely pri $p < 0,05$

Nikel sa akumuloval predovšetkým v koreňoch (Obr. 4a), a podobne ako v experimente s Mn, obsahy Ni v koreňoch aj výhonkoch mali stúpajúci trend (Obr. 4b). Nikel sa na základe experimentov iných autorov neprejavil toxicky do koncentrácie $140 \mu\text{g Ni g}^{-1}$ ($2,4 \mu\text{mol Ni g}^{-1}$) sušiny výhonkov [8]. Táto koncentrácia bola v našich experimentoch prekročená pri najvyššej koncentrácii Ni, čo takisto zodpovedá významnému poklesu rastu hlavného koreňa a biomasy koreňov. Väčší úbytok biomasy koreňov účinkom Ni v porovnaní s výhonkami pravdepodobne súvisí s prednostnou akumuláciou Ni v koreňoch.



Obr. 4 a) Hmotnosť a b) obsah Ni akumulovaného v *A. thaliana* po vystavení zvyšujúcim sa koncentráciám Ni. V grafe sú uvedené aritmetické priemery so štandardnými odchýlkami. Písmená demonštrujú štatisticky významné rozdiely pri $p < 0,05$

Záver

Koreňová architektúra *A. thaliana* sa menila prítomnosťou ťažkých kovov v médiu. Kým pôsobením Mn sa znížil primárne rast a hustota bočných koreňov, Ni negatívne ovplyvnil len dĺžku hlavného koreňa. Biomasa rastlín poklesla po expozícii oboch testovaných kovov. Silný inhibičný účinok Mn na biomasu nadzemných častí *A. thaliana* bol pravdepodobne zapríčinený vysokou akumuláciou Mn v týchto častiach rastlín, na rozdiel od experimentu s Ni, kde sa tento kov hromadil predovšetkým v koreňoch a korešpondoval s veľmi miernym poklesom biomasy výhonkov.

Z uvedených výsledkov sa nedá jednoznačne posúdiť, či bolo príčinou pozorovaného toxického vplyvu samotné nahromadenie ťažkých kovov v bunkách alebo/aj deficit niektorých esenciálnych prvkov spôsobený ťažkými kovmi. Poukazujú však na existenciu odlišných inhibičných scenárov skúmaných ťažkých kovov, ktoré sú tiež predmetom riešenia grantových úloh.

Pod'akovanie

Výskum bol realizovaný za finančnej podpory UK 598/2013, KEGA 027UK-4/2013 a VEGA 1/1155/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Woo E. J., Dunwell J. M., Goodenough P. W., Marvier A. C., Pickersgill R.W. (2000) Nat. Struct. Biol. 7(11), p. 1036
- [2] Freyermuth S. K. (2000) Plant J. 21(1), p. 53
- [3] Marschner P. (2012) Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, Waltham, United States of America, p. 5
- [4] Smith S., De Smet I. (2012) Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 367(1595), p. 1447
- [5] Murashige T., Skoog F. (1962) Physiol. Plant 15(3), p. 473
- [6] Page V., Feller U. (2005) Ann. Bot. 96 (3), p. 425
- [7] Lidon F. C., Teixeira M. G. (2000) Plant Physiol. Biochem. 38(12), p. 969
- [8] Dixit A. R., Dhankher O. P. (2011) PLoS One 6(6), e20921

Adaptace vodního hospodářství na změnu klimatu

Michal Lipták, Martin Dočkal

ČVÚT v Praze, Fakulta stavební, Katedra hydromeliiorací a krajinného inženýrství,
Thákurova 7, 166 29 Praha 6 - Dejvice, Česká republika; michal.liptak@fsv.cvut.cz

Abstract

This article describes the part of student project „Adaptation to climate change in water management“, dividing of Czech Republic to climatic areas, and choosing of pilot catchments. In the model were used historical datasets and model data for 2025 – 2085. There were some problems with data evaluation, so we have to find some solution of that problems. At the end of the article is a summary of knowledge and suggestion of adaptation measures.

Klíčová slova: změna klimatu; adaptace; povodí; klimatická data

Úvod a formulace cílů

Změna klimatu je stále velmi často diskutovaným tématem. Méně diskutovaným tématem jsou však dopady těchto změn na obyvatele a krajinu, ve které žijí a způsoby, jak se těmto změnám přizpůsobit, adaptovat se. Když se zaměříme na předpokládané dopady klimatické změny na krajinu, vidíme, že se jedná o více-oborovou záležitost.

V zemědělství pravděpodobně dojde ke změně osevních postupů a bude kladen důraz na odolné plodiny v důsledku extrémního počasí (přívalové deště / sucha). Zvýší se ohroženost pozemků a škody způsobené erozí.

V urbanizovaných oblastech budou kladeny větší nároky na zachytávání dešťové vody, nebo na bezpečné odvedení extrémních srážkových událostí. Dále zde bude důraz na izolaci budov a udržení teplotního optima uvnitř staveb. Extrémní teploty bude potřeba zohlednit i u dopravních staveb, aby nedocházelo k jejich porušení.

Dalším zasaženým oborem je vodní hospodářství. Zde se bude zvyšovat význam akumulace vody během extrémních srážkových událostí. Dále se jedná o akumulaci vodních zdrojů pro pitnou, průmyslovou a užitkovou vodu v obdobích s podprůměrnými srážkovými úhrny.

Dopady se však budou projevovat i v dalších odvětvích, jako je například lesnictví, či myslivost. Bude zasažena i energetika, kdy dojde ke změně distribuce energie během roku (menší nároky na vytápění v zimě / vyšší nároky na klimatizaci v létě).

Pozitivní oteplení v zimě a menší počet umrzlých bezdomovců bude do jisté míry kompenzován nárůstem obětí vln veder v letních měsících.

Studentský projekt „Adaptace vodního hospodářství na změnu klimatu“ si klade za cíl pomoci krajině a uživatelům krajiny s adaptací na klimatickou změnu. V projektu byl použit způsob tzv. „from bottom to top“, kdy se zaměřuje na projevy změny klimatu v lokálním měřítku jednotlivých povodí. V lokálním měřítku se touto problematikou zabývá také Výzkumný ústav vodohospodářský TGM v Praze, se kterým jsme v rámci projektu úzce spolupracovali.

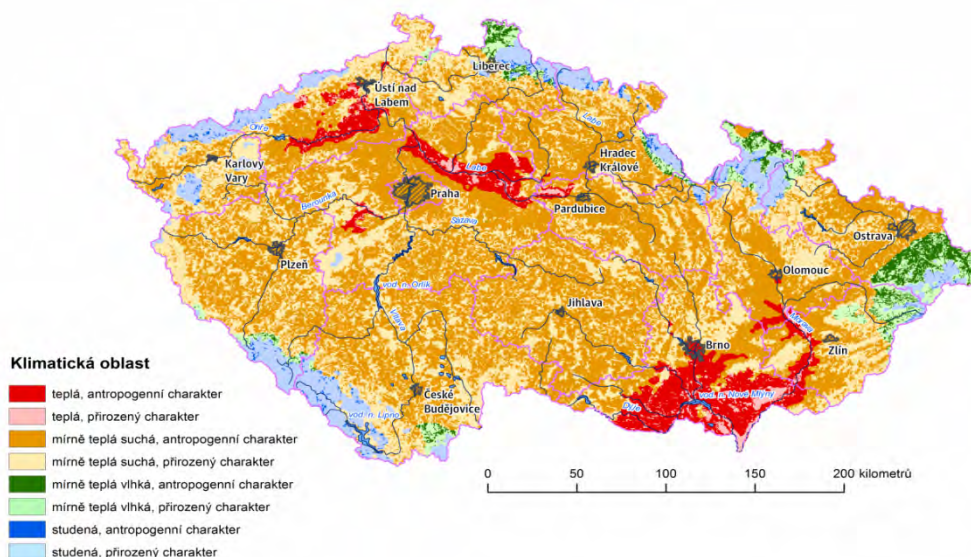
Projekt je rozdělen do tří základních oddílů. První oddíl tvoří teoretické vstupy. Druhý oddíl jsou pilotní projekty, kde jsou sbírána doplňková data. Závěrem projektu je třetí oddíl, kterým je Adaptační průvodce klimatickou změnou. Zde se střetávají teoretické vstupy a informace z jednotlivých pilotních povodí a společně vytváří pracovní postupy adaptačních opatření v daných lokalitách.

Článek popisuje vstupní data potřebná pro sestavení Adaptačního průvodce a práci s nimi.

Materiální a metody

V rámci projektu byla, pro svou rozmanitost, Česká republika rozdělena do zájmových oblastí – klimatických regionů. Pro toto rozdělení jsme vycházeli z Atlasu podnebí ČSR z roku 1958, upraveném v roce 2007 pro účely Atlasu podnebí Česka [1], kde je ČR rozdělena do jednotlivých klimatických kategorií. V našem případě se jednalo o dělení na oblasti teplé, mírně teplé – suché, mírně teplé – vlhké a chladné.

Dále bylo přistoupeno k dělení podle využití krajiny na antropogenní (ovlivněnou člověkem) a přírodní. Jako hlavní ukazatel pro toto zařazení byl použit koeficient ekologické stability [2]. Kombinací těchto dvou kritérií jsme byli schopni rozdělit ČR na celkem 8 klimatických regionů. Viz obrázek 1. Možností, jak rozdělit území ČR je více a zabývali jsme se i volbou vhodného přístupu. Snahou v tomto případě je, aby byly oblasti dostatečně charakteristické, tedy aby byly důsledky klimatické změny v rámci daného rozdělení co možná nejkonzistentnější. Na druhou stranu dělení nemůže být příliš podrobné (např. na 25 a více oblastí), protože pak by již toto rozdělení nepřinášelo očekávané zjednodušení pro koncové uživatele Adaptačního průvodce klimatickou změnou.



Obr. 1 Dělení ČR na charakteristické oblasti

V takto rozdělené republice byl proveden výběr vhodných lokalit pro pilotní povodí. Výběr se řídil zastoupením požadované klimatické oblasti na ploše povodí. Dalším kritériem byla velikost povodí. Abychom zajistili co možná nejvyšší kvalitu terénních průzkumů každého povodí, byla velikost povodí stanovena na cca 100 km². Zvolené pilotní oblasti jsou přehledně zobrazeny v tabulce 1.

Tab. 1 Výběr lokalit pro pilotní povodí [3]

Oblast	Antropogenní	Přírodní
Teplá	Polabí	Podyjí
Mírně teplá – suchá	Žatecko	Kokořínsko
Mírně teplá – vlhká	Ostravsko	Třeboňsko
Chladná	<i>V ČR se nevyskytuje</i>	Krkonoše

Dalšími vstupy byly měřená data z klimatologických stanic za období 1965 – 2010. Nicméně tato data se vzhledem k charakteru studentského projektu a rozpočtu nepodařilo zajistit v dostatečné kvalitě pro všechna povodí. Z tohoto důvodu bylo ve druhé třetině řešení projektu nutno využít data přepočítaná (tzv. „Štěpánkova data“) a aplikovat je zpětně na již analyzovaná povodí.

Jedná se klimatická data, která byla z meteorologických stanic přepočítána do sítě gridboxů o straně 20 km tak, aby vyhovovaly dynamickým klimatickým modelům, které preferují plošná data, nikoli bodová (meteorologické stanice). Tyto body byly počítány až ze šesti nejbližších stanic do maximálního rozdílu nadmořské výšky 500 m metodou vážených průměrů podle vzdálenosti [4].

Výsledky a diskuze

V průběhu projektu, ve druhém oddíle, byly vytvořeny studie a vyhodnoceny data na jednotlivých povodích. Terénními průzkumy lokalit a rozhovory s místními uživateli půdy (zemědělci, lesníci, rybáři, hasiči, starostové a další) byly zjištěny skutečnosti, které nelze vyčíst ze statistických výstupů vyhodnocených dat. Tyto informace byly následně kombinovány právě s vyhodnocenými daty a tvoří tak unikátní datový soubor, který popisuje změny v oblastech, ale i vystihuje pravou charakteristiku dané lokality.

Aby bylo možné pohlížet na problematiku změny klimatu v oblasti povodí nejen z pohledu minulosti a přítomnosti, bylo zapotřebí využití modelovaných datových řad pro budoucí vývoj. V našem případě byla využita spolupráce s VÚV TGM, kde jsme získali datové řady z modelu hydraulické bilance BILAN. BILAN je běžně používaný model pro modelaci klimatu v ČR od 90. let 20. století. Modeluje právě na oblast povodí, jakožto uzavřeného celku. Výstupy z BILANu jsme dostali v měsíčním kroku a bylo použito cca 20 regionálních klimatických modelů (RCM).

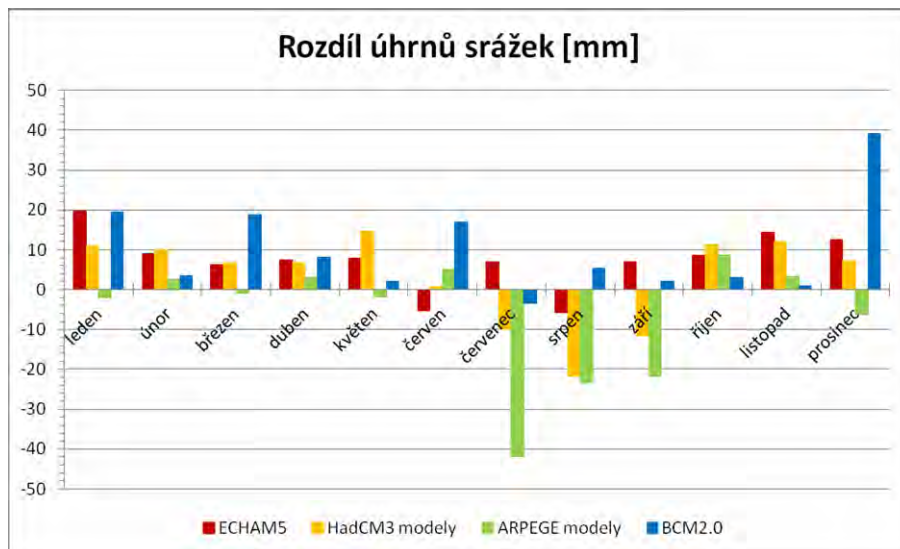
Vzhledem k množství modelů a jejich rozdílným výstupům bylo přistoupeno k sloučení několika RCM podle globálního klimatického modelu (GCM) ze kterého vycházely. Získali jsme tak rozdělení do pouhých čtyř skupin.

1. ECHAM5 driven (Jungclaus 2006)
2. HadCM3Q0, HadCM3Q3, HadCM3Q16 driven (Collins et al. 2006)
3. ARPEGE4.5 and 5.1 driven (Salas-Mélia et al. 2005)
4. BCM2.0 driven (Furevik et al. 2003)

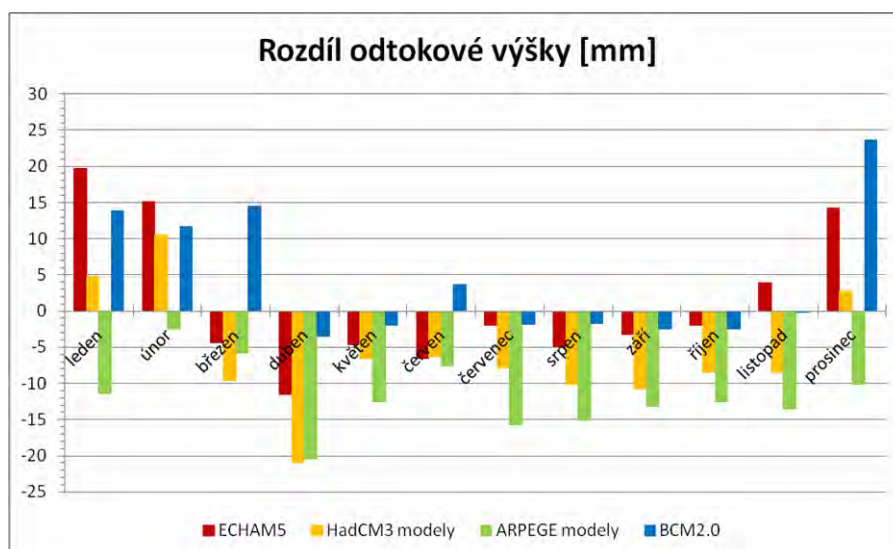
Při vyhodnocení těchto skupin byl i nadále sledován fakt, že každá skupina modelů vykazuje jiné výsledky. Jak je ukázáno na následujících grafech (obr 2,3,4), tak rozdílnost predikce je značná. Největší nejistota je vidět na grafech 2 a 3, které se zabývají predikcí srážek a odtoků. V grafech je ukázána hodnota o kolik se změní aktuální hodnoty do roku 2085. Je vidět, že některé skupiny modelů predikují nárůst srážek / odtoku, jiné zase pokles.

Jediné, v čem se modelace všech čtyř skupin shoduje, je modelace průměrné měsíční teploty, jak je ukázáno v grafu (obr. 4). Jednotlivé skupiny se od sebe liší v hodnotách nárůstu, ale shodují se, že v daných lokalitách dojde k nárůstu průměrných teplot a to ve všech měsících v roce. Naopak u srážek a odtoků se prognózy mezi jednotlivými modely liší.

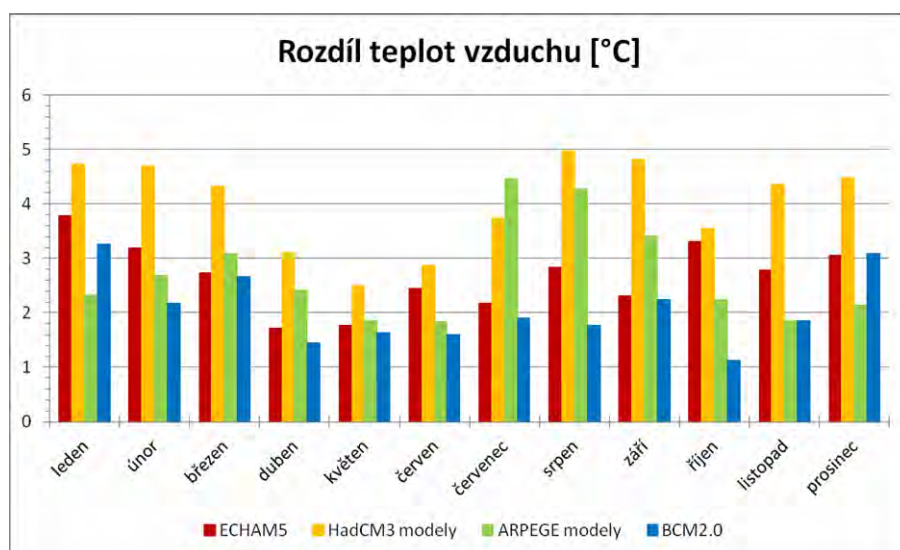
Z mého pohledu je pro použití v České republice nejvhodnější aplikace RCM vyvíjeného v dané lokalitě, tedy ALADIN/CLIMATE /CZ. V rámci projektu se vhodnost místního klimatického modelu nepotvrdila, ani nevyvrátila.



Obr. 2 Graf rozdílu úhrnů srážek mezi roky 2025 – 2085 [mm]



Obr. 3 Graf rozdílu odtokové výšky mezi roky 2025 – 2085 [mm]



Obr. 4 Graf rozdílu teploty mezi roky 2025 – 2085 [°C]

Závěr

Na základě měřených hodnot, „Štěpánkových dat“, terénních průzkumů, rozhovorů s odborníky v lokalitách i podle modelovaných hodnot je jasně vidět, že se klima mění a je potřeba na tuto změnu reagovat. Adaptace je jednou z možných reakcí na již probíhající změny. Důležitou složku však hrají i modelované data, u kterých není možné přesně určit, které modely jsou dnes nejpřesnější. I přes to lze určit, jakým směrem se pravděpodobně klima bude ubírat.

Pro Českou republiku je z pohledu klimatické změny vhodné zdůraznit zejména pokles srážkových úhrnů v období červenec - září (graf na obr. 2) ve spojení s výrazně vyššími teplotami (graf na obr. 3). Dosud byly převážně zdůrazňovány projevy extrémních srážkových úhrnů, jako jsou záplavy a zvýšená eroze (z měsíčních hodnot nelze potvrdit ani vyvrátit). Do budoucna je ale nutné počítat i s poklesem zásob vody, zvýšenými nároky pro závlahy, nebo nižšími průtoky v tocích, jak je patrné v grafu na obr. 4. Některé dopady lze zmírnit, pokud se na ně včas adaptujeme, některých změn lze dokonce využít.

Poděkování

Článek vznikl za podpory grantu SGS10/239/OHK1/3T/11 „Adaptace vodního hospodářství na změnu klimatu“.

Seznam použité literatury

- [1] ČHMÚ: Atlas podnebí Česka, Praha: ČHMÚ, 2007, 255 s. ISBN 978-80-86690-26-1
- [2] Míchal I. (1994) Ekologická stabilita, Brno: Veronica, 276 s. ISBN 80-85368-22-6.
- [3] Bolom J., Dočkal M., Lipták M. (2011) Klasifikace povodí z pohledu klimatické změny v ČR, sborník příspěvků, ENVIRO Nitra.
- [4] Štěpánek P., Zahradníček P., Huth R. (2011) Quarterly Journal of the Hungarian Meteorological Service, Vol. 115, p 87.

Geogénne vs. antropogénne znečistenie riečnych sedimentov potenciálne toxickými stopovými prvkami na modelových lokalitách

Alexandra Pažická¹, Jana Michňová²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra geochemie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; pazicka@fns.uniba.sk

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra ložiskovej geológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Rtg diffraction analysis was used to evaluate the stream sediments mineralogical composition of Malý Dunaj, Nitra and Hron rivers. Identified minerals in the sediment samples, in addition with chemical analysis of selected elements (As, Sb, Hg, Cu, Pb), helped to determine the origin (geogenic vs. anthropogenic) of these potentially toxic trace elements. The results show that Malý Dunaj sediments are mostly loaded with anthropogenic contamination (agriculture, industry). Heavy minerals identified in Nitra sediments suggest natural higher concentrations of Cu, Pb and Fe. On the other hand As and Hg contamination is caused by human activities. The main sources are the coal ash impoundments in Zemianske Kostolany and Chalmová (for As) and Novácke chemické závody a.s. (for Hg). Stream sediments of Hron river are mostly influenced by the geology of the catchment area (Sb – As deposits in Nízke Tatry, volcanics).

KLúčové slová: Rtg difrakčná analýza; riečny sediment; PTSP, Malý Dunaj, Nitra, Hron

Úvod a formulácia cieľa

Riečne sedimenty predstavujú z hľadiska hodnotenia znečistenia životného prostredia dôležité médium, nakoľko odrážajú aj stav okolitého vodného, geologického a pôdneho prostredia, s ktorým „komunikujú“ prostredníctvom výmeny látok. Zvýšené obsahy potenciálne toxických stopových prvkov (ďalej PTSP) v riečnom sedimente preto môžu predstavovať potenciálne riziko pre ostatné zložky životného prostredia. Toto riziko závisí od miery mobility kontaminantu, ktorá je ovplyvňovaná mnohými faktormi prostredia, ako aj spôsobom jeho viazania v sedimente. PTSP prítomné v kryštálovej mriežke minerálov sú všeobecne menej mobilné ako kovy sekundárne sorbované z vodného prostredia [1, 2].

Pomocou Rtg difrakčnej analýzy je možné na základe identifikácie minerálnych fáz riečneho sedimentu rozlíšiť geogénny resp. antropogénny pôvod PTSP. Prítomnosť ťažkých minerálov v sedimentoch znosovej oblasti naznačuje prirodzený pôvod týchto prvkov, teda ich menej mobilné formy. Naproti tomu jemnozrnné, najmä ílové, minerály vytvárajú predpoklad pre prítomnosť sekundárne viazaných kontaminantov prevažne z antropogénnych zdrojov znečistenia.

Na základe výsledkov chemických analýz v rámci monitoringu riečnych sedimentov [3] boli pre ďalšie hodnotenie vybrané riečne sedimenty z lokalít, na ktorých boli preukázané

zvýšené koncentrácie hodnotených PTSP (As, Sb, Hg, Cu, Pb).

Cieľom príspevku je zhodnotiť minerálne zloženie vzoriek riečnych sedimentov a na jeho základe identifikovať pôvod PTSP.

Materiál a metódy

Vzorky riečnych sedimentov boli odobrané v rámci monitoringu riečnych sedimentov ŠGÚDŠ [3]. Odber jemnozrnného sedimentu bol realizovaný metódou tzv. asociačnej vzorky, pozdĺž brehu povrchového toku (zvyčajne do 20 m), do obalov z PVC materiálu.

Na základe chemickej analýzy stopových prvkov boli vybrané vzorky charakterizujúce lokality: Malý Dunaj - Kolárovo, Nitra - Chalmová a Hron - Sliač.

Pre účel Rtg difrakčnej analýzy boli vzorky sitované pod frakciu 2 mm. Ťažká frakcia bola získaná metódou šlichovania. Následne boli celkové aj ťažké frakcie homogenizované v achátovej miske.

Rtg difrakčná prášková analýza bola vykonaná na pracovisku VVC SOLIPHA, PriF UK, na prístroji BRUKER D8 Advance v geometrii Theta-2Theta s Cu antikatódou ($\lambda_{\alpha_1} = 1,54060 \text{ \AA}$), Ni K β filtrami a detektorom LynxEye, pri napätí 40 kV a prúde 40 mA. Krok zaznamenávania intenzít bol $0,01^\circ 2\Theta$ pri čase 1 s, meraný rozsah záznamu $4 - 94^\circ 2\Theta$.

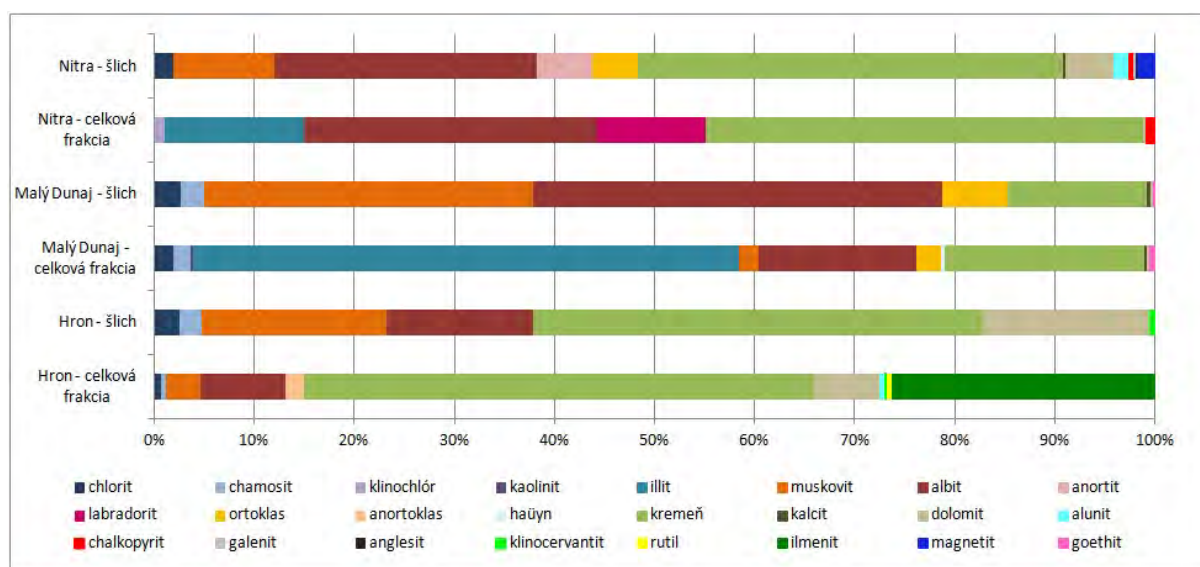
Rtg difrakčné záznamy boli najskôr vyhodnotené v programe DIFFRAC^{plus} EVA. Následne bola kvantitatívnou Rietveldovou metódou, pomocou programu DIFFRAC^{plus} TOPAS vykonaná semikvantitatívna analýza. Program TOPAS spresňuje štruktúrne parametre minerálov v Rtg zázname so štandardizovanými štruktúrnymi parametrami a následne prepočítava ich percentuálne zastúpenie.

Výsledky a diskusia

Výsledky chemickej analýzy [3] v porovnaní s hodnotami udávanými v Geochemickom atlase SR [4] vykazujú zvýšené koncentrácie vybraných stopových prvkov (As, Sb, Hg, Cu, Pb) na všetkých troch hodnotených lokalitách. Na lokalite Hron – Sliač bol prekročený limit kategórie B (indikujúci silné znečistenie) pre prvky Cu, Hg a Sb. Obsah Hg vo vzorke Nitra – Chalmová dokonca prekračuje limit kategórie C, ktorý predpokladá sanačný zásah [5].

Rieka Malý Dunaj preteká neogénnymi sedimentmi Podunajskej nížiny. Semikvantitatívna analýza celkovej frakcie riečneho sedimentu z lokality Malý Dunaj – Kolárovo preukázala prevahu ílových minerálov (58,44%; Obr. 1). Vo veľkej miere boli

zastúpené aj kremeň (19,88%) a živce (18,20%) pravdepodobne pochádzajúce z granodioritov Malých Karpát. Sb-Au zrudnenie charakteristické pre oblasť Perneku a Pezinka v Malých Karpatoch by mohlo byť príčinou zvýšených koncentrácií Sb a Cu (ako sprievodný prvok zrudenia) vo vzorkách. Minerály týchto, ani ostatných hodnotených PTSP, však neboli identifikované ani v šlichovanej frakcii. Predpokladáme preto, že sa prednostne vyskytujú vo forme sorbovaných iónov na ílové minerály resp. na oxohydroxidoch železa (identifikovaný bol v oboch frakciách goethit). Podobne ako iní autori [4, 6] priradujeme preto zvýšené koncentrácie PTSP v sedimentoch Malého Dunaja skôr ich antropogénnym zdrojom znečistenia, prevažne poľnohospodárstvu a vinohradníctvu (As, Cu), ale aj rozšírenému priemyslu (Hg, Pb) v oblasti.

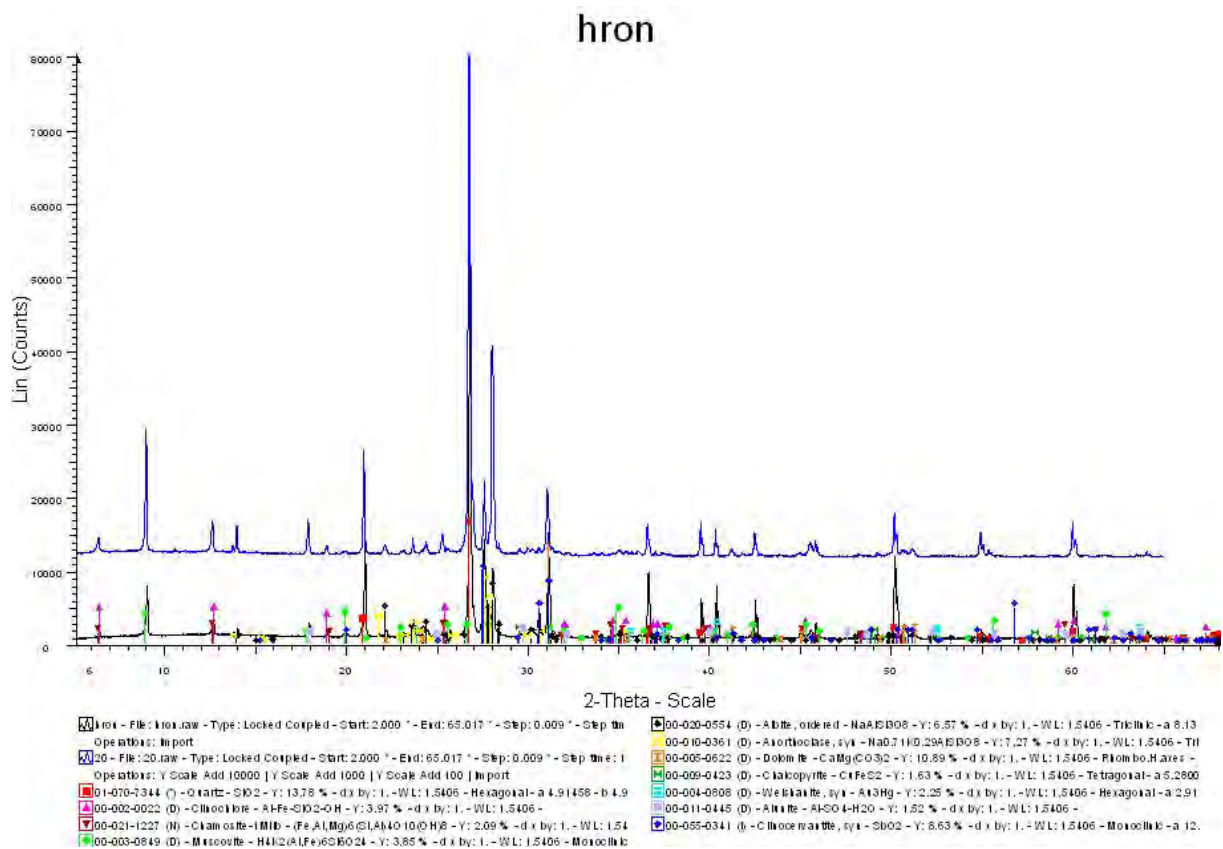


Obr. 1 Percentuálne zastúpenie jednotlivých minerálov na základe semikvantitatívnej analýzy v programe TOPAS

Rieka Nitra predstavuje (po odberové miesto Chalmová) znosovú oblasť pre granitoidné, vulkanické a najmä karbonátové horniny. V porovnaní so sedimentom Malého Dunaja sa na stavbe riečnych sedimentov z Nitry (Obr. 1) podieľajú ílové minerály vo výrazne nižšej miere (14,92%). Prevládajú kremeň (43,68%) a živce (40,20%) z jadrových pohorí a neovulkanitov. V ťažkej frakcii bol určený aj minerál alunit charakteristický pre sopečné horniny a stanovené boli aj ťažké minerály: magnetit (1,81%), chalkopyrit (0,43%), galenit (0,27%) a jeho oxidačný produkt anglesit (0,09%), ktoré súvisia so zrudnením oblasti Hornej Nitry. Napriek zvýšeným obsahom As a hlavne Hg (prekročený C limit) neboli identifikované žiadne ťažké minerály týchto prvkov. Pôvod As v riečnych sedimentoch je priradený geogénno-antropogénnym zdrojom súvisiacim s ťažbou a spracovaním hnedého

uhlia bohatého na As a s ukladaním odpadu zo spaľovania na odkaliská v Zemianskych Kostolnoch a Chalmovej [7, 8]. Antropogénnym zdrojom ortute by mohli byť odpadové vody z Nováckych chemických závodov, ale nie sú vylúčené ani iné zdroje [9]. Pb a Cu v sedimentoch Nítry pochádzajú pravdepodobne z hornín stredoslovenských vulkanitov [4].

Geogénne sú riečne sedimenty Hrona ovplyvnené horninami stredoslovenských neovulkanitov (Pb, Cu), z pohľadu PTSP (najmä Sb a As, menej Cu, Hg) ale predovšetkým zrudnením v kryštaliniku Nízkych Tatier (ložisko Medzibrod) [4, 10, 11]. V minerálnom zložení riečného sedimentu (Obr.1) z lokality Hron – Sliach prevládajú kremeň, muskovit, karbonáty a živce. Predpokladáme, že úprava vzorky na ťažkú frakciu nebola dostatočná, nakoľko celková frakcia vykazuje nižšie obsahy ťažkých minerálnych fáz a boli v nej identifikované minerály chalkopyrit (0,10%), klinocervantit (0,09%), rutil (0,48%) a ilmenit (až 26,35%), zatiaľ čo v ťažkej frakcii bol zastúpený iba klinocervantit (0,55%). Prítomnosť klinocervantitu však potvrdzuje geogénny zdroj Sb. Pravdepodobným antropogénnym prispievateľom k obsahu Hg v sedimentoch Hronu môžu byť papierne Harmanec.



Obr. 1 Rtg difrakčný záznam riečného sedimentu Hrona (čierna – celková frakcia; modrá – ťažká frakcia; pravdepodobne zamenené) z programu DIFFRAC^{plus} EVA

Pre ložisko Medzibrod je charakteristický popri Sb aj vyšší obsah Au [10]. Pri vyhodnocovaní difrakčného záznamu v programe EVA (Obr.2) bol identifikovaný minerál Au weishanit, ktorý však nebol v programe TOPAS potvrdený.

Aj v niektorých ďalších prípadoch ťažké minerály identifikované programom EVA neboli potvrdené v programe TOPAS. Nezhody vo vyhodnocovaní v týchto dvoch programoch mohli súvisieť s veľkosťou a kryštalinitou niektorých minerálov, kedy program TOPAS nebol schopný spresniť kryštalovú štruktúru a tak zastúpenie minerálu bolo určené ako nepatrné (stotiny %) a nezapočítané do celkového percentuálneho zastúpenia. Avšak pri porovnaní Rtg záznamov s výsledkami chemickej analýzy je pravdepodobné, že dané minerálne fázy sú prítomné.

Záver

Na základe analýzy chemického a mineralogického zloženia považujeme riečne sedimenty Malého Dunaja za prevažne antropogénne znečistené. Ovplyvnené sú najmä rozvinutou poľnohospodárskou, vinohradníckou a priemyselnou činnosťou v oblasti. Časť obsahov PTSP (Sb, Cu) môže súvisieť so zrudnenými oblasťami v Malých Karpatoch, ale minerály týchto prvkov neboli vo vzorkách riečnych sedimentov zastúpené. Prítomnosť ťažkých minerálov v sedimentoch Hrona odráža prevládajúcu geogénnu kontamináciu pochádzajúcu, v prípade Sb a As (menej Cu a Hg) z ložiskových oblastí v Nízkych Tatrách, v prípade Pb a Cu z neovulkanitov. Podiel na obsahoch Hg môžu mať antropogénne zdroje, napr. Harmanecké papierne. Sedimenty rieky Nitra sú značne antropogénne zaťažené. Vysoké obsahy As súvisia predovšetkým s ťažbou a spaľovaním hnedého uhlia a s ukladaním elektrárenských popolov na odkaliskách (Zemianske Kostol'any, Chalmová). Novácke chemické závody sa pokladajú za hlavný antropogénny zdroj Hg v oblasti. Identifikované ťažké minerály Cu a Pb naznačujú ich prirodzený pôvod.

Počas práce sa prejavilo separovanie ťažkej frakcie šlichovaním ako nedostatočné. Pre presnejšiu identifikáciu minerálnych fáz, ktoré viažu PTSP sa preto do budúca uvažuje pre účely Rtg difrakčnej analýzy s rozdelením na viaceré zrnitostné frakcie (jemná frakcia dekantáciou, lepšie odseparovanie ťažkej frakcie použitím bromoformu), prípadne so sekvenčnými extrakciami sedimentov.

Okrem využitia Rtg difrakčnej práškovej analýzy na určenie predbežného minerálneho zloženia na základe štruktúry minerálov sa plánujú využiť podrobnejšie a presnejšie metódy, napr. mikroskopia výbrusov a mikrosonda.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporená Grantom *UK/209/2012*.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Maiz I., Esnaola M.V., Millán E. (1997) *Sci. Total Environ.* 206, p.107
- [2] Li X., Shen Z., Wai O.W.H. et al. (2001) *Mar. Pollut. Bull.* 42, p.215
- [3] Kordík J., Slaninka I., Bodiš D. (2011) *Monitoring riečnych sedimentov*. In: Iglárová L., Wagner P., Hrašna M. et al. (2011) *Čiastkový monitorovací systém – geologické faktory, správa za obdobie 2002 – 2009, záverečná správa*. MŽP SR Bratislava, ŠGÚDŠ, Bratislava
- [4] *Geochemický atlas Slovenskej republiky, Riečne sedimenty (1999)* Ministerstvo životného prostredia SR, Geologická služba SR, Bratislava
- [5] *Rozhodnutie Ministerstva pôdohospodárstva SR č. 531/1994-540 o najvyšších prípustných hodnotách škodlivých látok v pôde a o určení organizácií oprávnených zisťovať skutočné hodnoty týchto látok*
- [6] Ďuričková A., Fláková R., Seman M. et al. (2010) *Podzemná voda* 16(2), p.181
- [7] Jurkovič L., Veselská V., Gučková V. et al. (2008) *Acta Environmentalica Universitatis Comenianae* 16(1), p.47
- [8] Jurkovič L., Hiller E., Veselská V. et al. (2011) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 86(4), p.433
- [9] Výboch M., Földešová K. (2003) *Podzemná voda* 9(1), p.23
- [10] Petrák M., Čavajda V., Šottník P. (2011) *Acta Geologica Slovaca* 3(2), p.143
- [11] Chovan M., Lalinská B., Šottník P. et al. (2010) *Mineralia Slovaca* 42, p.95

Vplyv Zn^{2+} na niektoré rastové a biochemické parametre rastlín repky olejky (cv. Verona)

Matúš Peško

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra environmentálnej ekológie, Mlynská dolina B2, 842 15 Bratislava, SR
pesko@fns.uniba.sk

Abstrakt

Influence of Zn^{2+} on some physiological and biochemical parameters of hydroponically cultivated plants of rapeseed (*Brassica napus* L.; cv. Verona) was evaluated. Concentration range of studied metal used in experiment was 25 – 1000 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. Dry mass of shoots and roots was significantly affected in concentration interval 200-1000 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ Zn^{2+} . Decrease in concentration of photosynthetic pigments and proteins in leaves was notable after application of 25 and 200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ Zn^{2+} , respectively. Concentration of TBARS in leaves rose with increasing concentration of studied metal in external solution. The amount of Zn accumulated in roots was approximately 9,8 to 11-times higher than in shoots.

Key words: assimilation pigments; accumulation; *Brassica napus* L.; dry mass; proteins; TBARS; zinc

Úvod a formulácia cieľa

Brassica napus L. (repka olejka) je významná poľnohospodárska plodina pre výrobu stolového oleja. V súčasnosti sa repkový olej používa tiež vo výrobe biopalív. Repka olejka je známa svojou schopnosťou akumulovať významné množstvá kovov v nadzemnej časti, pričom výhodou tohto druhu je tiež vysoký obsah biomasy rastlín a dostupnosť veľkého počtu genotypov [1].

V prírode sa pôdna koncentrácia Zn pohybuje v intervale 30 – 150 mg kg^{-1} , pričom biologicky dostupná časť je $< 10 \text{ mg kg}^{-1}$ [2]. Na tejto koncentračnej úrovni je zinok pre rastliny esenciálny, avšak aktivity ľudí (napr. ťažobný priemysel, hutníctvo) túto koncentráciu umelo zvyšujú na úroveň, ktorá môže byť pre životné prostredie a zdravie človeka nebezpečná.

Zinok je súčasťou viac ako 300 enzýmov a patrí medzi najdôležitejšie mikroživiny pre normálny rast a vývin rastlín. Podieľa sa na mnohých fyziologických procesoch, vrátane respirácie, fotosyntézy a biosyntézy rastlinných hormónov [3, 4]. Známa je tiež jeho významná úloha v obrannom mechanizme bunky voči oxidačnému stresu, ktorý negatívne ovplyvňuje membránové lipidy, koncentrácie chlorofylu, tiolových skupín proteínov, nukleových kyselín a i. [5].

Nadbytok Zn však môže mať nepriaznivé účinky na rastliny. Akumulácia vyšších koncentrácií zinku môže spomaliť alebo úplne zastaviť rast a vývin koreňa a spôsobiť listovú

chlorózu [6]. Podobne ako iné kovy, zinok spúšťa tvorbu reaktívnych kyslíkových druhov (ROS), čo vedie k oxidačnému poškodeniu buniek a peroxidácii membránových lipidov [7].

Cieľom tejto práce bolo študovať vplyv Zn^{2+} na niektoré rastové a biochemické parametre hydroponicky pestovaných rastlín repky olejky (cv. Verona). Sledovali sa rastové parametre (dĺžka, sušina) jednotlivých rastlinných orgánov (korene a výhonky) a niektoré biochemické parametre ako koncentrácia asimilačných pigmentov, celková koncentrácia proteínov a koncentrácia TBARS v listoch.

Materiál a metódy

Kultivácia rastlín v prítomnosti Zn^{2+} : Semená repky olejky (*Brassica napus* L.), cv. Verona sa vysiali do pôdy a po 3 týždňoch sa premiestnili do Hoaglandovho roztoku s obsahom 0, 25, 50, 100, 200, 500 a 1000 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Po 7-dňovej kultivácii v kontrolovaných podmienkach (16 h svetlo/8 h tma; žiarenie: 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PAR; priemerná teplota vzduchu: 25 °C) sa stanovila dĺžka, ako aj čerstvá hmotnosť a sušina koreňov a výhonkov rastlín. Koncentrácia asimilačných pigmentov (chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a karotenoidy) v listoch rastlín sa po extrakcii 80 %-ným acetónom stanovila spektrofotometricky (Genesys 6, Thermo Scientific, U.S.A) a vyhodnotila podľa Lichtenthalera [8].

Stanovenie obsahu proteínov v listoch rastlín: Koncentrácia proteínov sa stanovila podľa Bradfordovej [9]. K 100 μl vzorky sa pridal 1 ml Bradfordovej činidla (0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7 % (v/v) etanolu, 8,5 % (v/v) H_3PO_4). Reakčná zmes sa inkubovala pri laboratórnej teplote 5 min. a následne sa zmerala jej absorbanca pri vlnovej dĺžke 595 nm. Koncentrácia proteínov sa vypočítala z kalibračnej krivky (z rovnice regresie), pričom ako štandard sa použil hovädzí sérový albumín (BSA).

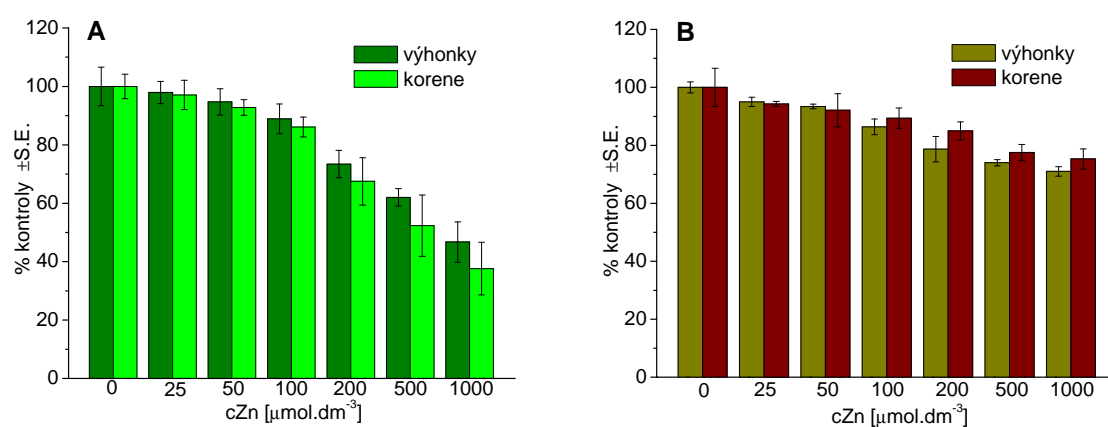
Stanovenie koncentrácie malondialdehydu (MDA) v listoch rastlín: Koncentrácia MDA sa stanovila vo forme látok reagujúcich s kyselinou tiobarbiturovou (TBARS). K 2 ml vzorky sa pridal 1,5 ml reakčného činidla (20 % (w/v) CCl_3COOH a 0,5 % (w/v) kyseliny tiobarbiturovej) a 100 μl butylovaného hydroxytoluénu (4 % (w/v) v 95 % etanole). Reakčná zmes sa inkubovala 30 min. pri teplote 90 °C a následne sa ochladila v ľadovom kúpeli (10 min.). Absorbanca inkubovanej zmesi sa zmerala pri vlnovej dĺžke 532 nm a obsah TBARS sa vypočítal použitím extinkčného koeficientu $\epsilon=155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [10].

Stanovenie obsahu Zn v rastlinných orgánoch: Obsah zinku v sušine koreňov a výhonkov rastlín repky olejky sa stanovil pomocou atómovej absorpčnej spektrometrie (Perkin Elmer 1100, USA) na ULVG PriF UK v Bratislave.

Výsledky a diskusia

Trojtyždňové rastliny repky olejky (cv. Verona) pestované hydroponicky po dobu 7 dní v prítomnosti Zn^{2+} ($25-1000 \mu\text{mol dm}^{-3}$) vykazovali známky chlorózy už po aplikácii najnižšej študovanej koncentrácie ($25 \mu\text{mol dm}^{-3}$). V prípade aplikácie 500 a $1000 \mu\text{mol dm}^{-3}$ Zn^{2+} bol vzrast rastlín nižší ako u kontrolných rastlín, niektoré listy boli zvädnuté a/alebo zoschnuté ($1000 \mu\text{mol dm}^{-3}$) a korene výrazne zhnednuté a subtilne.

Závislosť sušiny výhonkov a koreňov (obr. 1A), ako aj dĺžky jednotlivých rastlinných orgánov (obr. 1B) rastlín *B. napus* od aplikovanej koncentrácie Zn^{2+} je znázornená na obr. 1.

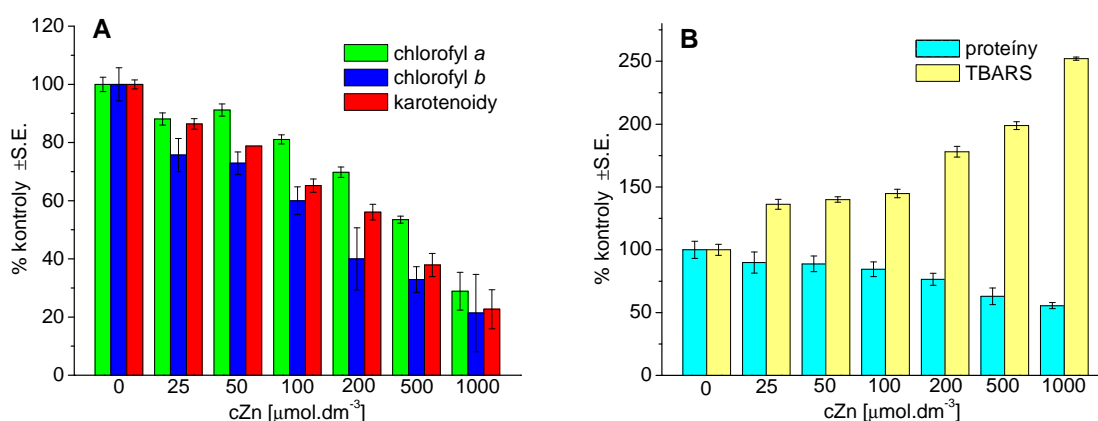


Obr. 1: Závislosť sušiny výhonkov a koreňov (A), ako aj dĺžky výhonkov a koreňov (B) rastlín repky olejky (vyjadrené v percentách kontroly) od aplikovanej koncentrácie Zn^{2+} ; S.E. = stredná chyba priemeru

Sušina koreňov rastlín reagovala na prítomnosť zinku v živnom roztoku citlivejšie ako sušina výhonkov. V prípade dĺžok jednotlivých rastlinných orgánov to bolo opačne. V koncentračnom intervale Zn^{2+} $25-100 \mu\text{mol dm}^{-3}$ bola sušina rastlinných orgánov negatívne ovplyvnená len minimálne. Ďalším zvyšovaním koncentrácie kovu dochádzalo k výraznému úbytku biomasy oboch rastlinných orgánov. V prípade rastlín ošetrených najvyššou koncentráciou zinku ($1000 \mu\text{mol dm}^{-3}$) došlo v porovnaní s kontrolou k poklesu sušiny o 53 % (výhonky), resp. 62 % (korene). Dĺžka jednotlivých orgánov bola vo všeobecnosti ovplyvnená nadbytkom Zn^{2+} v menšej miere ako ich sušina. Wang et al. [6] pozorovali na mladých rastlinách *B. napus* ošetrených Zn^{2+} ($0,07-1,2 \text{ mmol dm}^{-3}$; kultivácia 7 dní) inhibíciu rastu jednotlivých orgánov, poškodenie koreňov, chlorózu novovyvinutých listov a znížený obsah chlorofylu *a* a *b*.

Závislosť koncentrácie asimilačných pigmentov (chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a karotenoidy) (obr. 2A), koncentrácie proteínov a TBARS (obr. 2B) v listoch rastlín repky

olejky od aplikovanej koncentrácie Zn^{2+} je znázornená na obr. 2. Značný pokles koncentrácie asimilačných pigmentov sa pozoroval už po aplikácii $25 \mu\text{mol dm}^{-3} Zn^{2+}$. V koncentračnom intervale $25\text{-}1000 \mu\text{mol dm}^{-3}$ bol spomedzi pigmentov najviac ovplyvnený obsah chlorofylu *b*. Citlivosť chlorofylu *a* bola na prítomnosť Zn^{2+} v kultivačnom roztoku naopak najnižšia. Pokles koncentrácie pigmentov v listoch rastlín sa v študovanom koncentračnom intervale Zn^{2+} $25\text{-}1000 \mu\text{mol dm}^{-3}$ pohyboval v porovnaní s kontrolou v rozmedzí 3-71 % (chl *a*), 24-79 % (chl *b*) a 14-77 % (karot.). Tento pokles môže súvisieť s inhibíciou biosyntézy chlorofylu následkom nedostatku mikroživín alebo s inhibíciou enzýmov participujúcich pri syntéze chlorofylu. Pokles koncentrácie pigmentov môže byť spôsobený aj výmenou atómu Mg za Zn v molekule chlorofylu [11,12].

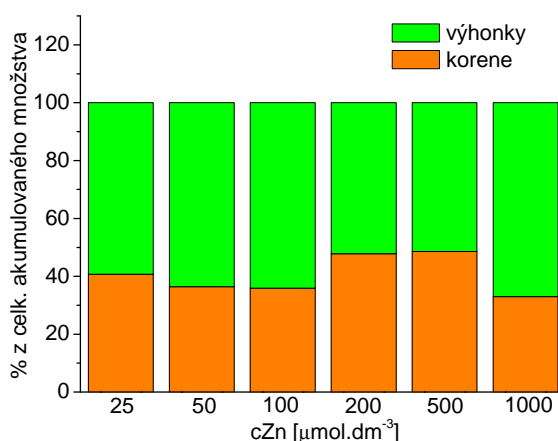


Obr. 2: Závislosť koncentrácie asimilačných pigmentov (A) a koncentrácie proteínov a TBARS (B) v listoch rastlín repky olejky (vyjadrených v percentách kontroly) od aplikovanej koncentrácie Zn^{2+} ; S.E. = stredná chyba priemeru

Koncentrácia proteínov (obr. 2B) v listoch rastlín klesala so zvyšujúcou sa koncentraciou iónov zinku v externom roztoku. Aplikácia vyšších koncentrácií Zn^{2+} ($200\text{-}1000 \mu\text{mol dm}^{-3}$) spôsobila pokles koncentrácie proteínov oproti kontrole o 25 až 44 %. Pokles koncentrácie proteínov v listoch rastlín vplyvom nadbytku Zn^{2+} môže byť spôsobený následkom zvýšenej aktivity proteázy alebo iných katabolických enzýmov aktivovaných ťažkými kovmi. Degradácia proteínov je pravdepodobne tiež výsledkom oxidačného stresu spôsobeného vysokými koncentraciami Zn^{2+} [13].

Látky reagujúce s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS) sú spoľahlivými indikátormi peroxidácie lipidov. Závislosť koncentrácie TBARS v listoch rastlín *B. napus* od aplikovanej koncentrácie zinku je znázornená na obr. 2B. Významný nárast koncentrácie týchto látok (o 39 % v porovnaní s kontrolou) bol zaznamenaný už po aplikácii najnižšej koncentrácie ($25 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Koncentrácia TBARS v listoch rastlín, ktoré boli ošetrované $1000 \mu\text{mol dm}^{-3}$

Zn^{2+} presiahla 2,5 násobok koncentrácie týchto látok nameraných v listoch kontrolných rastlín. Zvýšenú peroxidáciu membránových lipidov po aplikácii rôznych koncentrácií Zn^{2+} pozorovali napr. Zhao et al. [14] a Li et al. [15] v experimentoch s rastlinnými druhmi *Phytolacca americana* a *Triticum aestivum*. Autori tiež zaznamenali nárast koncentrácie H_2O_2 a zmeny v aktivite niektorých antioxidantných enzýmov.



Obr. 3: Podiel Zn akumulovaný v koreňoch a výhonkoch rastlín z celkového množstva kovu akumulovaného rastlinou *B. napus* (cv. Verona)

V študovanom koncentračnom intervale 25-1000 $\mu\text{mol dm}^{-3} Zn^{2+}$ sa koncentrácia zinku akumulovaného v koreňoch a výhonkoch zvyšovala lineárne. Akumulácia kovu v koreňoch bola 9,8 až 11-krát vyššia ako vo výhonkoch. Zatiaľ čo pri aplikácii 25 $\mu\text{mol dm}^{-3} Zn^{2+}$ bola koncentrácia kovu v koreňoch 2885 mg kg^{-1} a vo výhonkoch 260 mg kg^{-1} , pri aplikácii 1000 $\mu\text{mol dm}^{-3} Zn^{2+}$ sa príslušné koncentrácie Zn v rastlinných orgánoch zvýšili na 29040, resp. 2970 mg kg^{-1} . Celkový obsah Zn nachádzajúci sa v jednotlivých orgánoch nie je ovplyvnený iba koncentráciou kovu vo výhonkoch alebo koreňoch, ale aj ich aktuálnou sušinou. Podiel Zn alokovaný v nadzemnej časti z celkového množstva kovu akumulovaného rastlinou bol v celom študovanom koncentračnom intervale nad 50 %. Vyššiu alokáciu Zn do nadzemnej časti rastlín *B. napus* potvrdili napr. Brunetti et al. [16] v skleníkových pokusoch. Hodnoty translokačného faktora pre Zn i ďalšie študované kovy >1 , poukazujú na vhodnosť použitia rastlín *B. napus* na fytoextrakciu kovov.

Záver

Toxický účinok Zn^{2+} sa prejavil chlorózou listov už pri najnižšej študovanej koncentrácii 25 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, pričom s ďalším zvyšovaním koncentrácie boli prejavy toxicity výraznejšie. K významnému poklesu koncentrácie asimilačných pigmentov (chlorofyl *a*,

chlorofyl *b*, karotenoidy) a proteínov v listoch rastlín došlo po aplikácii 25, resp. 200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ Zn^{2+} . So zvyšujúcou sa koncentráciou Zn^{2+} v externom roztoku dochádzalo k značnému nárastu obsahu TBARS v listoch rastlín. Potvrdilo sa tiež, že odroda repky olejky Verona je akumulátorom zinku, a vyznačuje sa schopnosťou translokovať významné množstvá tohto kovu do nadzemnej časti rastlín, čo poukazuje na potencionálnu využiteľnosť tohto kultivaru vo fyto-remediácii.

Pod'akovanie

Túto prácu finančne podporili grant UK/210/2012 a Sanofi Aventis Pharma Slovakia.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Wenzel W.W., Unterbrunner R., Sommer P., et al. (2003) *Plant Soil*. 249, p. 96
- [2] Azzarello E., Pandolfi C., Giordano C., et al. (2012) *Environ. Exp. Bot.* 81, p. 11
- [3] Gupta B., Pathak G.C., Pandey N. (2011) *Russ. J. Plant Physiol.* 58, p. 85
- [4] Li X., Yang Y., Zhang J., et. al. (2012) *Ecotox. Environ. Safety.* 86,p. 198
- [5] Cakmak I. (2000) *New Phytol.* 146, p. 185
- [6] Wang C., Zhang S.H., Wang P.F., et al. (2009) *Chemosphere.* 75, p. 1476
- [7] Jin X.F., Yang X.E., Islam E., et al. (2008) *Plant Physiol. Bioch.* 46, p. 1997
- [8] Lichtenthaler H. K. (1987) *Methods Enzymol.* 148, p. 350
- [9] Bradford M. M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, p. 248
- [10] Heath R. L., Packer L. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 125, p. 189
- [11] Upadhyay R. (2010) *J.Hazard.Mater.*17(1–3), p. 1081
- [12] Manios T., Stentifor E.I., Millner P.A. (2003) *Ecol. Eng.* 20, p. 65
- [13] Parlak K.U., Yilmaz D.D. (2012) *Ecotox. Environ. Safety* 85, p. 52
- [14] Zhao H., Wu L., Chai T., et al. (2012) *J. Plant Physiol.* 169, p. 1243
- [15] Li X., Yang Y., Jia L., et al. (2013) *Ecotox. Environ. Safety.* 89, p. 150
- [16] Brunetti G., Farrag K., Rovira P.S., et al. (2011) *Geoderma.* 160, p. 517

Experimentálne biolúhovanie hliníka z tuhej fázy Al_2O_3 v podmienkach statickej kultivácie mikroskopickej vláknitej huby *Aspergillus niger*

Ivana Pífková, Martin Urík, Peter Matúš, Marek Bujdoš

Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Ústav laboratórneho výskumu geomateriálov, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, pifkova@fns.uniba.sk

Abstract

In this article we have evaluated biologically induced leaching of the solid aluminium oxide (Al_2O_3) at the presence of the filamentous fungus *Aspergillus niger*. The growth medium with aluminium oxides (0.25 g/L) was inoculated with a spore suspension of *A. niger* and cultivated at 25 °C for 19 days. Our results suggest that the fungal metabolites significantly promote the release of metal from the solid phase to the solution, when compared to chemical leaching using organic (oxalic and citric acid) or inorganic acids (HCl) within their concentration range reflecting experimental conditions.

Kľúčové slová: biolúhovanie, hliník, *Aspergillus niger*, acidolýza

Úvod a formulácia cieľa

Hliník je najrozšírenejší kov a tretí najrozšírenejší prvok v zemskej kôre, po kyslíku a kremíku. Vzhľadom k svojej reaktivite sa hliník vyskytuje v prírode len v kombinácii s ďalšími prvkami, a to najmä vo forme hlinitokremičitanov a oxidov [1]. Hoci je obsah hliníka v pôde pomerne vysoký, jeho koncentrácia v rastlinných pletivách a živočíšnych tkanivách je nízka, čo vyplýva z jeho nízkej rozpustnosti v neutrálnom prostredí.

Pôsobením tzv. kyslých dažďov a ďalších faktorov, vyplývajúcich z antropogénnej činnosti, sa však mobilita hliníka v pôde zvyšuje a ten sa dostáva do podzemnej vody a vodných zdrojov. To má za následok množstvo nepriaznivých vplyvov na životné prostredie, ako sú vysychanie lesov alebo úbytok v diverzite a abundancii vodnej fauny [2].

Prírodné mikrobiálne lúhovanie, i keď nepriame, v dôsledku metabolickej aktivity pôdných mikroorganizmov, môže taktiež prispievať k lokálnemu uvoľňovaniu hliníka do prostredia. Tento proces tzv. biolúhovania, je založený na interakciách medzi chemickými prvkami viazanými v tuhej fáze a biogénnym lúhovacím činidlom, resp. sekundárnym metabolitom mikroorganizmov (napr. mikroskopických vláknitých húb, heterotrofných baktérií a i.), v dôsledku ktorých sa prvky uvoľňujú do prostredia v rozpustnej forme [3]. Na iniciácii tohto procesu sa podieľajú vylúčené mikrobiálne metabolity, napríklad organické kyseliny (kyselina šťaveľová, citrónová a i.) [4]. Biolúhovanie sa v súčasnosti využíva aj ako

proenvironmentálna metóda na spätné získavanie rôznych vzácnych kovov alebo kovov z nebilančných rudných ložísk [5].

Hlavným cieľom tohto výskumu bolo štúdium účinnosti biolúhovania hliníka z jeho oxidov v laboratórnych podmienkach počas kultivácie mikroskopickej vláknitej huby *Aspergillus niger*, a to v porovnaní s chemickým lúhovaním anorganickými a organickými kyselinami. Tento výskum je tiež úvodom k ďalšiemu štúdiu mechanizmu heterotrofného biolúhovania hliníka vláknitými hubami.

Materiál a metódy

Mikroorganizmus

Kmeň *Aspergillus niger*, použitý v experimentoch, sme získali zo zbierky Mykologického laboratória Slovenskej zdravotníckej univerzity v Bratislave (doc. Ing. Elena Piecková, PhD., MPH).

Biolúhovanie hliníka z tuhej fázy Al_2O_3

Za účelom hodnotenia účinku mikroskopickej vláknitej huby *A. niger* na biolúhovanie hliníka z tuhej fázy Al_2O_3 sme pripravili 40 ml živného média podľa Sabourauda (HiMedia, Mumbai, India), ktoré sme inokulovali 50 μ L suspenziou spór pripravenej zo 14 dňovej kultúry *A. niger*. Do živného média sme ďalej pridali 0,1 g Al_2O_3 (Reanal, Budapešť, Maďarsko). Po 19 dňoch statickej kultivácie pri teplote 25 °C sme vyrastenú biomasu mechanicky oddelili, viacnásobne premyli destilovanou vodou, aby sme odstránili zvyšky živného média a vysušili pri laboratórnej teplote do konštantnej hmotnosti. Nerozpustnú fázu Al_2O_3 sme oddelili od zvyšného roztoku membránovou filtráciou - membránový filter (zmiešaný ester celulózy) s veľkosťou pórov 0,45 μ m (Membrane Solutions, LLC, Shanghai, Čína). Vo filtrátoch sme zistili pH a stanovili obsah celkového hliníka metódou F-AAS (Perkin Elmer, USA). Všetky experimenty boli realizované v troch opakovaníach.

Vplyv organických a anorganických kyselín na uvoľňovanie hliníka z tuhej fázy Al_2O_3

Za účelom hodnotenia chemického lúhovania hliníka z tuhej fázy Al_2O_3 sme pripravili 40 ml živného média podľa Sabourauda (HiMedia, Mumbai, India), pridali sme Al_2O_3 (0,1 g) a upravovali hodnoty pH pridaním 1M HCl alebo 0,1 M NaOH a inkubovali pri 25 °C. Po 19

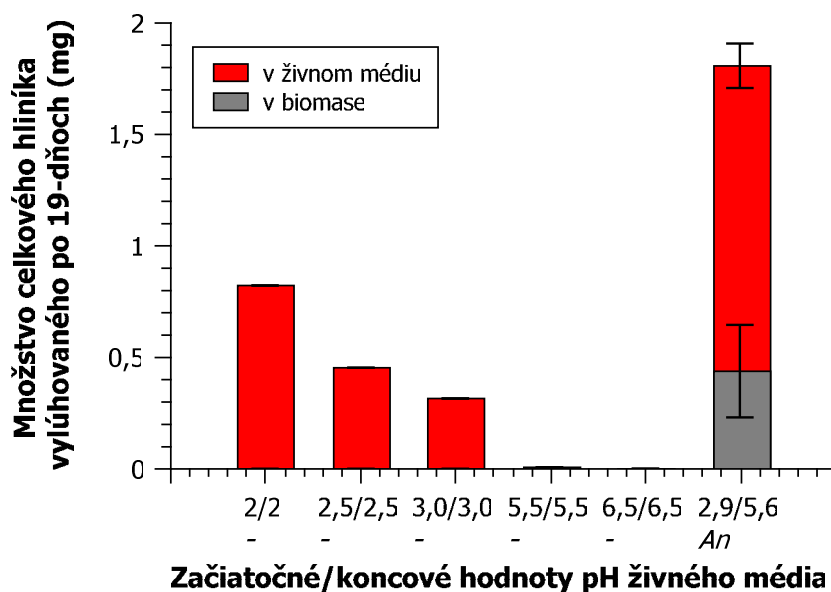
dňoch sme vzorky filtrovali a vo filtrátoch sme stanovili obsah celkového hliníka metódou F-AAS. Ako kontrolu sme použili lúhovanie destilovanou vodou.

Účinok vodných roztokov organických kyselín, kyseliny šťaveľovej a kyseliny octovej s koncentraciami v rozsahu 10 až 100 mM, na lúhovanie hliníka z tuhej fázy Al_2O_3 sme sledovali pri konštantnej teplote 25 °C. Po 24 h sme roztoky prefiltrovali a vo filtrátoch sme stanovili obsahy celkového hliníka metódou F-AAS.

Všetky uvedené experimenty boli realizované v troch opakovaniach.

Výsledky a diskusia

Je všeobecne známe, že počas rastu vláknitej huby *A. niger* dochádza k okysľovaniu živného média produkciou kyslých metabolitov, a to najmä organických kyselín [6]. Druh *A. niger* je schopný lúhovať z tuhých fáz účinkom organických kyselín (kyseliny šťaveľovej, kyseliny glukónovej a kyseliny citrónovej) okrem hliníka aj meď, cín, nikel a olovo [7].

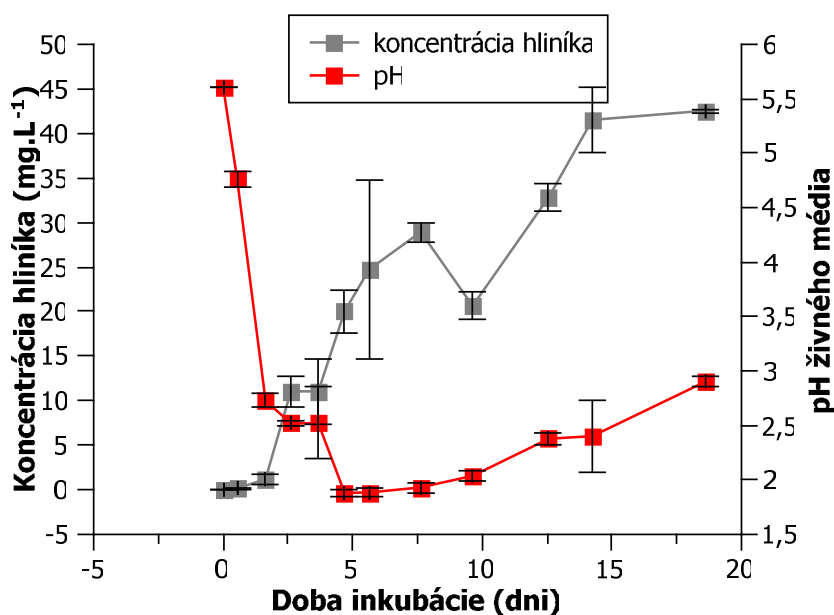


Obr. 1 Porovnanie vplyvu pH (HCl) a metabolitov *A. niger* na lúhovanie hliníka z jeho oxidov do živného média

Hliník je silne hydrolyzujúci kov a je relatívne nerozpustný v neutrálnej oblasti pH (v rozsahu 6 až 8). V kyslom (pH < 6,0) alebo alkalickom (pH > 8,0) prostredí, prípadne v prítomnosti komplexných ligandov, sa rozpustnosť hliníka zvyšuje, čo ovplyvňuje aj jeho biopristupnosť pre organizmy. Účinkom anorganickej kyseliny HCl množstvo lúhovaného hliníka s poklesom pH rastie a to až na hodnotu 0,8 mg pri pH 2 (obr. 1). Aktivita metabolitov *A. niger*

produkovaných počas statickej kultivácie však lúhovala viac než dvojnásobné množstvo hliníka do rozpustnej formy (1,8 mg), pričom pH živného média bolo po 19. dňoch 2,9. Naše výsledky preto naznačujú, že metabolity mikroskopickej vláknitej huby *A. niger* významnou mierou podporujú uvoľňovanie hliníka z jeho tuhej fázy do roztoku a aktivita H^+ iónov v roztoku (acidolýza) je pravdepodobne len čiastkovým mechanizmom ovplyvňujúcim biolúhovanie hliníka, na ktorom sa prednostne zúčastňujú aj iné mechanizmy, napr. komplexolýza [8].

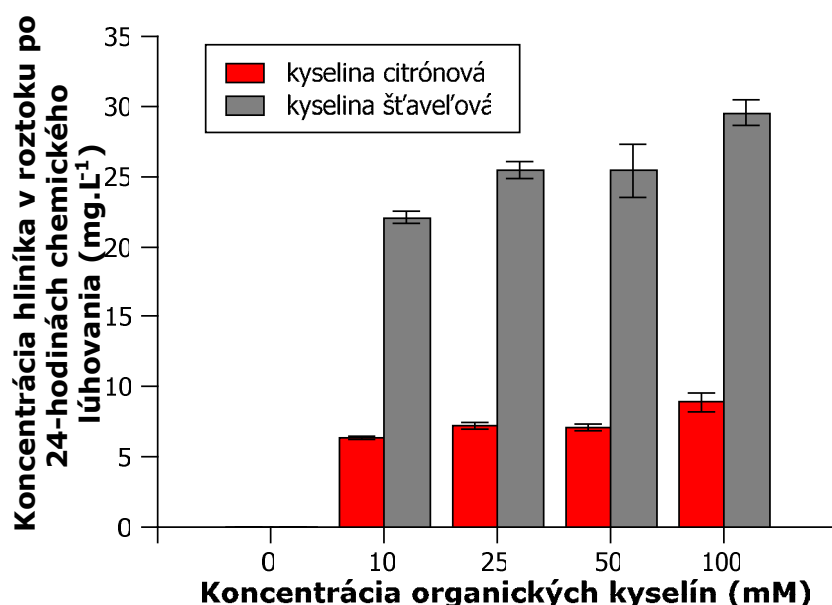
Hodnota pH živného média sa však počas statickej kultivácie mení (obr. 2). Po 5 dňoch pH výrazne kleslo až na hodnotu 1,9, ktorá v nasledujúcich dňoch mierne stúpa až na hodnotu 2,9. Pozorovaný trend nárastu pH ku koncu experimentu môže byť spôsobený metabolizáciou kyslých metabolitov *A. niger* [9]. Ak by sme predpokladali, že hlavným mechanizmom lúhovania hliníka je acidolýza, očakávali by sme po 5 dňoch kultivácie len minimálne zmeny v obsahoch rozpustného hliníka v roztoku živného média. Koncentrácia rozpusteného hliníka v živnom médiu však naďalej stúpala, až na hodnotu $42,6 \text{ mg.L}^{-1}$ v 19. deň kultivácie.



Obr. 2 Zmeny pH a koncentrácie hliníka v živnom médiu počas 19-dňovej inkubácie mikroskopickej vláknitej huby *A. niger* v podmienkach statickej kultivácie pri 25°C .

Ďalším z mechanizmov heterotrofného lúhovania je komplexolýza, ktorá je v prípade mikroskopickej vláknitej huby pravdepodobne zabezpečená prítomnými organickými kyselinami, najmä kyseliny citrónovej, ktorých koncentrácie v živných médiách môžu byť v rozsahoch 40 až 230 mM [7]. Počas 24-hod chemického lúhovania Al_2O_3 kyselinou

citrónovou a šťaveľovou (10 až 100 mM) sa v našich experimentoch uvoľnilo do roztoku takmer trojnásobne vyššie množstvo hliníka účinkom kyseliny šťaveľovej. Zaujímavé je však, že koncentrácia kyselín nemala na množstvo lúhovaného hliníka signifikantný vplyv. Toto je v rozpore s obr. 2, v ktorom predpokladáme zvyšujúci sa obsah organických kyselín ako hlavný mechanizmus v zmenách obsahov rozpustného hliníka v roztoku. To môže pravdepodobne nepriamo poukazovať na fakt, že sa na lúhovaní hliníka podieľa aj iný, zatiaľ bližšie neidentifikovaný mechanizmus, ktorý je však podmienený metabolickou aktivitou mikroskopickej huby.



Obr. 3 Chemické lúhovanie hliníka z oxidov hliníka účinkom organických kyselín citrónovej a šťaveľovej

Záver

Chemické lúhovanie hliníka z Al_2O_3 organickými a anorganickými kyselinami, ktorých koncentrácie zodpovedajú teoretickým a experimentálnym podmienkam kultivácie mikroskopickej vláknitej huby *A. niger*, nie je natoľko účinné ako priame pôsobenie metabolitov mikroskopickej vláknitej huby *A. niger*. Výsledky zároveň naznačujú, že okrem acidolýzy a komplexolýzy (organickými kyselinami) sa na lúhovaní zúčastňuje aj iný, bližšie neurčený mechanizmus heterotrofného lúhovania.

Pod'akovanie

Práca bola podporená projektom cez Agentúru na podporu vedy a techniky v rámci zmluvy č. APVT-20-010204 a LPP-0038-06 a projektom cez Vedeckú Grantovú agentúru Ministerstva

školsťva Slovenskej republiky a Slovenskú akadémiu vied v rámci zmluvy č. VEGA 1/0860/11.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Jiang at al. (2008), *Tree Physiol.* Dec, 28(12), p. 1863
- [2] Solfrizzi et al. (2006), *J Alzheimers Dis.*, 10(2-3), p. 303
- [3] Fomina, M., Hillier, S., Charnock, M., at al., (2005) *Appl. Environ. Microbiol.* (71),p. 371.
- [4] Brandl et al. (1997), *Re-Integration*, Geneva, vol. IV, pp. 16–20
- [5] Gadd, G. M. (2007) *Mycological Research* (111), p. 3
- [6] Brandl, H., Bosshard, R., Wegmann, M.(2001) *Hydrometallurgy.* (59), p. 319
- [7]. Santhiya, D., Ting, Y.P.(2005). *J. Biotechnol.* (116), p. 171
- [8]. Ruijter GJ, van de Vondervoort PJ, Visser J.(1999) *Microbiology.* (145), p. 2569
- [9]. Amiri, et al. (2012), *Biochem. Eng. J.*, (67), p. 208

Výskyt liečivých rastlín v Bábskom lese

Ivana Pilková

*Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Fakulta prírodných vied, Katedra ekológie
a environmentalistiky, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra, Slovenská republika;
ivana.pilkova@ukf.sk*

Abstrakt

The contribution is focused on the evaluation and comparison of occurrence of medicinal plants on clearcuts and in the forest vegetation of the Báb forest. We have recorded 39 medicinal plants, 37 on clearcuts and 21 in the forest vegetation. There were 19 common taxons recorded, only on clearcuts there were 18 taxons recorded and only in the forest vegetation 2 taxons. The highest frequency of occurrence achieved *Hedera helix* and *Mercurialis perennis*. From the medicinal plants the most frequent is the category no 1 (clearcuts – 20, forest vegetation – 12 species). Between the permanent plots on clearcuts and in the forest vegetation there is a significant difference in the occurrence of medicinal plants.

Kľúčové slová: *Bábsky les; rúbaniska; lesný porast; officinálnosť; liečivé rastliny*

Úvod a formulácia cieľa

Bábsky les predstavuje zvyšok pôvodných lesných komplexov, ktoré boli v procese rozvoja poľnohospodárstva v Podunajskej nížine postupne premenené na polia. Predstavuje klimaxové štádium sukcesie lesa na sprašiach [1]. Zaujímavé územie Bábsky les sa nachádza v katastri obce Veľký Báb, územie leží na Nitrianskej sprašovej pahorkatine.

V dôsledku ťažby dreva vznikli v novembri 2006 štyri rúbaniská, ktoré vytvorili vhodné podmienky pre šírenie svetlomilných liečivých rastlín. Liečive rastliny sú tie druhy rastlín, ktoré sa môžu priamo alebo nepriamo používať v humánnej a veterinárnej medicíne, tiež ako suroviny pre farmaceutický priemysel alebo iné odvetvia priemyslu [2].

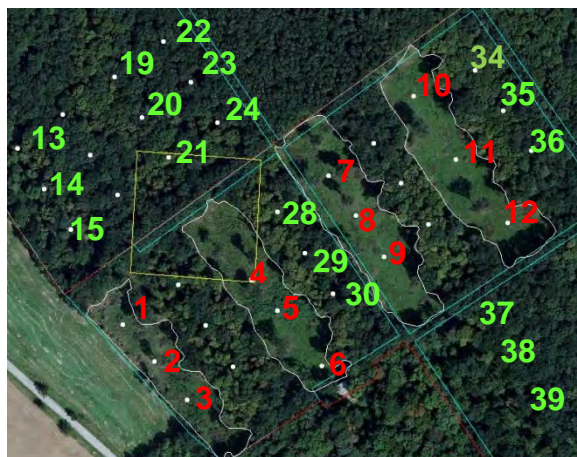
Cieľom príspevku je vyhodnotenie a porovnanie výskytu liečivých rastlín rôznych trvalých plôch (TP) ~ TP rúbanísk a TP lesného porastu.

Materiál a metódy

V študovanom území Bábskeho lesa bolo vymeraných a trvalo označených 30 plôch o veľkosti 20 x 20 m (Obr. 1). Trvalé plochy sú založené len v plošinovej časti Bábskeho lesa. Dané trvalé plochy (TP) sú rozdelené na 2 skupiny.

Prvú skupinu tvorí 12 plôch (č. 1-12) nachádzajúcich sa na štyroch rúbaniskách. Na rúbaniskách sú vysadené sadenice *Quercus robur* a *Quercus petraea* agg., ktoré sú pravidelne ošetrované. Na každom rúbanisku sú 3 plochy umiestnené v líniovom transekte.

Druhú skupinu tvorí 18 plôch založených v lesnom poraste - TP č. 13, 14, 15, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 28, 29, 30, 34, 35, 36, 37, 38 a 39. Deväť TP (č. 13, 14, 15, 19, 20, 21, 22, 23 a 24) sa nachádza v Národnej prírodnej rezervácii Bábsky les. Ostatných 9 lesných plôch sa nachádza v lesných porastoch, kde sa v budúcom období predpokladá ťažba dreva. Tieto trvalé plochy sú usporiadané do transektov, kde každý transekt obsahuje tri plochy.



Obr. 1 Zaujímavé územie s vyznačenými TP na rúbaniskách (červená farba) a v lesnom poraste (zelená farba)

Fytocenologické zápisy boli robené na jar a v lete 2012 a zo zápisov boli následne určené liečivé rastliny podľa práce [3]. Zápisy boli zhotovené štandardnými fytocenologickými metódami [4], pričom bola použitá 9-členná ordinálna stupnica [5]:

- | | |
|---|-----------------------------------|
| 1 - 1 alebo 2 jedince, | 6 – pokryvnosť od 12,5 – do 25 %, |
| 2 - viac jedincov, pokryvnosť menej ako 1 %, | 7 - pokryvnosť od 25- do 50 %, |
| 3 - pokryvnosť od 1- do 5 % pri malom počte jedincov, | 8 – pokryvnosť od 50 – do 75 %, |
| 4 - pokryvnosť od 1- do 5 %, veľa jedincov, | 9 – pokryvnosť viac ako 75 %. |
| 5 – pokryvnosť od 5- do 12,5 %, | |

Zozbierané dáta boli následne vložené do databázy Turboveg [6], z ktorej boli prevedené do programu JUICE 7.0 [7], pomocou ktorého sa vypočítala frekvencia výskytu (%) a rozpätie abundancií liečivých rastlín. Názvoslovie taxónov je jednotne upravené podľa [8].

Výsledky a diskusia

Na území Bábskeho lesa bolo zdokumentovaných celkovo 39 liečivých rastlín (11 drevín, 28 bylín). Na TP na rúbaniskách 37 a v lesnom poraste 21 liečivých rastlín (Tab. 1). Medzi spoločné druhy (19) patria: *Convallaria majalis*, *Cornus mas*, *Crataegus laevigata*, *Euonymus europaeus*, *Euonymus verrucosus*, *Galium aparine*, *Galium odoratum*, *Geum urbanum*, *Hedera helix*, *Impatiens parviflora*, *Lamium maculatum*, *Mercurialis perennis*,

Polygonatum multiflorum, *Pulmonaria officinalis*, *Sambucus nigra*, *Securigera varia*, *Ulmus minor*, *Urtica dioica*, *Viola odorata*.

Iba na rúbaniskách boli zaznamenané liečivé taxóny (18) *Achillea millefolium*, *Ajuga reptans*, *Alliaria petiolata*, *Arctium lappa*, *Arctium tomentosum*, *Artemisia vulgaris*, *Astragalus glycyphyllos*, *Ballota nigra*, *Galeopsis tetrahit*, *Geranium robertianum*, *Hypericum perforatum*, *Linaria vulgaris*, *Robinia pseudoacacia*, *Rosa canina*, *Solanum dulcamara*, *Tithymalus cyparissias*, *Verbascum chaixii subsp. austriacum*, *Veronica chamaedrys*. Len v lesnom poraste boli zaznamenané 2 taxóny: *Vinca minor*, *Crataegus monogyna*.

Najväčšiu frekvenciu výskytu dosiahli (93%) *Hedera helix* a *Mercurialis perennis*. Ďalej nasledovali *Pulmonaria officinalis* (88%), *Galium odoratum* (85%) a *Polygonatum multiflorum* (78%). Na všetkých TP na rúbaniskách sa vyskytovali druhy: *Galium odoratum*, *Geum urbanum*, *Hedera helix*, *Lamium maculatum*, *Pulmonaria officinalis*. V lesnom poraste sa na všetkých TP vyskytovali liečivé taxóny: v krovinnom poschodí *Cornus mas* a v bylinnom poschodí *Galium odoratum*, *Hedera helix*, *Mercurialis perennis*, *Pulmonaria officinalis* (Tab. 1).

Tab. 1 Výskyt liečivých rastlín v rúbaniskovom/lesnom biotope, frekvencia výskytu (%) a rozpätie abundancií

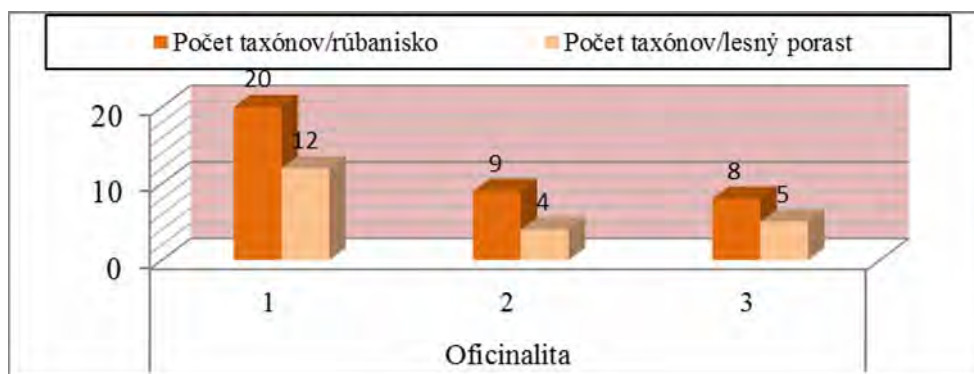
	Počet lokalít R/L	Frekvencia výskytu (%), rozpätie abundancií
Stromové poschodie - E ₃ (od výšky 3 m)		
<i>Cornus mas</i>	0/3	12 ²⁻⁸
<i>Hedera helix</i>	0/9	30 ¹⁻⁴
<i>Robinia pseudoacacia</i>	5/0	12 ¹⁻⁸
<i>Ulmus minor</i>	0/1	2 ¹
Krovinné poschodie - E ₂ (do výšky 3 m)		
<i>Cornus mas</i>	2/18	63 ¹⁻⁸
<i>Crataegus laevigata</i>	3/5	17 ¹⁻⁸
<i>Crataegus monogyna</i>	0/3	10 ¹⁻⁸
<i>Euonymus europaeus</i>	1/2	10 ⁴⁻⁸
<i>Robinia pseudoacacia</i>	5/0	17 ¹⁻⁸
<i>Sambucus nigra</i>	4/0	12 ²⁻⁸
<i>Ulmus minor</i>	1/5	20 ¹⁻⁸
Bylinné poschodie - E ₁ (do výšky 1 m)		
<i>Achillea millefolium</i>	1/0	3 ¹
<i>Ajuga reptans</i>	11/0	25 ¹⁻⁸
<i>Alliaria petiolata</i>	1/0	2 ⁴
<i>Arctium lappa</i>	6/0	12 ¹⁻²
<i>Arctium tomentosum</i>	9/0	27 ¹⁻⁸
<i>Artemisia vulgaris</i>	2/0	5 ¹⁻⁸
<i>Astragalus glycyphyllos</i>	9/0	15 ¹⁻⁸
<i>Ballota nigra</i>	7/0	2 ¹
<i>Convallaria majalis</i>	1/3	8 ¹⁻⁴
<i>Cornus mas</i>	8/9	53 ¹⁻⁴
<i>Crataegus laevigata</i>	3/5	27 ¹⁻³
<i>Crataegus monogyna</i>	0/8	25 ¹⁻⁴

<i>Euonymus europaeus</i>	8/13	62 ¹⁻⁸
<i>Euonymus verrucosus</i>	6/12	60 ¹⁻⁸
<i>Galeopsis tetrahit</i>	5/0	8 ¹⁻²
<i>Galium aparine</i>	11/3	35 ¹⁻⁸
<i>Galium odoratum</i>	12/18	85 ¹⁻⁸
<i>Geranium robertianum</i>	3/0	5 ¹⁻²
<i>Geum urbanum</i>	12/14	68 ¹⁻⁸
<i>Hedera helix</i>	12/18	93 ¹⁻⁸
<i>Hypericum perforatum</i>	4/0	8 ¹⁻⁴
<i>Impatiens parviflora</i>	11/8	33 ¹⁻⁸
<i>Lamium maculatum</i>	12/15	50 ¹⁻⁸
<i>Linaria vulgaris</i>	1/0	2 ²
<i>Mercurialis perennis</i>	11/18	93 ¹⁻⁸
<i>Polygonatum multiflorum</i>	9/16	78 ¹⁻⁴
<i>Pulmonaria officinalis</i>	12/18	88 ¹⁻⁸
<i>Robinia pseudoacacia</i>	5/0	13 ²⁻⁸
<i>Rosa canina</i>	8/0	28 ¹⁻⁴
<i>Sambucus nigra</i>	6/2	27 ¹⁻⁴
<i>Securigera varia</i>	6/3	15 ¹⁻²
<i>Solanum dulcamara</i>	3/0	5 ²⁻⁴
<i>Tithymalus cyparissias</i>	11/0	37 ¹⁻⁸
<i>Ulmus minor</i>	2/3	20 ¹⁻⁸
<i>Urtica dioica</i>	5/1	18 ¹⁻⁸
<i>Verbascum chaixii subsp. austriacum</i>	3/0	10 ¹⁻³
<i>Veronica chamaedrys</i>	3/0	7 ¹⁻²
<i>Vinca minor</i>	0/2	7 ³⁻⁸
<i>Viola odorata</i>	10/11	47 ¹⁻⁴

Obr. 2 znázorňuje kategórie liečivých rastlín. Na TP na rúbaniskách do kategórie 1 patrí 20 (*Ajuga reptans*, *Arctium tomentosum*, *Astragalus glycyphyllos*, *Cornus mas*, *Euonymus europaeus*, *Euonymus verrucosus*, *Galeopsis tetrahit*, *Galium aparine*, *Hedera helix*, *Impatiens parviflora*, *Lamium maculatum*, *Mercurialis perennis*, *Polygonatum multiflorum*, *Securigera varia*, *Solanum dulcamara*, *Tithymalus cyparissias*, *Ulmus minor*, *Verbascum chaixii subsp. austriacum*, *Veronica chamaedrys*, *Viola odorata*), do 2. kategórie patrí 9 liečivých taxónov (*Alliaria petiolata*, *Artemisia vulgaris*, *Ballota nigra*, *Convallaria majalis*, *Galium odoratum*, *Geranium robertianum*, *Geum urbanum*, *Linaria vulgaris*, *Robinia pseudoacacia*). Kategória 3 je zastúpená 8 taxónmi: *Achillea millefolium*, *Arctium lappa*, *Crataegus laevigata*, *Hypericum perforatum*, *Pulmonaria officinalis*, *Rosa canina*, *Sambucus nigra*, *Urtica dioica*.

V lesnom poraste do kategórie 1 patrí 12 liečivých druhov (*Cornus mas*, *Euonymus europaeus*, *Euonymus verrucosus*, *Galium aparine*, *Hedera helix*, *Impatiens parviflora*, *Lamium maculatum*, *Mercurialis perennis*, *Polygonatum multiflorum*, *Securigera varia*, *Ulmus minor*, *Viola odorata*), kategória 2 je zastúpená 4 druhmi (*Convallaria majalis*, *Galium odoratum*, *Geum urbanum*, *Vinca minor*) a kategória 3 obsahuje 5 taxónov

(*Crataegus laevigata*, *Crataegus monogyna*, *Pulmonaria officinalis*, *Sambucus nigra*, *Urtica dioica*).



Obr. 2 Počet druhov liečivých rastlín v lesnom a rúbaniskovom biotope Bábskeho lesa podľa kategórií liečivosti .

Vysvetlivky: 1- liečivé rastliny u nás užívané v homeopatickej, prírodnej a ľudovej medicíne, 2- v SR uznané a normované drogy, 3- oficiálne podľa liekopisu

Najpestrejšia zásoba liečivých rastlín býva v ruderálnych, lúčnych, pasienkových, burinových spoločenstvách a v mezofilných listnatých lesoch nižších a stredných polôh. Viac sa ich nachádza na rúbaniskách, po okrajoch lesov a v krovinách [3]. Túto skutočnosť som potvrdila aj v Bábskom lese. V oboch skupinách TP (rúbaniská, lesný porast) síce dosahovali najväčšiu frekvenciu výskytu a taktiež sa nachádzali na všetkých, príp. vo väčšine TP typické lesné dreviny - *Cornus mas*, *Euonymus europaeus*, *Euonymus verrucosus*, *Hedera helix* a lesné byliny - *Galium odoratum*, *Geum urbanum*, *Mercurialis perennis*, *Polygonatum multiflorum*, *Pulmonaria officinalis*. Druhy *Galium odoratum* a *Convallaria majalis*, ktoré sa vyskytujú v oboch skupinách TP, na rúbaniskách rástli hlavne na zatienených miestach pod krovinami a väčšími bylinami. Tieto byliny ako tieňomilné liečivé rastliny spomínajú vo svojej práci taktiež [9].

Avšak na rúbaniskách bolo zaznamenaných oveľa viac druhov liečivých rastlín ako v lesnom poraste. Väčšina liečivých rastlín uprednostňuje miesta so strednými stanovištnými podmienkami, s dostatkom svetla, tepla, vlhkosti a živín, pričom sa vyhýbajú extrémnym podmienkam [3]. Tieto podmienky poskytujú rúbaniská Bábskeho lesa. Na TP na rúbaniskách k lesným drevinám a bylinám pristupujú svetlomilné ruderálne, synantropné a rúbaniskové dreviny a byliny. Sú to najmä: *Achillea millefolium*, *Arctium lappa*, *Arctium tomentosum*, *Artemisia vulgaris*, *Astragalus glycyphyllos*, *Ballota nigra*, *Galeopsis tetrahit*, *Linaria vulgaris*, *Rosa canina*, *Solanum dulcamara*, *Tithymalus cyparissias*, *Verbascum chaixii* subsp. *austriacum*, *Veronica chamaedrys*. Taktiež sú tu rozšírené invázne liečivé rastliny, ako drevina *Robinia pseudoacacia*, a až na 11 TP na rúbaniskách bylina *Impatiens parviflora*. Na základe vyššie uvedených skutočností môžeme konštatovať, že síce najrozšírenejšie sú

typické lesné dreviny a byliny. Avšak viac druhov liečivých rastlín, väčšia biodiverzita liečivých taxónov je na rúbaniskách.

Záver

V záujmovom území Bábskeho lesa bolo zdokumentovaných 39 liečivých rastlín, na rúbaniskách 37 a v lesnom poraste 21. Medzi trvalými plochami na rúbaniskách a v lesnom poraste je viditeľný značný rozdiel vo výskyte liečivých rastlín. Viac liečivých taxónov sa nachádza na rúbaniskách, ktoré sú tvorené jednak typickými lesnými rastlinami a na druhej strane k nim pristupujú svetlomilné ruderalne, synantropné a rastliny rúbanísk. Na trvalých plochách v lesnom poraste sú hlavne zastúpené lesné dreviny a byliny. V menšej miere sa tu vyskytujú aj rastliny typické pre miesta narušené človekom a pre rúbaniská, ako *Galium aparine*, *Lamium maculatum*, *Sambucus nigra*, *Viola odorata*, *Urtica dioica*, *Securigera varia*, taktiež je tu rozšírená aj invázna liečivá bylina *Impatiens parviflora*.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Eliáš, P. (2010) Zostava nepôvodných druhov rastlín v blízkosti výskumnej plochy v Bábe, Juhozápadné Slovensko. In Rosalia (Nitra), 21, p. 57
- [2] Černý, I., Molnárová, J., Pačuta, V. (2009) Rastlinná výroba. SPU Nitra, p 35
- [3] Jurko, A. (1990) Ekologické a socio ekonomické hodnotenie vegetácie. Bratislava, Príroda, p. 172
- [4] Moravec, J. a kol. (1994) Fytocenologie. Academia, Praha, p. 63
- [5] Westhoff, W., Van den Maarel, E. (1978) The Braun-Blanquet approach. In: R.H. Whittaker (ed.), Classification of Plant Communities. Dr. W. Junk, The Hague, p. 287
- [6] Hennekens, S. M., Schaminee, J. H. J. (2001) TURBOVEG: Comprehensive Data Base Management System for Vegetation Data. J. Veg. Sci. 12, p. 589
- [7] Tichý, L. (2002) JUICE, software for vegetation classification. In Journal of Vegetation Science, 13, p. 451
- [8] Zoznam nižších a vyšších rastlín Slovenska, Marhold, K., Hindák, F. (eds.) [Citované 8. január 2013] ~<http://ibot.sav.sk/checklist/>
- [9] Habán, M. - Otepka, P. - Vaverková, Š. (2009) Liečivé rastliny. Nitra, SPU, p. 34

Miera ohrozenia historických krajinných štruktúr v dôsledku sukcesie – modelové územie k.ú. mesta Čadca

Zuzana Pšenáková

*Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra krajinskej ekológie,
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; zuzanoocka@gmail.com*

Abstract

Many times historic landscape structures are the one of characteristic features of the landscape creating an unique local identity. In the cadastral area of Čadca it is possible to found this type of historic structures: dispersed settlements, traditional small-scale agriculture structures as small terrace fields and grassland. Nowadays there is a problem with the absence of an utilisation of some fields that have an impact on a current landscape structure. In the landscape there are seemed the elements of secondary succession that could be mentioned as an important transformation of current landscape structure and vanishing of some valuable historic landscape structures. This paper deals with the rate of a succession of the abandoned small terrace fields and grassland near intravilan and dispersed settlements (the elements of historic landscape structures) in the cadastral area of Čadca .

KLúčové slová: *historické krajinné štruktúry; Čadca; sukcesia; súčasná krajinná štruktúra*

Úvod a formulácia cieľa

Súčasná krajina a jej štruktúra je výsledkom postupných zmien pôvodnej prírodnej krajiny vplyvom človeka [1]. Za veľmi cenné prvky súčasnej krajinskej štruktúry z hľadiska charakteristického vzhľadu krajiny a krajinného obrazu sú považované historické krajinné štruktúry (HKŠ), ktoré vznikli ľudskou činnosťou v priebehu minulých období a v súčasnosti sa v krajine nachádzajú zväčša len vo fragmentoch.

Medzi významné HKŠ tvoriace charakteristické črty krajiny, ktoré sa nachádzajú v katastrálnom území mesta Čadca, patrí roztrúsený typ osídlenia (tzv. pl'ace) a s ním súvisiaci maloplošný spôsob hospodárenia – terasovité políčka a trvalé trávne porasty (TTP), v minulosti slúžiace ako pasienky. Na základe predchádzajúcich výskumov [2] možno tieto HKŠ datovať už do obdobia konca 18. storočia, pričom súčasnú lokalizáciu centier jednotlivých pl'acov je možné dokázať na základe máp II. vojenského mapovania z polovice 19. storočia.

Zachovanie vyššie spomínaných HKŠ na modelovom území, a to nie len samotných sídelných jednotiek s dochovanými cennými prvkami ľudovej architektúry, ale aj ich prepojenia s pôvodnou lesnou krajinou, ktoré tvoria typické terasovité políčka a TTP, je explicitne spojený s využívaním a obhospodarovaním, v opačnom prípade nastáva proces sekundárnej sukcesie, kedy sa kultúrna krajina postupne mení na pôvodnú prírodnú krajinu,

čo v tomto konkrétnom prípade znamená lesnú krajinu.

Cieľom tohto príspevku je určiť mieru sukcesie v riešenom území na základe plošných parametrov, štádia vývoja a jej pomerového zastúpenia k ostatným prvkom druhotnej krajinej štruktúry (DKŠ), hlavne TTP, maloplošnému poľnohospodárstvu a lokalizácia v blízkosti roztrúseného typu osídlenia, pričom tieto prvky sú na modelovom území chápané ako HKŠ

Materiál a metódy

Riešeným územím je k. ú mesta Čadca. Analýzy vznikli na základe nasledujúcich mapových podkladov:

- ortofotografické snímky GEODIS Čadca 0_0 – 9_9 z roku 2007
- ÚP mesta Čadca 1: 10 000. z roku 2007

Na základe terénneho prieskumu uskutočneného v júli 2011 zameraného na mapovanie druhotnej krajinej štruktúry, resp. porovnanie skutočného stavu krajinných prvkov s ortofotografickými snímkami a vyššie uvedených podkladových máp sa vytvorili dátové vrstvy vhodné pre spracovanie v GIS programoch. Tie sa následne editovali v prostredí ArcMap 9.3, pričom bolo nutné ich georeferencovanie a následná vektorizácia. Pre potreby tejto práce boli určené a zmapované nasledujúce kategórie využitia zeme, resp. prvkov druhotnej krajinej štruktúry (DKŠ): 1. Zastavané územie, 2. Hlavné dopravné komunikácie, 3. Vodná plocha, 4. Les, 5. Trvalý trávny porast (TTP), 6. Nelesná drevinová vegetácia (NDV), 7. Maloplošné poľnohospodárstvo, 8. Iné plochy (kameňolom, cintorín,...). Následne bola vypracovaná mapa sukcesie, pričom boli klasifikované jednotlivé štádia sukcesie podľa nižšie uvedenej metodiky. Plochy, na ktorých prebiehala sukcesia boli v mape druhotnej krajinej štruktúry klasifikované prevažne ako NDV.

Jednotlivé vývinové fázy sukcesie boli vybrané podľa kategorizácie excerptovanej z diel [3] a [4] nasledujúco:

1. Sukcesné štádium - *etapa prenikania* ($S = 1$) – po absencii obhospodarovania hodnotenej lokality sa na tejto začína disperzia synantropných bylín a drevín z okolitého prostredia
2. Sukcesné štádium - *etapa nasycovania* ($S = 2$) – nastáva prísun drevín z okolitého prostredia,
3. Sukcesné štádium - *etapa zahusťovania* ($S = 3$) – nastáva disperzia sukcesných drevín vo vnútornom prostredí hodnotenej lokality,

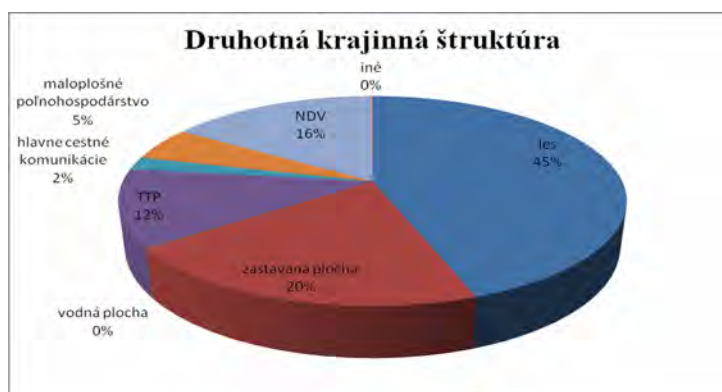
4. Sukcesne štádium - *etapa transformácie* ($S = 4$) – dochádza k premene sukcesného spoločenstva na spoločenstvo seminaturálne, kde narastá podiel klimaxových drevín,
5. Sukcesné štádium - *etapa naturalizácie* ($S = 5$) – vplyvom rastúceho zastúpenia klimaxových drevín dochádza k odumieraniu sukcesných spoločenstiev. Toto štádium však pre potreby tohto príspevku nebolo klasifikované, nakoľko už bolo zaradené do kategórie les [5].

Pre potreby tohto príspevku bol hodnotený len aktuálny stav sukcesie na základe vizuálnej percepcie hustoty drevín a rastlinných druhov (synantropné byliny a dreviny, sukcesné a klimaxové dreviny) na ploche. Z hľadiska porovnávania zmien prvkov DKŠ v rôznych časových obdobiach boli využité závery predchádzajúcich výskumov [2], ktoré skúmali zmenu DKŠ v priebehu I. a II. vojenského mapovania na danom území.

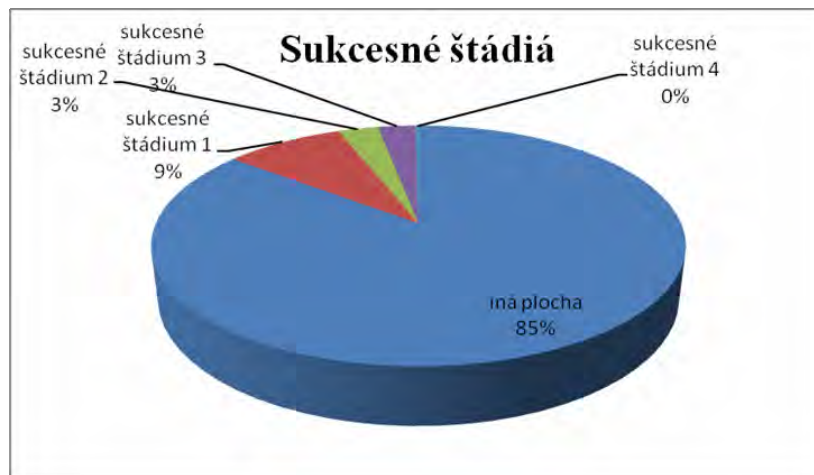
Databázové spracovanie a vytvorenie grafov sa uskutočnilo v programe MS Excel. Na základe plošného zastúpenia jednotlivých prvkov DKŠ a plôch s prebiehajúcou sukcesiou sa vytvorili grafy s pomerovým zastúpením jednotlivých prvkov, ktoré boli následne interpretované v texte, pričom sa autor zamerl hlavne na HKŠ - TTP, maloplošné poľnohospodárstvo a roztrúsený typ osídlenia.

Výsledky a diskusia

Na základe vypracovania mapy druhotnej krajinej štruktúry a spracovaní údajov sa zistilo, že značnú časť modelového územia (45 %) pokrýva les. Druhou najrozľahlejšou krajinnou štruktúrou je zastavané územie (20 %) a hneď po nej nasleduje NDV s 16 % zastúpením. 12 % územia pokrývajú TTP a 5 % územia predstavuje orná pôda – v tomto prípade používaná pre potreby maloplošného poľnohospodárstva. Ostatné prvky DKŠ nedosiahli viac ako 2 % zastúpenie na modelovom území.



Obr. 1 Percentuálne zastúpenie plôch prvkov DKŠ



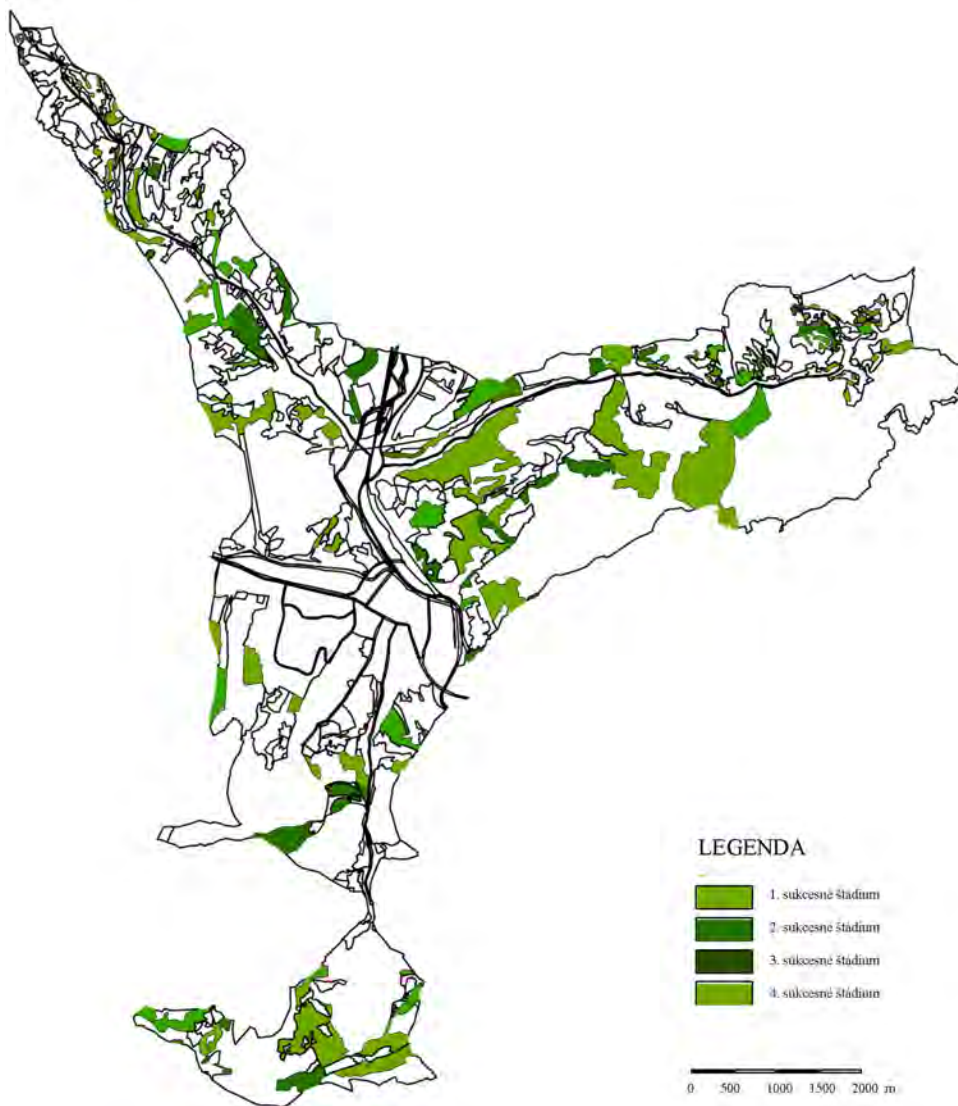
Obr. 2 Percentuálne zastúpenie plôch so sukcesiou (v rôznych štádiách) a plochy, na ktorej sukcesia neprebíha

Alarmujúca je však plocha zasiahnutá sukcesiou – spolu 15 % plochy riešeného územia, čo predstavuje väčšie pomerové zastúpenia ako samotné TTP. Na základe predchádzajúcich výskumov [2] možno tvrdiť, že pomerové zastúpenie TTP a NDV je zatiaľ približne rovnaké ako podľa II. vojenského mapovania v pol. 19. storočia – 30 % územia tak isto ako aj plocha maloplošného poľnohospodárstva – 4 %, no ak je skoro polovica plochy týchto prvkov (15 % celkovej plochy modelového územia) ohrozená sukcesiou, možno konštatovať, že takáto zmena môže mať významný vplyv na charakteristický vzhľad krajiny a stratu značnej časti HKŠ, konkrétne hlavne TTP a terasovitých políčk.

Podľa mapy sukcesie v 4. štádiu sukcesie je menej ako 1 % plochy modelového územia, v 3. a 2. štádiu v každom po 3 % z celkovej plochy a v 1. štádiu je až 9 %, čo sú necelé 2/3 z celkovej plochy zasiahnutej sukcesiou. Z týchto údajov vyplýva, že v prípade včasných a vhodných manažmentových opatrení, je možné úplnej renaturalizácii zabrániť, nakoľko tento proces sukcesie ešte nie je v neskorých fázach vývoja a tým pádom je jednoduchší návrat ku krajinným prvkom, ktoré sa na daných lokalitách nachádzali pred týmto procesom.

Z cieľových ekosystémov je dôležité upozorniť na poľnohospodárske ekosystémy, na ktorých sa nachádzajú kultúrne fytocenózy, ktoré vo väčšine prípadov úplne nahrádzajú prvotné fytocenózy pôvodnej krajiny, teda v genéze osídľovania krajiny rastlinami priamo nadväzujú na jej pôvodný stav [6]. Ich udržateľnosť je vysoko energeticky náročná a preto sú najviac náchylné na procesy sekundárnej sukcesie. V tomto prípade sú to lokality, kde sú sukcesiou zasiahnuté územia, ktoré boli v minulosti ornou pôdou, no v súčasnosti ich vlastníci nejavia o jej ďalšiu utilizáciu záujem. Preto je otázne či je jej transformácia na drevinovú vegetáciu v krajine žiadúca, alebo nie.

Na základe mapy sukcesie možno pozorovať lokalizáciu plôch s prebiehajúcou sukcesiou. Je zrejmé rozmiestnenie na celom modelovom území - v blízkosti roztrúseného typu osídlenia i vo väčšej vzdialenosti od intravilánu. Najväčšia plocha, kde sa nenachádzajú plochy ohrozené sukcesiou je samotné zastavané územie mesta Čadca a samozrejme miesta, kde sa nachádza les.



Obr. 3 Plošné zastúpenie jednotlivých sukcesných fáz na modelovom území

Záver

Sukcesný proces je dôsledok rozširovania sa drevín. Za hlavnú príčinu spôsobujúcu predispozíciu ekosystému na vstup nových druhov drevín, je považovaná zmena obhospodarovania skúmanej lokality, ktorá často súvisí s úplnou absenciou jej utilitarizácie [7]. Túto zákonitosť možno pozorovať aj na modelovom území, kde je sukcesiou ohrozených

15 % plochy celého územia a to hlavne na miestach, kde sa nenachádza samotná zastavaná plocha mesta a les – čiže prevažne sa jedná o prvky TTP, NDV a maloplošné hospodárstvo. Tieto prvky, spolu s roztrúseným typom osídlenia predstavujú HKŠ, ktoré tvoria charakteristický vzhľad krajiny a ich zánik by mal mať významný vplyv.

Z hľadiska reverzibility procesu sukcesie možno konštatovať, že včasnými a vhodnými manažmentovými opatreniami je možné na vybraných lokalitách sukcesiu eliminovať, nakoľko 2/3 z celkovej plochy zasiahnutej sukcesiou predstavuje 1. štádium – štádium prenikania.

Inak hrozí vymiznutie HKŠ z krajiny a tým aj zmena jej výrazných a jedinečných charakteristických črt, ktoré majú esenciálny vplyv na identitu regiónu a nemenej na možný udržateľný rozvoj cestovného ruchu.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Feranec J., Oľahel J. (2001) Krajinná pokrývka Slovenska (Land cover of Slovakia), VEDA, Bratislava, p.124
- [2] Pšenáková Z. (2012) Študentská vedecká konferencia Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského 2012, Zborník recenzovaných príspevkov, Bratislava, p. 1551
- [3] Daniš, D., Modranský, J. (2007) Medzinárodná konferencia pri príležitosti 15. Výročia založenia FEE TU vo Zvolene, Ekológia a environmentalistika 2007, Poníky, p. 166
- [4] Daniš, D. (2007) XI. Konferencia Krajina – Človek - Kultúra, Zborník príspevkov, Banská Bystrica, p. 9
- [5] Daniš, D., Modranský, J. (2007) konferencia V. ekologické dni, Ekologické štúdie VII, Nitra, p. 37
- [6] Petřík, E. (1977) Význam a využitie zelene v tvorbe krajiny. Lesnícke štúdie 26. Príroda, Bratislava, p. 143
- [7] Daniš, D. (2008) Prognózy dynamiky sukcesných procesov a ich vplyv na krajinu PIENAP-U. (dizertačná práca) Fakulta ekológie a environmentalistiky, Technická univerzita vo Zvolene, p. 11.

Hodnotenie vybraných obcí Slovenskej republiky na základe výskytu rakovinových ochorení v spojitosti s obsahmi makroprvkov v pôdach

Simona Škultétyová

Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra geochémie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika; skultetyova@fns.uniba.sk

Abstract

Health status of residents of the Slovak Republic is varied by incidence of carcinogenic diseases. The assessment of relationship between health indicators as deaths rates to malignant neoplasms, premature mortality as potential years of lost due to malignant neoplasms and indirect age standardised mortality to malignant neoplasms of digestive organs and respiratory and intrathoracic organs compare with soil properties through an environmental indicators as macroelements (Ca, Mg, Na, K and Al) and acidity. Municipalities were determined by the high deaths rate to malignant neoplasms and were situated on acid soils with low-lying contents of calcium and magnesium.

KLúčové slová: *zdravotný stav; makroprvok; pôda; rakovinové ochorenie*

Úvod a formulácia cieľa

Zdravotný stav obyvateľstva a jedinca je základným predpokladom pre dobre fungujúcu spoločnosť a jeho nepriaznivý stav môže byť výsledkom nielen úrovne zdravotnej starostlivosti a služieb, výskyt epidémie ale aj od kontaktu a príjmu látok zo životného prostredia. Podľa vyhlásenia WHO je životné prostredie jedným z hlavných faktorov, ktoré vplýva 20% na zdravie jedinca. V práci sme sa zamerali na výber obcí s najhorším zdravotným stavom pre rakovinové ochorenia, ktoré sa determinovali zdravotnými indikátormi a pre distribúciu jednotlivých vybraných látok v pôdach sa použili environmentálne indikátory [1].

Človek prichádza do kontaktu s horninovým prostredím prostredníctvom pôdy, ktorá je nositeľom chemických prvkov z geologického prostredia [2]. Priamym kontaktom alebo stravovaním sa dostávajú do tela chemické prvky, ktoré sa rozčleňujú na stavebné a esenciálne, ktoré organizmus potrebuje pre správny chod všetkých funkcií a toxické, ktoré negatívne vplývajú na zdravie [3].

Ochorenia a zhoršený zdravotný stav obyvateľstva môžu spôsobovať okrem zvýšených obsahov potenciálne toxických prvkov aj prvky – makroprvky, ktoré sa prirodzene vyskytujú v pôdach vo vysokých množstvách a ich distribúcia v rôznych obciach sa javí rôzne v závislosti od horninového podložia. Deficit alebo nadbytok vápnika a horčíka bol sledovaný ako faktor, ktorý vplýva na incidenciu kardiovaskulárnych a karcinogénnych ochorení [4,5].

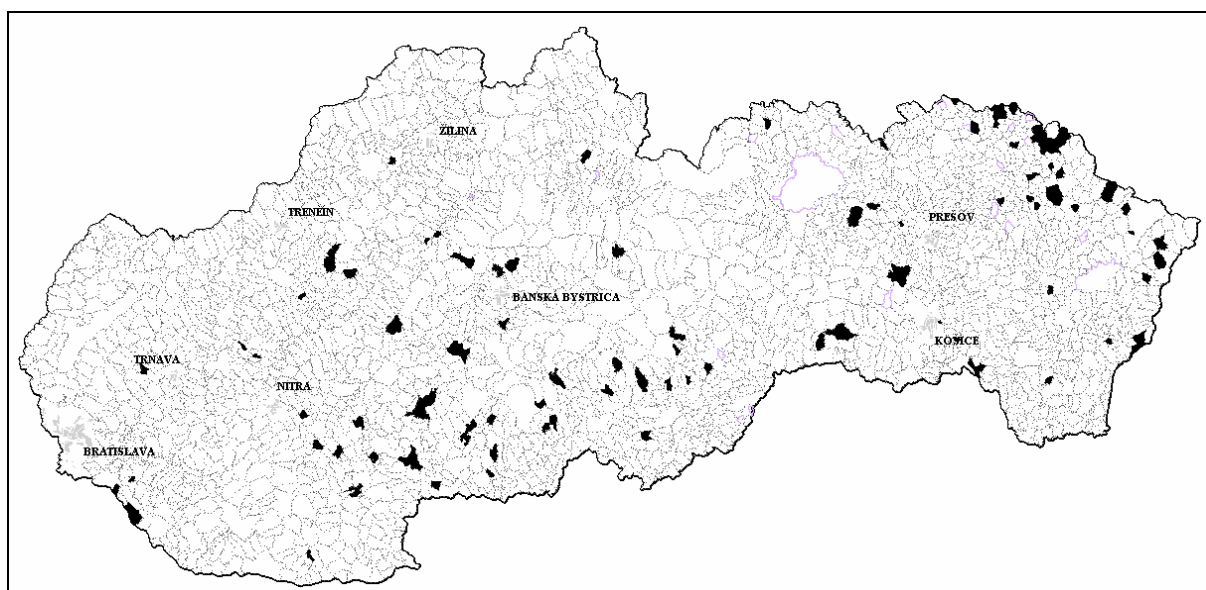
V Anglicku pôdy so zníženým obsahom vápnika a kyslé pôdy sa stali predpokladom extrémnej úmrtnosti na rakovinu žalúdka [6].

Geologické prostredie karbonátov a sedimentárnych hornín sa prejavilo vo vzťahu k ľudskému zdraviu najpriaznivejšie z pohľadu výskytu chemických prvkov [1]. V štúdií sme sledovali celkové obsahy makroprvkov: vápnik, horčík, sodík, draslík a hliník vo vybraných obciach.

Hlavným cieľom práce je zhodnotenie obsahov jednotlivých makroprvkov v pôdach vo vybraných obciach, zhodnotenie jednotlivých zdravotných indikátorov pre rakovinu, najsť závislosti medzi environmentálnymi a zdravotnými indikátormi a predložiť prehľad pôdnych typov vo vybranej skupine obcí.

Materiál a metódy

Slovensko ako celok je veľmi rôznorodé z hľadiska geologickej stavby, pôdnych typov a taktiež aj zdravotný stav obyvateľov je rôzny v rôznych oblastiach. Zamerali sme sa na výber 100 obcí (obr. 1), ktoré sa javia z hľadiska výskytu rakoviny s najhorším zdravotným stavom a to s najvyššou relatívnou úmrtnosťou na zhubné nádory (REC, prepočet úmrtí na 100 000). V týchto obciach sme skúmali nasledujúce zdravotné indikátory: počet rokov z potenciálne strateného života PYLLC (prepočet na 100 000 úmrtí), nepriamo vekovo štandardizovaná úmrtnosť na zhubné nádory tráviacej sústavy SMRC1526 a nepriamo vekovo štandardizovaná úmrtnosť na zhubné nádory dýchacej sústavy SMRC3039.



Obr. 1 Mapa vybraných 100 obcí s najvyššou relatívnou úmrtnosťou na zhubné nádory

Vo vybraných obciach sme použili vybrané makroprvky: Ca, Mg, Na, K a Al ako environmentálne indikátory, ktoré udávajú ich distribúciu v pôdach. Do databázy environmentálnych indikátorov sme zahrnuli aj hodnoty pH vo vode a pH v KCl.

Vybrané environmentálne a zdravotné indikátory sme spracovali vhodnými štatistickými metódami, z ktorých výstupy vo forme tabuliek a grafov boli použité pre interpretáciu výsledkov.

Pomocou pôdnej mapy Slovenska [7] v digitálnej forme sme určili pôdne typy vo vybraných obciach.

Výsledky a diskusia

Z vybraných 100 obcí s najvyššou hodnotou REC sme uviedli v tab.1 jednotlivé hodnoty pre vybrané zdravotné indikátory SMRC1526, SMRC3039 a environmentálne indikátory pre vybrané prvky: vápnik, horčík, sodík, draslík, hliník a kyslosť pôdy (pri H₂O a KCl).

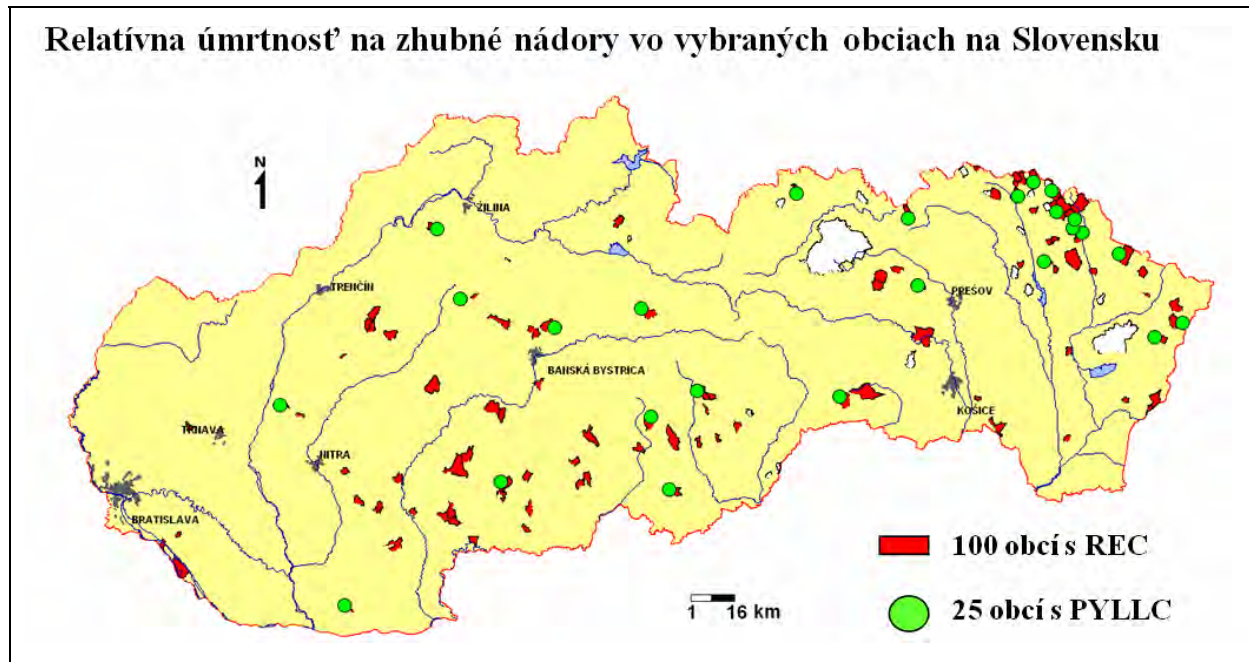
Tab. 1 Základné údaje pre vybrané zdravotné a environmentálne indikátory pre vybraných 100 obcí s najvyššou hodnotou REC

	MED	MIN	MAX	PRIEMER	SD
REC	632,74	544,22	4545,45	796,65	565,77
SMRC1526	173,77	0	513,26	182,50	115,42
SMRC3039	191,74	0	1204,82	226,11	211,10
Ca (%)	0,87	0,23	8,17	1,23	1,29
Mg (%)	0,64	0,38	2,85	0,82	0,45
Na (%)	0,83	0,49	1,48	0,81	0,18
K (%)	1,67	1,17	2,28	1,69	0,21
Al (%)	5,72	4,45	9,09	5,94	0,99
pH (voda)	5,80	4,61	8,04	6,01	0,73
pH (KCl)	5,06	3,76	7,48	5,21	0,81

Zdravotné indikátory SMRC1526 a SMRC3039 predstavujú dobrý stav pri hodnote nižšej ako 100, čo predstavuje len 21 obcí pre SMRC1526 a 23 obcí pre SMRC3039.

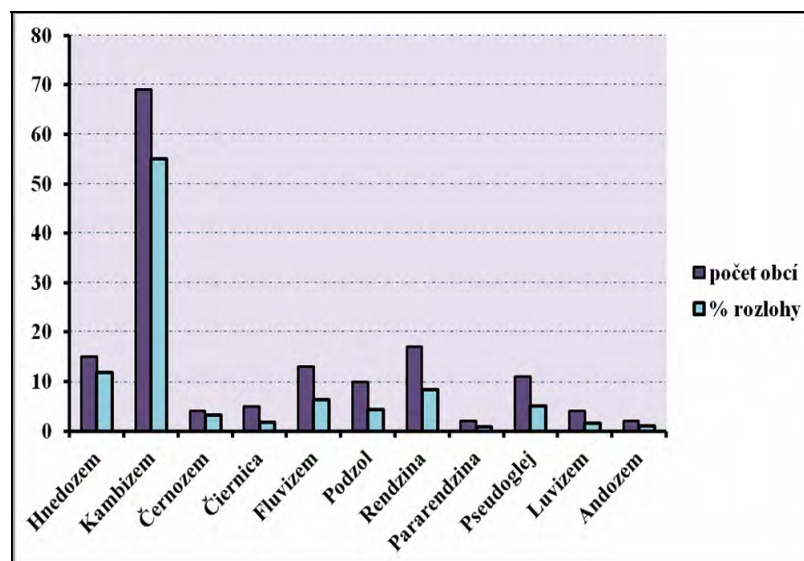
Z vybraných obcí je 25 obcí, kde ľudia z dôvodu úmrtia na nádorové ochorenia zomierajú najmladší (obr. 2).

Environmentálne indikátory predstavujú stav makroprvkov a vlastnosti kyslosti v pôdach. Vo všeobecnosti môžeme povedať, že v týchto obciach prevládajú pôdy s nízkym obsahom vápnika a horčíka, vyšším obsahom draslíka a patria ku kyslejším pôdam. Pôdy vybraných obcí sa vyznačujú zníženým obsahom karbonátov.



Obr. 2 Mapa 25 obcí s najvyššou relatívnou úmrtnosťou na zhubné nádory a najvyšším počtom rokov z potenciálne strateného života

Z výsledkov korelačnej analýzy medzi environmentálnymi a zdravotnými indikátormi sme zistili pozitívnu koreláciu medzi REC a SMRC3039 ($p=0,77$ pri $\alpha<0,001$), kde sme zistili, že so zvyšujúcou relatívnou úmrtnosťou na zhubné nádory sa zvyšuje úmrtnosť na zhubné nádory dýchacej sústavy. Medzi SMRC1526 a pH (voda) bola zistená závislosť, ktorá naznačovala stúpanie úmrtnosti na zhubné nádory tráviacej sústavy s klesaním hodnôt pH (voda), avšak korelácia nebola významná pre nízku hladinu spoľahlivosti pre vybrané obce.



Obr. 3 Graf pôdných typov vo vybraných obciach

Pôdne typy v jednotlivých vybraných obciach sa určovali podľa pôdnej mapy Slovenska. V prípade, že v obciach vystupovali viaceré pôdne typy, ich zastúpenie sa určovalo podľa rozlohy. Na obr. 3 je jednotlivé zastúpenie pôdných typov vzhľadom na výskyt v obciach.

Prevládajúci pôdny typ pre obce s vysokou úmrtnosťou na zhubné nádory je kambizem, ktorá sa vyskytovala v 69 obciach a zastupuje 55,15% z celkovej rozlohy vo vybraných obciach. Ďalej sa vyskytovali rendzina a hnedozem (17 a 15 obcí), avšak ich výskyt v obciach a ich rozloha predstavuje nižšie zastúpenie.

Pri hodnotení vybraných obcí je nutné zdôrazniť aj antropogénny vplyv, ktorému sme sa v štúdiu nezaoberali. Obce, u ktorých je najvyššia úmrtnosť na zhubné nádory v nižšom veku sa nachádzajú v oblasti s banskou činnosťou, so zistenými zvýšenými obsahmi potenciálne toxických prvkov v pôdach z prírodných alebo antropogénnych zdrojov.

Záver

Vybrané obce z hľadiska vysokej relatívnej úmrtnosti na zhubné nádory sa nachádzajú prevažne na juhu a východe Slovenska. Z týchto obcí je 25 obcí, kde ľudia strácajú najviac rokov potenciálne strateného života.

V študovaných obciach je vyššia nepriamo vekovo štandardizovaná úmrtnosť na zhubné nádory dýchacej sústavy v porovnaní s nádormi tráviacej sústavy.

Vplyv makroprvkov v pôde ku zdravotnému stavu v obciach nebol jednoznačne preukázaný, aj keď bola zistená slabá závislosť medzi rastúcou nepriamo vekovo štandardizovanou úmrtnosťou na zhubné nádory tráviacej sústavy a klesajúcim pH pôdy.

Pôdy sledovaných obcí možno vo všeobecnosti pokladať za kyslejšie pôdy s nízkym obsahom karbonátov, nízkymi obsahmi vápnika a horčíka a vyšším obsahom draslíka. Prevládajúcim pôdnym typom bola hlavne kambizem, potom rendzina a hnedozem.

Pod'akovanie

Práca bola podporená projektom LIFE 10 ENV/SK/086.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Rapant S., Letkovičová M., Cvečková V., et al. (2010) Environmentálne a zdravotné indikátory Slovenskej republiky. ŠGÚDŠ, Bratislava, p. 245

- [2] Kabata-Pendias A., Pendias H. (1992) Trace elements in soils and plants. 2nd edition. CRC Press, London, p. 365
- [3] Selinus O., Alloway B. J., Centeno J. A., et al. (2005) Essentials of medical geology. Elsevier Academic Press, p. 793
- [4] Cotruvo J., Bartram J. (2009) Calcium and magnesium in drinking-water. Public health significance. WHO, Spain
- [5] Yang CH. Y., Cheng M. F. Tsai S. S., et al. (1998) Calcium, magnesium and nitrate in drinking water and gastric cancer mortality. Jpn. J. Cancer Res. 89, p. 124-130
- [6] Griffith G. W., Davies Ar. I. (1954) Cancer and soils in the country of Angkezy. Brit. J. Cancer, 8, p. 94-210
- [7] Hraško J., Linkeš V., Šály R., et al. (1993) Pôdna mapa Slovenska (Soil map of Slovakia) 1 : 400 000. Výskumný ústav pôdnej úrodnosti, Bratislava

Vplyv rozvoja mesta Žilina na rieku Váh

Barbora Slabeciusová

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra krajinnej ekológie,
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika, slabeciusova@fns.uniba.sk*

Abstract

The city Žilina was created on the riverside of the River Váh. The meaning of the river to the city was very important in the past. It was source of subsistence, used as transportation channel and had a function in defending of the city. In this work, we have studied how the development of the cities changed the structure of landscape, focusing on the River Váh. Researching of the historical maps, photos and drawings, we were comparing the position of the river Váh to Žilina's city center. We have found out that the development of the city has influenced the river. Relationships that were important a few centuries ago, and often essential to the life and operation of the city, are now deleted or deeply disturbed. Gradually they lose values, which restoration is no longer possible.

Kľúčové slová: mesto Žilina; rieka Váh; urbánny rozvoj; identita krajiny

Úvod a formulácia cieľa

Mesto Žilina patrí medzi slovenské mestá, ktoré vznikli na báze prírodných oporných bodov v krajine [1]. V prípade Žiliny je takýmto bodom rieka Váh. Na jej brehoch sa koncentrovalo obyvateľstvo už v období paleolitu [2], kedy boli vytvorené prvé základy jednoduchého osídlenia, ktoré sa počas vývoja transformovalo na úroveň mesta (pozn. Žilina získala štatút mesta v 14. storočí). Váh plnil pre sídlo dopravnú (sútok Kysuce a Váhu sa nachádzal na jednej z vetiev Jantárovej cesty), hospodársku (mlynárstvo, rybárstvo, splavovanie dreva) a obrannú funkciu.

Keďže rieka bola v minulosti rozhodujúcim faktorom pre založenie sídla, cieľom tejto práce je analyzovať, akú úlohu zohrávala v jeho vývojových etapách, od 13. storočia až po súčasnosť. Výsledkom výskumu je deklarácia vzťahu a miery interakcie mesta a krajinnej štruktúry, v danom prípade zúženej na vodný tok, z pohľadu zachovania identity krajiny a jej unikátnych charakteristík.

Materiál a metódy

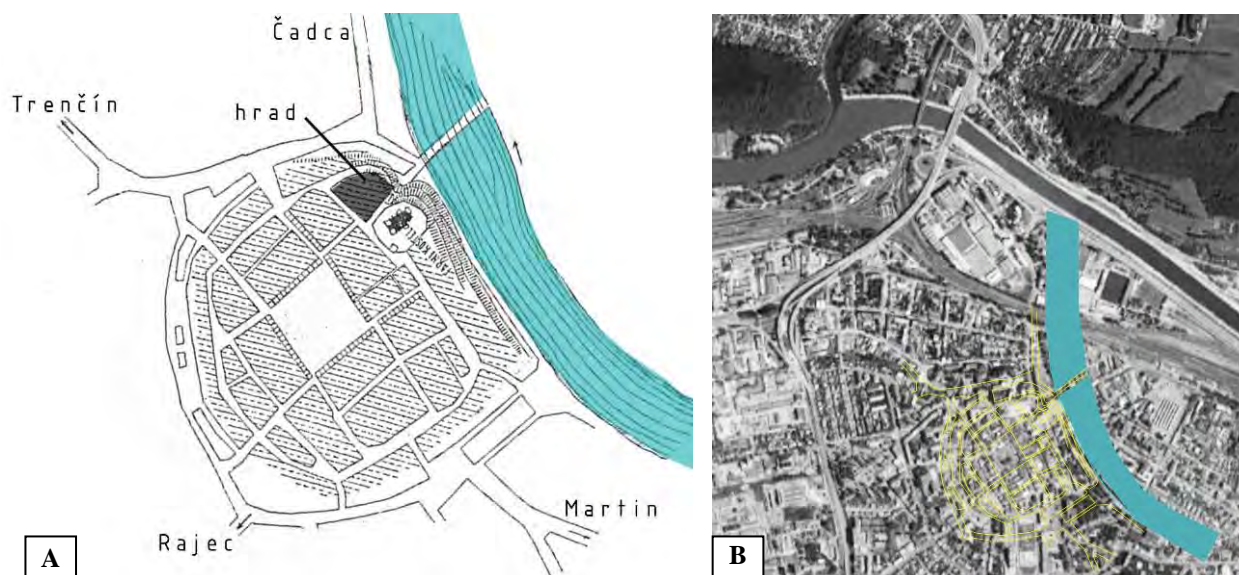
K najvýznamnejším zdrojom zachytávajúcím vývoj hmotného prejavu krajiny v čase patria historické mapy. V mapách je často zaznamenané to, čo môže byť v pamäti krajiny len veľmi ťažko vnímateľné [3]. Preto boli pre výskum hlavným zdrojom informácií historické mapy. Tie boli pomocou grafického softvéru AutoCAD schematicky prekreslené

a porovnávané so súčasným stavom územia zobrazeného na leteckej snímke. Komparatívna analýza máp sa zameriavala najmä na polohu Váhu voči historickému centru mesta (Mariánske námestie), ktoré je dobre viditeľné tak na súčasných, ako aj na najstarších mapách mesta a je viac – menej nemenné.

Okrem máp a tematicky súvisiacej literatúry boli dôkladne preštudované aj historické fotografie, kresby a maľby mesta. V každej etape vývoja sídla boli analyzované základné historické medzníky a faktory, ktoré vplývali na krajinnú štruktúru. Na základe nich bol identifikovaný súvis medzi vývojom sídla a riekou ako krajinným prvkom ovplyvňujúcim územný rozvoj a miera ich vzájomného ovplyvňovania sa. Skúmané vývojové etapy boli pre výskum vytipované na základe dostupnosti podkladov a historických máp.

Výsledky a diskusia

Prvá písomná zmienka o meste Žilina pochádza z roku 1208. Na dnešnom území mesta existovali viaceré osady. Jedna z nich bola situovaná pri kostole Sv. Štefana pri rieke Rajčianka a druhá bola lokalizovaná v priestoroch dnešného Mariánskeho námestia. Táto osada sa v porovnaní so súčasnosťou nachádzala v bezprostrednej blízkosti rieky Váh [4]. Predpokladá sa, že osada bola založená na vyvýšenine, ktorú Váh zo severu obtekal, a tým vytváral jeho prirodzenú severnú, resp. severo-východnú hranicu - **Obr. 1**.



Obr. 1 Poloha Váhu voči centru mesta v 13. storočí (A – podľa Vodrážku [1]) a v súčasnosti (B)

V tomto období vznikali slovanské osady na báze oporných bodov v krajine. Taktická pozícia sídla zahŕňala možnosť získavania obživy a dobrú dostupnosť. Váh okrem týchto

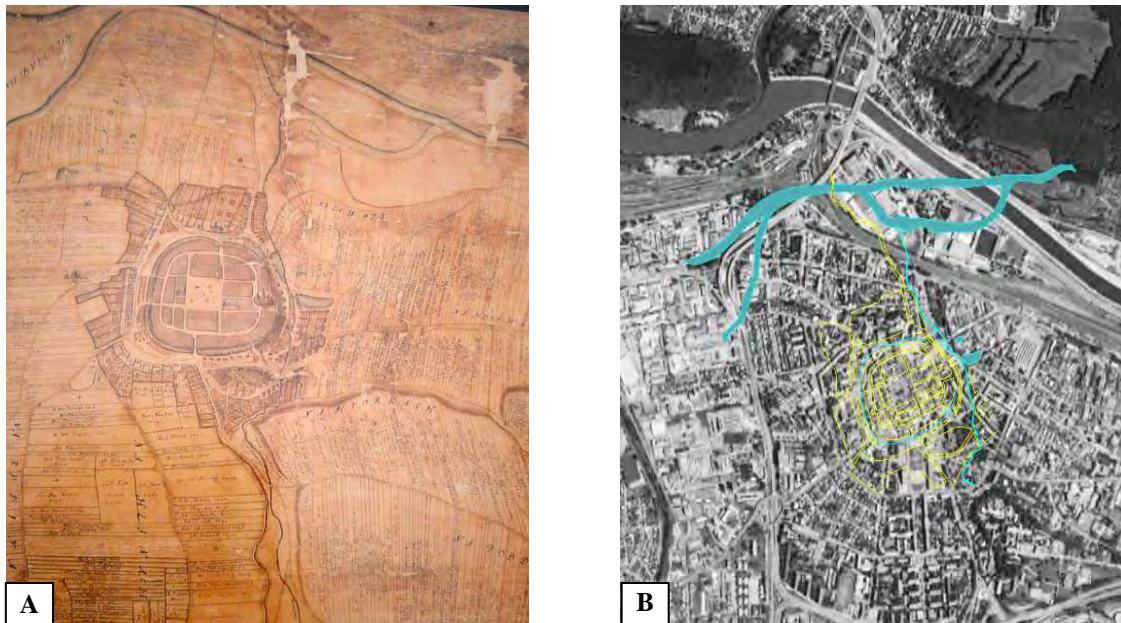
funkcií plnil aj obrannú rolu, tým, že obtekal terénu vyvýšeninu. Osada tak bola zo severu a severovýchodu chránená, čo bolo veľmi významné, keďže osady, ktoré sa nachádzali na nekrytých priestranstvách v rovinatej časti kotliny, boli často napádané a ničené.

V 14. storočí sa zo slovanskej osady postupne stalo mesto – civitas. V roku 1381 bolo mestu udelené Privilegium pro Slavis – Privilégium pre žilinských Slovákov. Žilina mala v tomto období významné postavenie, čo sa týka hospodárskej, ale aj právnej oblasti [4]. Rozvoj osady a zmena právneho štatútu na mesto mali vplyv aj na prírodné zázemie osídlenia. Zatiaľ čo v 13. storočí bol Váh v bezprostrednej blízkosti centra mesta, v 14. storočí môžeme badať jeho zmenenú polohu. Rieka už viac neobklopuje mesto, ale prikláňa sa k pohoriu na severe. O tom svedčí aj kresba z roku 1321 [4], na ktorej je vyobrazená mýtnica pri moste spájajúcom Budatín a Žilinu.

15. storočie bolo ovplyvnené vpádmi husitov a pustošením mesta. V okolí Žiliny boli preto stavané hradby a opevnenia. V roku 1499 uzavreli predstavitelia mesta s budatínskym zemepánom dohodu o výstavbe mostu cez Váh. V 16. a 17. storočí bolo mesto niekoľkokrát vypálené, vydrancované a jej obyvateľstvo postihol mor (morové epidémie trvali až do 18. storočia). Mesto bolo značne oslabené, napriek tomu útoky rôznych vpádov odrážalo aj vďaka vybudovaným hradbám [4]. Keďže mesto preživalo od 15. storočia obdobie stagnácie, nedochádzalo k významnému rozvoju sídla, a teda ani k podstatným vplyvom na krajinnú štruktúru. V roku 1747 Michal Ruttkay Nedecký spracoval najstaršiu mapu Žilinského chotára [5]. Táto mapa zobrazuje charakter mesta v období od 15. do 18. storočia. Rieka Váh je už podľa mapy a kresieb vzdialenejšia od centra mesta. Na mape je zakreslené aj opevnenie mesta, mestské priekopy, napĺňané prítokom Váhu a pribudli aj dve vážske ramená - **Obr. 2**.

Z nákresu mostov cez rieku Váh [6] a z mapy chotára Žiliny [5] môžeme usúdiť, že Váh mal pri Žiline viacero ramien a rieka mala v tejto dobe prirodzený charakter. Jej koryto sa často menilo o čom svedčí aj názov toku v danej dobe – Vagus fluvius (blúdivá rieka). O existencii viacerých ramien Váhu v hodnotenom úseku toku svedčia aj kresby z tohto obdobia. Bočné rameno je v latinčine pomenované ako Alveus Vagi fluvii, čo v preklade znamená plytké koryto blúdivého Váhu. Váh bol teda do 18. storočia organický a vďaka stagnácii urbánneho rozvoja si zachovával svoj ráz.

Zobrazenie záujmového územia na mape z 1. vojenského mapovania potvrdzuje stagnáciu rozvoja mesta - **Obr. 3**. Na tejto mape je možné vidieť takmer priamu nivu Váhu už bez bočných ramien. Poloha koryta rieky je veľmi podobná tej dnešnej.



Obr. 2 Poloha Váhu voči centru mesta na mapách z rokov 1747-1749 [5] (A) a v súčasnosti (B)



Obr. 3 Váh na mape 1. vojenského mapovania [7] (A) a v súčasnosti (B)

V roku 1813 strhol rozvodnený Váh pri Budatíne most a voda zaliala predmestie Kálov. Významným historickým medzníkom bolo vybudovanie železnice, v roku 1870. 1. novembra 1883 bol dobudovaný úsek železnice Trenčín – Nová Žilina a začala sa premávka na Považskej železnici. Rozvoj priemyslu priniesol prudký nárast obyvateľstva. Budovaniu železnice museli ustúpiť ramená Váhu, ktoré tu boli ešte v 18. storočí. Váh bol odsunutý na sever, tesne k úpätiu pohoria. Medzi mestom, ktoré sa len pomaly začínalo rozrastať a riekou sa narušili väzby. Zatiaľ čo v roku 1842 je viditeľný bezprostredný kontakt sídla a rieky, na

mape z 2. vojenského mapovania pretína tento vzťah novovybudovaná železnica - **Obr. 4.**



Obr. 4 Váh na mape z 2. vojenského mapovania [8] (A) a v súčasnosti (B)

V roku 1903 pri veľkej povodni poškodili záplavy Kálov i blízky Miléniový park, dnešný Sad SNP. Až do 1. svetovej vojny mesto zaznamenávalo rozvoj. Po 2. svetovej vojne sa mesto rozširovalo, blízke obce sa stali jeho súčasťou. Žilina reprezentovala v tom období najväčšie mesto na severnom Slovensku a zároveň bola krajským mestom. V roku 1994 sa začala výstavba Vodného diela Žilina ako posledného prvku Vážskej kaskády [9]. Týmto zásahom do riečnej krajiny sa významne zmenil charakter severného okraja mesta. V súčasnosti má rieka presne zafinované koryto a vodné dielo plní okrem primárnej vodohospodárskej a ochrannej (vodozáchytnej) funkcie aj rekreačnú, ktorá však iba v náznaku poukazuje na prepojenosť obyvateľov s riekou. Obyvatelia mesta teda v súčasnosti nemajú s riekou prirodzený vzťah. Peší prístup k rieke z centra mesta je takmer nemožný. Cestné a železničné komunikácie prerušili vzťahy budované po niekoľko storočí. Časť Žiliny – Budatín so zámkom, s ktorým sa mesto v minulosti spájalo niekoľkými mostami, je dnes aj napriek svojej atraktivite akýmsi izolovaným priestorom za železničnou traťou.

Záver

Vplyv rozvoja sídla počas niekoľkých storočí na riekou Váh je zreteľný. Mesto Žilina vzniklo v bezprostrednej blízkosti rieky a využívalo túto strategickú pozíciu. Kým bola rieka pre mesto užitočná a potrebná, bola jeho neodmysliteľnou súčasťou. V momente, keď sa mesto začalo prudko rozvíjať a technologický pokrok dovolil nahradiť pôvodné funkcie vodného toku, rieka sa stala skôr príťažou z pohľadu rozvoja územia. Človek si prírodný vodný krajinný prvok podmanil a účelovo prispôbil bez ohľadu na jeho prirodzenosť.

V súčasnosti je Váh zregulovaný, stratil svoju primárnu vlastnosť, podľa ktorej bol v minulosti pomenovaný – Vagus (blúdivý). Mesto nemá žiadny kontakt so svojou najväčšou riekou, vytesnilo ju do čo najväčšej možnej miery. Reguláciou rieky sa na jednej strane predišlo záplavám, ktoré boli v území pravidelné, no mesto prišlo o jednu zo svojich charakteristík, ktoré tvorili jeho identitu od samotného vzniku.

Podobný dôsledok má rozvoj sídla aj na ďalšie krajinné prvky. Vzťahy, ktoré boli pred niekoľkými storočiami dôležité, často aj nevyhnutné pre život a fungovanie mesta, sú dnes potlačené alebo hlboko narušené. Postupne sa tak strácajú mestotvorné hodnoty, ktorých navrátenie už viac nie je nemožné.

Táto práca poukazuje o. i. aj na dôležitosť analýz historických materiálov v rámci plánovania zmien v území. Kvalitná historická analýza krajiny a návrhy z nej vyplývajúce môžu pomôcť uchrániť územie pred deštruktívnymi zásahmi a prispieť tak k zachovaniu územnej identity.

Pod'akovanie

Pod'akovanie patrí doc. RNDr. Eve Pauditšovej, PhD. za cenné pripomienky k práci. Táto práca vznikla s podporou Grantu UK/265/2013 a projektu VEGA 1/0422/13.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Vodrážka P. (1996) Dejiny stavby miest. Vydavateľstvo STU, Bratislava, p. 81
- [2] Moravčík J. (1975) Najstaršie osídlenie Žiliny. In: Halaj D., Marsina R. (eds.) Žilina – dejiny a prítomnosť. Osveta, Martin, p. 23
- [3] Heinrichová M. (2009) Metodika tvorby v územiach so špecifickým režimom (Dizertačná práca). Fakulta architektúry, STU, Bratislava, p. 52
- [4] Prikryl L., Štanský P. (1997) Mesto Žilina. Danubiaprint, Bratislava, p. 16
- [5] Ruttkay Nedecký M. (1747) Zvláštny nárys polí slobodného mesta Žiliny, uložená v Považskom múzeu, Žilina
- [6] Ruttkay Nedecký M. (1749) Mapa žilinských mostov cez Váh, uložená v PM, Žilina
- [7] Theil des Trentschiner Comitatus – 1. vojenské mapovanie (1776) 1:14 400
- [8] 2. vojenské mapovanie (1823) 1: 28 800
- [9] Slovenský priehradný výbor [Citované: 4.marec 2013]
<http://www.skold.sk/priehrady/nova_databaza_priehrad/vd_zilina/>

Fytotoxicita ťažkých kovov (Sb, Ni, V a Zn) hodnotená inhibíciou rastu semenáčikov *Sinapis alba* L.

Monika Šmelková, Agáta Fargašová, Slavomír Čerňanský

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra environmentálnej ekológie, Mlynská dolina, B2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; smelkova@fns.uniba.sk

Abstract

The aim of the study was to detect the phytotoxicity of Sb^{3+} , Ni^{2+} , V^{5+} and Zn^{2+} on *Sinapis alba* L. seedlings growth evaluated as root and shoot prolongation inhibition. Adverse effects were expressed as nominal EC_{50} values for both observed parameters. Presented results indicate that Sb, Ni, V and Zn significantly reduced root and shoot growth of model plant. On the basis by probit analysis calculated EC_{50} values following inhibitory rank orders can be established: for roots: $\text{V}^{5+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Sb}^{3+} > \text{Zn}^{2+}$; for shoots: $\text{Ni}^{2+} > \text{V}^{5+} > \text{Sb}^{3+} > \text{Zn}^{2+}$. The strongest adverse effects for both observed parameters were confirmed for V^{5+} and Ni^{2+} . Root growth was reduced more than that of shoots.

Kľúčové slová: antimón; nikel; vanád; zinok; *Sinapis alba*; fytotoxicita; inhibícia rastu

Úvod a formulácia cieľa

Ťažké kovy patria v prírode medzi najstaršie anorganické kontaminanty. Nachádzajú sa vo zvýšenej miere v pôde, vode aj ovzduší a predstavujú riziko pre biotické aj abiotické zložky ekosystémov. Ich nebezpečenstvo pre živé organizmy spočíva v tom, že nie sú biologicky odbúrateľné, a preto dochádza v danom prostredí k ich akumulácii. Niektoré ťažké kovy sú pre rastliny veľmi toxické, iné plnia v rastlinnom organizme esenciálne funkcie, ale v konečnom dôsledku majú po prekročení optimálnych koncentrácií takisto negatívne účinky.

Pre získanie objektívnych informácií o miere poškodenia jednotlivých zložiek životného prostredia je nevyhnutná ekotoxikologická analýza, ktorá je založená na stanovení toxických účinkov, ako je napr. inhibícia rastu, na vhodných rastlinných (resp. živočíšnych) druhoch [1].

Geochemické vlastnosti antimónu a arzenu sú veľmi podobné. Antimón nie je pre rastliny esenciálnym prvkom a po vstupe do rastliny má tendenciu nahrádzať esenciálne prvky. V nadbytku je preto pre rastliny toxický [2]. V prostredí sa najčastejšie vyskytuje v oxidačných stupňoch Sb^{3+} a Sb^{5+} , pričom trojmocný antimón sa považuje za 10-násobne toxickejší [3]. Nikel je alergén, ktorý negatívne vplýva až na 17,2 % ľudskej populácie [4]. Hoci je ako súčasť enzýmu ureáza pre vyššie rastliny esenciálnym prvkom, jeho nadmerné koncentrácie vedú k poruchám rastu koreňov a výhonkov, k zníženej tvorbe čerstvej aj suchej biomasy rastlín a k inhibícii tvorby fotosyntetických pigmentov [5]. Zatiaľ čo pre riasy je vanád esenciálnym prvkom, nakoľko v nich stimuluje proces fotosyntézy, jeho esencialita pre

vyššie rastliny sa zatiaľ nepotvrdila [6]. Medzi prejavy fytotoxicity patrí najmä chloróza listov, spomalený rast, inhibícia enzýmovej aktivity [7]. Zinok je pre vyššie rastliny esenciálnym prvkom: je súčasťou enzýmov a proteínov, ovplyvňuje bunkový metabolizmus a metabolizmus nukleových kyselín [8]. Hoci sa toxicita zinku v porovnaní s toxicitou iných ťažkých kovov považuje za nízku, vyskytuje sa pomerne často a medzi hlavné príznaky poškodenia zinkom patrí chloróza, hlavne mladých listov, a spomalený rast [9].

Cieľom tejto práce bolo hodnotenie a porovnanie toxických účinkov štyroch ťažkých kovov – antimónu, niklu, vanádu a zinku sledovaním inhibície rastu poľnohospodárskej plodiny *Sinapis alba* L. (horčica biela) pestovanej v laboratórnych podmienkach. Výsledky sa štatisticky vyhodnotili probitovou analýzou stanovením EC_{50} hodnôt a ich 95 % intervalov spoľahlivosti (CI).

Materiál a metódy

Semená horčice bielej (*Sinapis alba* L., odroda Severka) sa vysiali do vertikálnych kultivačných kontajnerov s rozmermi 21 x 15,5 cm (Phytotoxkit, MicroBioTests Inc., Nazareth, Belgicko) na vrstvu papierovej vaty a filtračného papiera, ktoré boli nasiaknuté 24 ml testovaného roztoku. Kovy sa na rastliny aplikovali vo forme nasledovných zlúčenín: antimón ako $K[C_4H_2O_6Sb(OH)_2]$ (Sigma-Aldrich, Nemecko), nikel ako $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (Lachema Brno, ČR), zinok ako $ZnCl_2$ (Merck, Nemecko) a vanád ako NH_4VO_3 (Merck, Nemecko). Ako kontrola sa používala 24 h odstáta vodovodná voda ($72,6 \text{ mg.l}^{-1}$ Ca, $17,7 \text{ mg.l}^{-1}$ Mg; voľný Cl < $0,02 \text{ mg.l}^{-1}$; pH = $7,48 \pm 0,13$). Kontajnery (v každom bolo 15 semien) sa uložili v zvislej polohe do termostatu (Nüve Cooled Incubator ES 110, Turecko), kde sa pri teplote $25 \pm 1^\circ\text{C}$ nechali klíčiť v tme po dobu 72 hodín. Následne sa zmerala dĺžka koreňov a nadzemných častí (výhonkov) jednotlivých semenáčikov, čo umožnilo probitovou analýzou vypočítať hodnoty EC_{50} (koncentrácia, pri ktorej dochádza k 50 % inhibícii sledovaného parametra) pre inhibíciu rastu ako koreňov tak aj výhonkov.

Kovy sa testovali v nasledovných koncentráciách: Sb 9, 18, 27, 36, 46 mg.l^{-1} , Ni 3, 6, 13, 38, 63 mg.l^{-1} , Zn 48, 120, 360, 504 a 720 mg.l^{-1} a V 1, 2, 4, 11, 22, 44, 109 a 218 mg.l^{-1} . Kontrola aj testované koncentrácie kovov sa hodnotili v 3 paralelkách. pH všetkých testovaných roztokov sa pohybovalo medzi hodnotami 6,2-6,9.

Výsledky a diskusia

Ako prvé prichádzajú v pôde do kontaktu s kovmi korene rastlín, čo môže viesť k obmedzeniu ich rastu a po transporte kovov do nadzemnej časti rastliny aj k ovplyvneniu dĺžky výhonkov. Preto sa pri stanovovaní toxického účinku látok na rastliny bežne využíva hodnotenie inhibície rastu ich jednotlivých častí. Hodnoty, pri ktorých sa v priebehu našich testov prejavil 50 %-ný inhibičný účinok kovov na rast *S. alba*, sú uvedené v Tab. 1. Na ich základe boli pre inhibíciu rastu jednotlivých častí rastlín zostavené nasledovné inhibičné rady: pre korene: V > Ni > Sb > Zn; pre výhonky: Ni > V > Sb > Zn. Elongácia koreňov aj výhonkov bola najviac inhibovaná niklom a vanádom, najmenej zinkom. Všetky testované kovy redukovali viac rast koreňov ako výhonkov *S. alba*.

Tab. 1 Hodnoty EC₅₀ a ich 95 % intervaly spoľahlivosti (CI) pre inhibíciu rastu koreňov a výhonkov semenáčikov *Sinapis alba* v prítomnosti antimónu, niklu, vanádu a zinku

EC ₅₀ ± 95 % CI (mg.l ⁻¹)	Sb	Ni	V	Zn
Koreň	29,0 (25,0-33,6)	15,3 (9,1 – 25,8)	6,7 (4,4-10,2)	314,1 (266,9-369,5)
Výhonok	106,2 (88,9-126,9)	24,1 (10,4 – 55,8)	86,0 (52,9-139,7)	585,8 (470,8-728,9)

Antimón v rozpustnej forme ľahko preniká do rastlín [10]. Udáva sa, že jeho koncentrácie v koreňoch sú 6-16-násobne vyššie ako v listoch a koreňový systém vytvára bariéru, ktorá zamedzuje jeho zvýšený transport do nadzemných častí rastlín [9]. S takýmito závermi sa zhodujú aj naše výsledky, ktoré potvrdili, že na 50 %-nú inhibíciu rastu výhonku bola potrebná až 3,6-krát vyššia koncentrácia Sb ako na ekvivalentnú inhibíciu rastu koreňa. K rovnakým záverom dospeli aj experimenty na ryži po aplikácii antimónu [11].

Negatívny vplyv vyšších koncentrácií niklu na rast rastlín potvrdilo viacero autorov. 50 %-ná inhibícia rastu koreňov *Sinapis alba* sa zaznamenala už pri koncentrácii Ni 11,5 mg.l⁻¹, čo sa dobre zhoduje s našimi výsledkami (EC₅₀ = 15,3 mg Ni.l⁻¹) [12].

Pri vanáde sa v priebehu testov zaznamenali výrazné rozdiely medzi EC₅₀ hodnotami pre inhibíciu rastu koreňa a výhonku. Rast koreňa bol po aplikácii tohto kovu o 50 % redukovaný pri koncentrácii, ktorá bola 12,8-krát nižšia ako koncentrácia pre rovnakú mieru inhibície rastu výhonku. Vysokú toxicitu vanádu hlavne na rast koreňov uvádzajú aj iní autori: pre inhibíciu rastu koreňa *Sinapis alba* sa udáva ako EC₅₀ hodnota 15,8 mg V.l⁻¹ [13] a pre 50 %-nú inhibíciu rastu koreňov hybridu *Cuphea viscosissima* x *C. lanceolata* sa udáva koncentrácia 3 mg V.l⁻¹ [14]. Tieto údaje dobre korešponujú s našimi EC₅₀ hodnotami.

Pre rastliny sa zinok uvádza predovšetkým ako inhibítor rastu ich koreňov [15]. Zinok aplikovaný na *Triticum aestivum* pôsobil 2,28-krát toxickejšie na korene ako na výhonky [16] a túto skutočnosť sme potvrdili aj v našich experimentoch so *S. alba*, pri ktorých boli nominálne hodnoty EC_{50} pre rast výhonkov 1,86-násobne vyššie ako EC_{50} hodnoty pre rast koreňov.

Záver

Uvádzané výsledky potvrdili inhibičný účinok testovaných kovov na rast koreňov aj výhonkov *Sinapis alba*. Z nominálne stanovených EC_{50} hodnôt je zrejmé, že aj prvky, ktoré sa môžu prirodzene vyskytovať v rastlinách, akými sú Ni a Zn, môžu byť pre rastliny v určitých koncentráciách toxické. Ako najtoxickejšie sa z testovaných kovov ukázali vanád a nikel a najmenej toxický účinok sa potvrdil pri zinku.

Pod'akovanie

Projekt bol realizovaný za finančnej podpory grantov UK/352/2013, KEGA 027UK-4/2013 a VEGA 1/1155/12.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Fargašová A. (2009) Ekotoxikologické biotesty. PERFEKT, Bratislava, p. 8
- [2] Baroni F., Boscagli A., Protano G. et al. (2000) Environ. Pollut. 109(2), p. 347
- [3] Ulrich N. (2005) Speciation of Antimony. In: Cornelis R. (ed.) Handbook of Elemental Speciation II. John Wiley and sons, Chichester, England, p. 48
- [4] Almpanis G.C., Tsigkas G.G., Koutsojannis K. et al. (2010) Int. J. Card. 145(2), p. 364
- [5] Fargašová A., Molnárová M. (2010) Environ. Sci. Pollut. Res. 17, p. 187
- [6] Tham L.X., Nagasawa, N., Matsushashi, S. et al. (2001) Radiat. Phys. Chem. 61(2), p. 171
- [7] Tatár E., Mihucz V., Varga A. et al. (1999) J. Inorg. Biochem. 75(3), p. 219-223.
- [8] Broadley M.R., White P.J., Hammond J.P. et al. (2007) New Phytol. 173, p.677
- [9] Kabata-Pendias A., Pendias H. (2001) Trace Elements in Soils and Plants. Third Edition. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, p. 152
- [10] Cuicui Q., Fengchang W., Qiuqing D. et al. (2011) Microchem. J. 97(1), p. 44
- [11] Mengchang H., Jurong Y. (1999) Sci. Total Environ. 243-244, p. 149
- [12] Molnárová M., Fargašová A., Pastierová, J. (2006) Priemysel'ná toxikológia 2006, Zborník príspevkov, Piešťany 23. - 25. máj 2006, p. 262
- [13] Fargašová A., Beinrohr E. (1998) Chemosphere 36(6), p. 1305

- [14] Olness A., Gesch R., Forcella F., Archer D., Rinke J. (2005) *Ind. Crop Prod.* 21(2), p. 165
- [15] Page V., Le-Bayon R-C., Feller, U. (2006) *Environ. Exp. Bot.* 58, p. 269
- [16] Xiaoning L., Yingli Y., Jin Z., Linyun J., Qiaoxia L., Temgguo Z., Kexiong O., Shengchun M. (2012) *Ecotox. And Environ. Saf.* 86, p. 198

Cezhraničné posudzovanie vplyvov činností na životné prostredie medzi Slovenskou republikou a Maďarskom

Angelika Tamášová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra krajinnej ekológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, angelika.tamasova@gmail.com

Abstract

This article examines the relationship of Slovak Republic and Hungary, as ‘Parties of origin’ and ‘affected Parties’ under the UNECE Convention on Environmental Impact Assessment in a Transboundary Context (Espoo). The national EIA systems of these two countries differ in many ways so it is interesting to investigate, how the transboundary EIA procedures are integrated into a functioning procedure and organized between them. The first part of the article characterizes the Espoo Convention and the current EIA legislative of Slovak Republic and Hungary. To illustrate challenges and problems in this field, in the second part of the work six cases, which have been assessed between the Slovak Republic and Hungary in the last two years, are analyzed. The article ends with a verification/rejection of a hypothesis.

KLúčové slová: *cezhraničné posudzovanie; Slovenská republika; Maďarsko; Dohovor z Espoo*

Úvod a formulácia cieľa

Pomocou posudzovania vplyvov činností presahujúcich štátne hranice je možné predchádzať konfliktom environmentálnej povahy medzi susediacimi krajinami. Článok je venovaný aktuálnej problematike cezhraničného posudzovania vplyvov na životné prostredie v dvoch susediacich štátoch, a to v Slovenskej republike a v Maďarsku. Prostredníctvom analýzy šiestich prípadov cezhraničných posudzovaných činností z posledných dvoch rokov poukazuje aj na výzvy a problémy tejto oblasti.

Dôležitým krokom v oblasti posudzovania vplyvov činností na životné prostredie (ďalej ako posudzovanie vplyvov) bolo prijatie Dohovoru EHK OSN o hodnotení vplyvov na životné prostredie presahujúce štátne hranice (ďalej ako Dohovor z Espoo) v Espoo (Fínsko) 25. februára 1991, ktorý zaviedol proces cezhraničného posudzovania do vnútroštátnej legislatívy jednotlivých štátov a umožnil iným štátom zasiahnuť presne ustanoveným spôsobom do prípravy činností, ktoré sú plánované mimo ich územia a môžu mať nepriaznivé vplyvy na ich životné prostredie [1]. Dohovor z Espoo vstúpil do platnosti 10. septembra 1997. Bývalá ČSFR pristúpila k Dohovoru z Espoo 20. augusta 1991. SR uznala podpis 28. mája 1993 a ratifikovala ho 19. novembra 1999 [2]. Maďarsko podpísalo Dohovor z Espoo 26. februára 1991 a ratifikovalo ho 11. júla 1997 [2]. V SR sa Dohovor z Espoo premietol do pôvodného zákona NR SR č. 127/1994 Z. z. o posudzovaní vplyvov na životné prostredie v znení neskorších predpisov, ktorý bol neskôr nahradený zákonom NR SR č. 24/2006 Z. z. v

znení neskorších predpisov (§ 40, § 41, § 44 - § 52), v Maďarsku do nariadenia vlády č. 314/2005 (XII. 25.) o posudzovaní vplyvov na životné prostredie a integrovaného povoľovania a kontrole znečisťovania (§ 12 - § 16) [1, 3].

Ako členské štáty, SR aj Maďarsko, implementovali Smernicu EIA (EIA = environmental impact assessment, slov. posudzovanie vplyvov na životné prostredie) a harmonizovali svoju legislatívu s legislatívou EÚ. Tým pádom proces EIA je zakotvený v oboch štátoch, ale systém jeho úpravy sa značne odlišuje. V SR je EIA samostatným procesom, nachádzajúcim sa mimo povoľovacieho konania, končiaci záverečným stanoviskom, v ktorom je uvedené, či príslušný orgán odporúča, alebo neodporúča realizáciu navrhovanej činnosti [4]. Pri rozhodovaní o povolení navrhovanej činnosti sa musí prihliadať na jeho obsah. V Maďarsku EIA tvorí súčasť povoľovacieho konania a je ukončená s vydaním environmentálneho povolenia. V presne stanovených prípadoch je ju možné zlúčiť s procesom integrovaného povoľovania a kontrole znečisťovania. Vtedy v rámci integrovaného povoľovacieho konania je vydané integrované povolenie [5]. Na základe uvedených informácií je zaujímavé venovať pozornosť úprave a organizácii cezhraničného posudzovania medzi SR a Maďarskom.

Cieľom predkladaného článku je objasnenie postupov posudzovania vplyvov presahujúcich štátne hranice v oboch štátoch a overenie nasledujúcej hypotézy: Napriek tomu, že slovenský a maďarský proces posudzovania vplyvov činností na životné prostredie (EIA) má odlišnú povahu, priebeh cezhraničného posudzovania je rovnako legislatívne upravený v oboch štátoch na základe Dohovoru z Espoo.

Materiál a metódy

Informácie o cezhraničnom posudzovaní pre overenie hypotézy sa čerpali z Dohovoru z Espoo, zo zákona NR SR č. 24/2006 v znení neskorších predpisov, z nariadenia vlády Maďarska č. 314/2005 (XII. 25.), z dokumentov, uložených na webovej stránke www.enviroportal.sk a z pripravovanej diplomovej práce, ktorej predmetom je porovnanie procesu posudzovania vplyvov v SR a v Maďarsku. Užitočné podklady boli poskytnuté MŽP SR. Analyzovalo sa šesť prípadov cezhraničného posudzovania z posledných dvoch rokov. V troch SR vystúpila ako strana pôvodu (Veterný park Čalovec, Energetický park Zlatná na Ostrove, Veterný park v k. ú. Obce Svätý Peter) a v troch Maďarsko vystúpilo ako strana pôvodu (Výstavba plynovej turbíny (CCGT) v elektrárni Bakony Erőmű Zrt. v Almásfüzitő, Výstavba cesty a cestného mosta medzi Ipolydamásd a Chľaba, Výstavba cesty a cestného

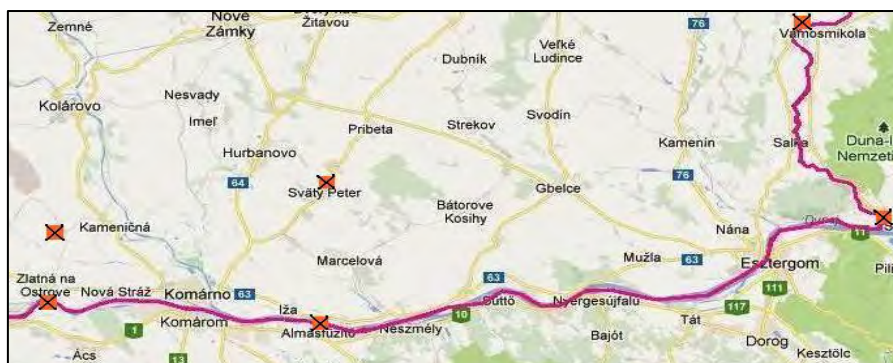
mosta cez rieku Ipeľ medzi Pastovcami a Vámosmikola). Pre lepšiu prehľadnosť v článku sú používané nasledujúce skratky: MŽP SR pre Ministerstvo životného prostredia Slovenskej republiky a MRV M pre Ministerstvo rozvoja vidieka Maďarska.

Výsledky a diskusia

V cezhraničnom posudzovaní navrhovaného veterného parku v Čalovci, energetického parku v Zlatnej na Ostrove a veterného parku v k. ú. obce Svätý Peter, SR vystúpila ako strana pôvodu. Keďže predmetom týchto troch projektov boli veterné parky s umiestnením v jednom regióne, a ich cezhraničné vplyvy sa predpokladali v tom istom hraničnom pásme SR s Maďarskom, cezhraničné posudzovanie sa vykonalo spoločne. MŽP SR doručilo oznámenie o návrhu činností, v ktorom uviedlo, že predpokladá výskyt negatívnych vplyvov presahujúcich štátne hranice a dokumentáciu odovzdalo MRV M. Maďarská strana informovala dotknuté subjekty a žiadala o pripomienkovanie dokumentácie. Po vyhodnotení pripomienok MRV M konštatovalo, že navrhované činnosti pravdepodobne majú nepriaznivé vplyvy na územie Maďarska, hlavne na populácie vtákov a netopierov. Preto v jeho odpovedi uviedlo, že Maďarsko sa zúčastní cezhraničného posudzovania. MŽP SR doručilo dotknutej strane podrobnejšie informácie a všeobecne zrozumiteľné zhrnutie. MRV M konštatovalo, že rozsah všeobecne zrozumiteľného zhrnutia nebol dostatočný a požadovalo poskytnutie detailnejšieho všeobecne zrozumiteľného a netechnického zhrnutia v maďarčine alebo v angličtine. Prebehla aj bilaterálna konzultácia medzi zástupcami MŽP SR a MRV M, na ktorej sa dohodlo, ktoré kapitoly správ o hodnotení je potrebné preložiť. Po doručení prekladov MRV M žiadalo dotknuté subjekty o zaujatie stanoviska. Po ich vyhodnotení MRV M konštatovalo, že v prípade navrhovaného veterného parku v k. ú. obce Svätý Peter nepredpokladá výskyt nepriaznivých vplyvov na maďarskom území [8]. V odôvodnení uviedlo, že táto navrhovaná činnosť sa nachádza vzdialenejšie od maďarských hraníc, a podľa štúdií slovenských odborníkov, výskyt chránených druhov a cenných vodných biotopov nie je významný v tejto lokalite [8]. V prípade navrhovaného veterného parku v Čalovci a energetického parku v Zlatnej na Ostrove MRV M konštatovalo, že činnosti môžu mať nepriaznivé vplyvy na maďarské územie, lebo sú umiestnené oveľa bližšie k maďarskej hranici, aj k Dunaju, kde sa nachádzajú cenné biotopy ornitofauny [6, 7]. MRV M navrhlo vykonanie odbornej konzultácie na objasnenie týchto záležitostí. Po jej vykonaní usporiadalo verejné prerokovanie pre všetky tri projekty spoločne. Po vyhodnotení dostupných

dokumentov MRV M doručilo pripomienky a návrh niekoľkých preventívnych opatrení MŽP SR a žiadalo o ich zohľadnenie.

Prvým analyzovaným prípadom, kde Maďarsko vystúpilo ako strana pôvodu a SR ako dotknutá strana, bol návrh výstavby plynovej turbíny (CCGT) v elektrárni Bakony Erőmű Zrt. v Almásfüzitő. MRV M doručilo oznámenie MŽP SR o navrhovanej činnosti, dokumentáciu a informovalo slovenskú stranu o pravdepodobnom výskyte negatívnych vplyvov presahujúcich štátne hranice. MŽP SR doručilo dokumentáciu na pripomienkovanie dotknutým subjektom. Po vyhodnotení pripomienok uviedlo, že má záujem zúčastniť sa cezhraničného posudzovania. MRV M zaslalo MŽP SR podrobnejšie informácie o navrhovanej činnosti a všeobecne zrozumiteľné zhrnutie. MŽP SR doručilo dokumentáciu dotknutým subjektom na zaujatie stanoviska a v dotknutých obciach prebehli verejné prerokovania. Po vyhodnotení dostupných dokumentov MŽP SR skonštatovalo, že navrhovaná činnosť pravdepodobne nebude mať značne nepriaznivé vplyvy na životné prostredie územia SR [9]. Napriek tomu uviedlo, že nie je možné vylúčenie určitých vplyvov, a preto žiadalo o zohľadnenie niekoľkých pripomienok a požiadaviek [9].



Obr. 1 Zobrazenie analyzovaných navrhovaných činností v prihraničnom území SR a M [10]

Ďalšie dva prípady, kde Maďarsko vystúpilo ako strana pôvodu, súviseli s výstavbou cestných komunikácií a cestných mostov cez rieku Ipeľ. Procesnosť cezhraničného posudzovania a prvé kroky MRV M a MŽP SR sa zhodovali s hore uvedenými krokmi. V prípade návrhu výstavby cesty a cestného mosta medzi Ipolydamásd a Chľaba po vyhodnotení pripomienok a zvážení okolností MŽP SR uviedlo, že nemá záujem zúčastniť sa cezhraničného posudzovania, lebo neboli identifikované nepriaznivé vplyvy na územie SR a odporúčalo vykonať monitoring navrhovanej činnosti [11]. V prípade návrhu výstavby cesty a cestného mosta cez rieku Ipeľ medzi Pastovcami a Vámosmikola pri vyhodnotení pripomienok bol identifikovaný vplyv na územie SR, a z tohto dôvodu MŽP SR navrhlo vykonanie neoficiálnych konzultácií medzi odbornými organizáciami SR a Maďarska, a žiadalo

o zapracovanie pripomienok správcu vodného toku do dokumentácie. MŽP SR ďalej uviedlo, že nemá záujem zúčastniť sa cezhraničného posudzovania.

Strana pôvodu, či je ňou SR alebo Maďarsko, má na starosti doručenie oznámenia o navrhovanej činnosti, ktorá môže mať nepriaznivé vplyvy na územie dotknutej strany a dokumentáciu dotknutej strane a určenie lehoty na odpoveď. Ak dotknutá strana uvedie, že sa zúčastní cezhraničného posudzovania, poskytne jej podrobnejšie informácie a vyzve ju na uskutočnenie konzultácie. Zabezpečí, aby stanoviská a pripomienky dotknutej strany boli zohľadnené a zapracované do dokumentácie. Po ukončení procesu EIA doručí oznámenie o povolení navrhovanej činnosti. Dotknutá strana zabezpečuje komunikáciu so stranou pôvodu, informuje všetky dotknuté subjekty o navrhovanej činnosti, žiada o zaslanie pripomienok a o zaujatie stanovísk, zabezpečuje informovanie verejnosti prostredníctvom dotknutých obcí a zverejnenia dokumentácie, zúčastní sa konzultácií a v prípade potreby usporiada verejné prerokovanie. Po vyhodnotení všetkých dostupných materiálov doručí stanoviská a pripomienky strane pôvodu a žiada o ich zohľadnenie a zapracovanie do dokumentácie. Z analýzy postupov MŽP SR a MRV M vyplýva, že obe ministerstvá sa okrem legislatívnej úpravy SR a Maďarska, riadia aj krokmi stanovenými v Smernici EIA a v Dohovore z Espoo.

Jediným rozdielom v plnení úlohy strany pôvodu alebo dotknutej strany medzi MŽP SR a MRV bolo to, že kým MŽP SR koordinuje celý proces posudzovania vplyvov presahujúcich štátne hranice samo, tak MRV M úzko spolupracuje aj s dotknutým inšpektorátom ochrany životného prostredia, prírody a vôd. Inšpektorát informuje všetky dotknuté subjekty o navrhovanej činnosti, žiada o zaujatie stanovísk, zúčastní sa konzultácií a v spolupráci s MRV M vyhodnotí dostupné materiály. Okrem toho žiadne iné rozdiely v úprave procesnosti cezhraničného posudzovania vplyvov SR a Maďarska neboli identifikované.

Záver

Po analýze uvedených prípadov cezhraničného posudzovania, jednotlivé kroky príslušných orgánov boli porovnané s krokmi uvedenými v zákone NR SR č. 24/2006 Z. z. v znení neskorších predpisov a v nariadení vlády M č. 314/2005 (XII. 25.). Ďalej sa posúdil súlad s pokynmi uvedenými v Dohovore z Espoo. Napriek odlišnej úprave procesnosti EIA v Slovenskej republike a v Maďarsku môžeme konštatovať, že pri implementovaní cezhraničného posudzovania do právnych predpisov, oba štáty sa držali pokynov a krokov uvedených v Dohovore z Espoo a vo Smernici EIA. To znamená potvrdenie hypotézy: proces

posudzovania vplyvov presahujúcich štátne hranice je rovnako legislatívne upravený a v praxi zabezpečovaný v Slovenskej republike aj v Maďarsku, čím oba štáty naplňajú medzinárodné dohovory.

Pod'akovanie

Pod'akovanie patrí zamestnancom Ministerstva životného prostredia Slovenskej republiky, Odboru environmentálneho hodnotenia za cenné pripomienky.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Pavličková, K., Kozová, M. (eds.) et al. (2009) Posudzovanie vplyvov na životné prostredie. Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, p. 68
- [2] UNECE, the Espoo Convention [Citované: 07. Marec 2013]
<<http://www.unece.org/env/eia/ratification/convmmap.html>>
- [3] Bándi, Gy. (eds.) et al. (2007) Előzetes hatásvizsgálat – hatásvizsgálat – IPPC. Complex K., Budapest, p. 375
- [4] Zákon Národnej rady SR č. 24/2006 Z. z. o posudzovaní vplyvov na životné prostredie v znení neskorších predpisov
- [5] Nariadenie vlády Maďarska č. 314/2005 (XII. 25.) o posudzovaní vplyvov na životné prostredie a integrovaného povoľovania a kontrole znečisťovania
- [6] Enviroportal [Citované: 04. Marec 2013]
<<http://enviroportal.sk/sk/eia/detail/veterny-park-calovec>>
- [7] Enviroportal [Citované: 04. Marec 2013]
<<http://enviroportal.sk/sk/eia/detail/energeticky-park-zlatna-na-ostrove>>
- [8] Enviroportal [Citované: 04. Marec 2013]
<<http://enviroportal.sk/sk/eia/detail/veterny-park-v-katastralnom-uzemi-obce-svaty-peter>>
- [9] Enviroportal [Citované: 05. Marec 2013]
<<http://enviroportal.sk/sk/eia/detail/kombinovany-cyklus-plynovej-turbiny-ccgt-v-elektrarni-bakony-plc-v-alm>>
- [10] Google maps [Citované: 05. Marec 2013] <<https://maps.google.sk/>>
- [11] Enviroportal [Citované: 05. Marec 2013]
<<http://enviroportal.sk/sk/eia/detail/oznamenie-o-vystavbe-cesty-cestneho-mosta-medzi-ipolydamasd-mr-chlaba->>>

Hodnotenie mobility potenciálne toxických prvkov v sedimentoch odkaliska Markušovce

Roman Tóth¹, Edgar Hiller¹, Lubomír Jurkovič¹, Peter Šottník², Jaroslav Vozár³

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra geochemie, Mlynská dolina G-243, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; roman.toth@gmail.com

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra ložiskovej geológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

³EL spol. s r.o., Ekologické laboratóriá, Radlinského 17A, 052 01, Spišská Nová Ves

Abstract

Tailings impoundment Markušovce situated in the north-eastern part of Slovak republic was used for deposition of flotation sludge from processing of siderite-barite-sulphidic ores. The aim of this study was the identification of processes controlling the mobility of As, Sb, Hg, Cu, Fe. To meet the aims, the geochemical factors controlling the mobility of potentially toxic elements (PTE) were determined by performing the dynamic column leaching experiments, by sampling of the pore waters using soil lysimeter and by speciation-equilibrium calculations performed with PHREEQC. Based on the leaching tests results, the mobility of PTE in the tailings is low. The limited mobility of PTE is due to their retention by Fe oxyhydroxides and low solubilities of metal(loid)-bearing sulfides. The observations are consistent with PHREEQC calculations, which predict the precipitation of Fe oxyhydroxides as the main solubility-controlling mineral phases for As, Sb, Cu, Hg and Fe.

Key words: *impoundment; Markušovce; As, Sb, Cu, Hg, Fe mobility, column study, lysimeter*

Úvod a formulácia cieľa

Sedimenty, pochádzajúce z úpravy a spracovania sideritovo-barytovo-sulfidických rúd žilných ložísk rudnianskeho rudného poľa, ktoré sú uložené na odkalisku Markušovce, obsahujú výrazne zvýšené koncentrácie niektorých potenciálne toxických prvkov (As, Sb, Hg, Cu, Mn, Fe).

Študované odkalisko sa nachádza v severovýchodnej časti Slovenského rudohoria, neďaleko obce Rudňany. Na odkalisku je v súčasnosti uložených 9 901 160 ton prevažne piesčitých, prachovo-piesčitých kalov s premenlivým obsahom ílovej frakcie, ktoré sa skladajú najmä z SiO₂, Fe, BaSO₄ a Al₂O₃.

Odkalisko Markušovce predstavuje aktívne odkalisko údolného charakteru, v súčasnosti klasifikované ako výhradné ložisko baritu [1].

Z mineralogického hľadiska je študovaný materiál zložený najmä zo sideritu, baritu, kremeňa, menej hojne zastúpený je taktiež muskovit a dolomit. Zo sulfidických minerálov sú to najmä chalkopyrit, pyrit, tetradrit, arzenopyrit, a v menšej abundancii tiež cinabarit [2].

Potenciálna mobilizovateľnosť prvkov (Hg, As, Sb, Cu, Fe) bola v tejto štúdií hodnotená prostredníctvom dynamických kolónových experimentov a pozorovaním zmien

v zložení pórových vôd odoberaných priamo z telesa odkaliska prostredníctvom pôdneho lyzimetra.

Získané výsledky boli vyhodnocované a interpretované prostredníctvom hydrogeochemického modelovania, na základe ktorého je možné určiť napr. minerálne fázy, rozpúšťanie ktorých je zodpovedné za uvoľňovanie zvýšených koncentrácií toxických prvkov do životného prostredia, stanoviť prevládajúce špeciácie sledovaných prvkov v roztoku, či stanoviť saturačné indexy minerálov.

Materiál a metódy

Hlavné vzorky pre štúdium mobility sledovaných prvkov prostredníctvom kolónových experimentov predstavovali vzorky odkaliskového materiálu z vybraných horizontov odkaliska, odoberané prostredníctvom hĺbkového vrtu RU-1, vykonaného v spodnej (bilančnej) časti odkaliska, a hĺbkového vrtu RU-3, vykonaného vo vrchnej (nebilančnej) časti odkaliska.

Pre účely kolónových experimentov boli vybrané tri vzorky odkaliskového materiálu. Z vrtu RU-1 bola vybraná vzorka odkaliskového materiálu (RU1 0,0 - 0,4) z najvrchnejšieho horizontu odkaliska (hĺbka 0,0 až 0,4 m) a vzorka (RU1 1,4 – 2,1), odoberaná z hĺbky 1,4 až 2,1 m. Z vrtu RU-3 bola vybraná vzorka odkaliskového materiálu (RU3 0,0 – 0,4) z hĺbky 0,0 až 0,4 m.

Kolónové experimenty boli vykonané v troch sklenených kolónach s vnútorným priemerom 2,5 cm a dĺžkou 25 cm. Do každej kolóny bolo pridaných 130 g vzorky odkaliskového materiálu, ktorý bol pred aplikáciou homogenizovaný, vysušený a presitovaný na frakciu <1 mm. Na spodok a na vrch kolón bol daný filtračný papier s veľkosťou pórov 20 μm a 10 g silikátového piesku. Prostredníctvom peristaltického čerpadla pretekali kolónami premývacie roztoky (destilovaná voda) v smere zdola nahor, prietokom 0,4 ml/min, po dobu 5 dní. Vzorky výluhov z kolónových experimentov boli odoberané každých 24 hodín a boli v nich stanovené koncentrácie sledovaných prvkov, ako aj základné fyzikálno-chemické charakteristiky (pH, Eh, EC).

Koncentrácie sledovaných prvkov vo výluhoch boli stanovované prostredníctvom akreditovaných laboratórií EL spol. s r.o., Spišská Nová Ves, použitím vhodných analytických metód (AAS, AES-ICP a iné).

Priamo v telese odkaliska bol inštalovaný pôdny lyzimeter (označ. RU-LZ) dlhý 1,2 m. Lyzimeter bol inštalovaný vo vrchnej (nebilančnej) časti odkaliska, v mieste, kde bol v minulosti vykonaný vrt RU-3. Pórová voda naakumulovaná v lyzimetri bola kontinuálne odoberaná po dobu jedného kalendárneho roku (jún 2011 - jún 2012) a boli v nej stanovované

základné fyzikálno-chemické charakteristiky (pH, Eh, EC) a koncentrácie sledovaných prvkov.

Pre účely hydrogeochemického modelovania bol využitý program PHREEQC-2 s použitím databázy minteq.v4.dat.

Výsledky a diskusia

Antropogénny materiál, uložený na odkalisku Markušovce, je z chemického hľadiska zložený najmä z SiO_2 (priem. 30,7 %), Fe_2O_3 (28,6 %), Al_2O_3 (5,3 %), Ba (6,34 %), S_{tot} (3,8 %) a S_{sulf} (0,2 %). Z potenciálne toxických prvkov, ktoré môžu predstavovať riziko znečistenia pre okolité zložky životného prostredia, boli zistené zvýšené koncentrácie hlavne pri Cu ($624,3 \text{ mg.kg}^{-1}$), Hg ($118,19 \text{ mg.kg}^{-1}$), Mn ($13108,46 \text{ mg.kg}^{-1}$), Sb ($114,9 \text{ mg.kg}^{-1}$) a As ($48,3 \text{ mg.kg}^{-1}$). Odkaliskový materiál má alkalický charakter ($\text{pH} = 7,58 - 9,15$), k zmene oxidačných podmienok na redukčné dochádza v telese odkaliska v hĺbke 13 - 15 m [2].

Prostredníctvom dynamických kolónových experimentov boli simulované vyluhovacie procesy prebiehajúce v odkalisku, pričom odoberanie vzoriek výluhov v pravidelných časových intervaloch umožnilo hodnotenie mobility sledovaných prvkov v závislosti na čase.

Z výsledkov kolónových experimentov vyplýva, že sledované prvky (As, Sb, Hg, Cu, Fe) sa vyznačujú veľmi nízkou mobilitou a sú v odkaliskovom materiáli pomerne pevne viazané.

Z celkových obsahov sledovaných prvkov v odkaliskovom materiáli boli do roztoku počas jednotlivých odberov uvoľnené iba veľmi malé podiely sledovaných prvkov, ktoré pri As tvorili 0 až $0,02 \text{ mg.kg}^{-1}$, pri Sb $0,02$ až $0,23 \text{ mg.kg}^{-1}$, pri Hg 0 až $0,01 \text{ mg.kg}^{-1}$, pri Cu 0 až $0,04 \text{ mg.kg}^{-1}$ a pri Fe $0,02$ až $0,23 \text{ mg.kg}^{-1}$. Absolútne celkové koncentrácie sledovaných prvkov uvoľnené z odkaliskového materiálu počas trvania celého experimentu boli pri všetkých sledovaných prvkoch nižšie ako 1 %.

Priemerné uvoľnené koncentrácie sledovaných prvkov vo výluhoch neprekračovali odporúčané hodnoty týchto prvkov uvádzané vo všeobecných požiadavkách na kvalitu povrchových vôd, podľa Nariadenia vlády SR č. 296/2005 Z.z., avšak v absolútnych celkových výluhoch zo vzorky z hlbšieho horizontu (1,4 – 2,1 m), boli limity pre Cu a Hg mierne prekročené.

Hodnota pH ($7,95 - 7,54$) odoberaných výluhov a zároveň koncentrácia sledovaných prvkov vo výluhoch počas jednotlivých odberov postupne klesali, čo je v zhode s tvrdeniami viacerých autorov, že v oxidačných podmienkach, pri znižovaní hodnoty pH rastie sorpčná afinita As a Sb v sedimentoch [3], a taktiež Cu a Hg sú pri takýchto hodnotách pH

v sedimentoch pomerne pevne viazané [4].

Vzorky odkaliskového materiálu z vrchných horizontov (0,0 – 0,4 m) odkaliska, ktoré podliehajú väčšej oxidácii ako nižšie horizonty, sa vyznačovali väčšou retenciou sledovaných prvkov (ich nižšou koncentráciou v roztoku), čo je spôsobené vyšším obsahom oxihydroxidov Fe a Ti v tomto horizonte [2], ku ktorým majú sledované prvky vysokú afinitu.

Inštaláciou pôdných lyzimetrov priamo v telese odkaliska bol zabezpečený kontinuálny, sezónny monitoring (jeden kalendárny rok) a hodnotenie rozsahu uvoľňovania a distribúcie sledovaných prvkov v pórových vodách, nachádzajúcich sa priamo v telese odkaliska.

Taktiež výsledky analýz pórových vôd, odobraných prostredníctvom lyzimetra počas viacerých ročných období (leto – jeseň – jar – leto, 2011/2012), potvrdzujú nízku mobilitu sledovaných prvkov, nakoľko v pórových vodách boli analyzované iba nízke priemerné koncentrácie sledovaných prvkov ($As = 0,0055 \text{ mg.l}^{-1}$, $Sb = 0,006 \text{ mg.l}^{-1}$, $Hg = 0,0008 \text{ mg.l}^{-1}$, $Cu = 0,00925 \text{ mg.l}^{-1}$, $Fe = 0,0505 \text{ mg.l}^{-1}$), ktoré rádovo zodpovedajú priemerným koncentráciám sledovaných prvkov vo výluhoch z kolónových experimentov. Pri všetkých sledovaných prvkoch boli pozorované mierne zvýšené koncentrácie prvkov v pórových vodách odoberaných v letnom období a na jeseň, čo môže súvisieť s väčším premyvným režim v študovanom sedimente v tomto období (väčším priemerným úhrnom zrážok).

Dôvodom nízkej mobility As, Sb, Hg, a Cu v odkaliskovom materiáli je nízka rozpustnosť (sulfidických) minerálov, ktoré sú hlavným zdrojom týchto prvkov v študovanom materiáli, ako aj veľmi účinná sorpcia uvoľnených podielov týchto prvkov na prítomné oxihydroxidy Fe [4, 5].

Z výsledkov kolónových experimentov a analýz pórových vôd je možné pozorovať mierne vyššiu pohyblivosť As a Sb oproti Cu a Hg, čo môže byť spôsobené zvýšenou desorpciou metaloidov z odkaliskového materiálu pri približne neutrálnych podmienkach [2].

Najnižšou mobilitou spomedzi sledovaných prvkov sa vyznačuje Fe, nakoľko Fe uvoľnené rozpúšťaním sideritu je imobilizované formovaním oxihydroxidov Fe (najmä vo vrchnej, oxidačnej vrstve odkaliska), ktorých rozpustnosť je pri približne neutrálny pH podmienkach prostredia nízka [6].

Tieto tvrdenia podporujú taktiež výsledky dosiahnuté prostredníctvom hydrogeochemického modelovania (Tab. 1), ktoré predpokladajú precipitáciu oxihydroxidov Fe (najmä goethit, ferrihydrit a amorfné Fe oxihydroxidy) v roztoku, ako hlavný faktor ovplyvňujúci koncentrácie As, Sb, Cu, Hg a Fe v roztoku, pri prevládajúcich špeciáciách, v akých sa pri daných podmienkach v roztoku nachádzajú.

Tab. 1 Saturačné indexy (SI) vybraných minerálnych fáz a percentuálne zastúpenie prevládajúcich špeciácií vybraných prvkov, vypočítané prostredníctvom modelu PHREEQC, Uvedená je priemerná hodnoty z roztokov odobraných z lyzimetra (LZ) a hodnoty z výluhov odobraných z jednotlivých kolón po prvých 24 hodinách.

	RU1 (0,0 – 0,4 m)	RU1 (1,4 – 2,1 m)	RU3 (0,0 – 0,4 m)	LZ
Saturačný index				
Ferrihydrit	3,04	2,97	2,93	2,44
Goethit	5,74	5,67	5,93	5,14
Hematit	13,87	13,75	13,66	12,7
Siderit	- 7,66	- 7,2	- 7,42	- 5,95
Prevládajúce špeciácie (%)				
As				
HAsO ₄ ²⁻	u. n.	u. n.	95,6	80
H ₂ AsO ₄ ⁻	u. n.	u. n.	4,4	20
Cu				
CuCO ₃ ⁰	84,8	84,3	85,94	87
CuOH ⁺	8,24	8,36	6,6	1,3
Hg				
Hg(OH) ₂ ⁰	99,9	99,7	u. n.	95
Sb				
SbO ₃ ⁻	99,9	99,9	99,9	100

u. n. - Údaj nedostupný, koncentrácia sledovaného prvku bola pod hodnotou detekčného limitu

Pozorovaná bola taktiež vyššia mobilita Sb ako As, ktorý môže byť pri konkurencii s Sb prednostne a účinnejšie viazaný na pevnú fázu [7].

Pozorované zistenia, ktoré poukazujú na nízku mobilitu sledovaných prvkov v študovanom odkaliskovom sedimente sú v zhode s výsledkami predošlých prác [5], kedy boli zaznamenané nízke (rádovo rovnaké) koncentrácie sledovaných prvkov vo vodných výluhoch z jednoduchých extrakčných experimentov (EN 12457), a taktiež v drenážnych vodách odoberaných na odkalisku Markušovce.

Záver

Na základe dosiahnutých výsledkov získaných prostredníctvom dynamických kolónových experimentov a hydrogeochemického modelovania je možné konštatovať, že sledované prvky (As, Sb, Hg, Cu, Fe) sú v sedimente odkaliska Markušovce pomerne pevne

viazané a vyznačujú sa nízkou mobilitou, ktorá je ovplyvnená najmä sorpciou týchto prvkov prítomnými oxihydroxidmi Fe a nízkou rozpustnosťou minerálov s obsahom týchto prvkov. Tieto zistenia potvrdzujú taktiež výsledky pozorovania zloženia pórových vôd v odkalisku prostredníctvom terénneho experimentu s použitím pôdneho lyzimetra.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla s podporou projektu APVV-VMSP-P-0115-09, projektu VEGA 1/0492/11 a grantov UK/113/2012 a UK/285/2012. PodĎakovanie patrí taktiež Ekologickým laboratóriám EL spol. s r.o., Spišská Nová Ves.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Jančura M., Midlík J., Jakúbek Ľ. (2005) Markušovce – odkalisko, prieskum látkového zloženia a výpočet zásob výhradného ložiska „Markušovce – odkalisko – Baryt“. Záverečná správa geologicko-prieskumnej úlohy, Rudnohorská investičná spoločnosť, s.r.o., Spišská Nová Ves, p. 1
- [2] Hiller E., Petrák M., Tóth R. et al. (2013) Environ Sci Pollut Res, DOI 10.1007/s11356-013-1581-5, p. 1
- [3] Dixit S., Hering J. G. (2003) Environ Sci Technol, 37, p. 4182
- [4] Bernaus A., Gaona X., Esbri J. M. et al. (2006) Environ Sci Technol, 40, p. 4090
- [5] Zhu J., Pigna M., Cozzolino V. et al. (2011) J Hazard Mater, 189, p. 564
- [6] Reichard P. U., Kretzschmar R., Kraemer S. M. (2007) Geochim Cosmochim Acta, 71, p. 5635
- [7] Casiot C., Ujevic M., Munoz M. et al. (2007) Appl Geochem, 22, p. 788

Vývoj priemyselného využitia mesta Malacky v rokoch 2002 až 2010

Monika Vyskupová

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra krajinskej ekológie,
Mlynská dolina B2, 842 15, Bratislava, Slovensko; vyskupova@fns.uniba.sk*

Abstract

In this paper we have analysed the landscape changes according to industrial development in Malacky town, which has been accompanied by significant increase in the activities in recent years. Since 1994, there were under the environmental impact assessment assessed 30 different industrial project. The majority of them were proposed in an industrial zone on the southern edge of the town. Realized anthropogenic activities considerably changed the local landscape structure. The significance of these impacts lies mainly in their potential effects on closed protected area Marhecke ponds, in the decrease of local forests and in the reducing of overall ecological stability of local landscape.

Kľúčové slová: prvky využitia zeme, priemysel, Malacky, ekologická stabilita

Úvod a formulácia cieľa

V posledných rokoch je populárnym nástrojom hospodárskeho a ekonomického rozvoja budovanie priemyselných parkov, ktoré prispievajú k zlepšeniu celkovej ekonomickej situácie regiónov a zvyšujú mieru zamestnanosti miestnych obyvateľov. Tento pôvodne americký fenomén z konca 19. storočia sa na Slovensku začal rozvíjať od konca 60-tych rokov minulého storočia. Povinnosť posudzovať návrhy priemyselných parkov bola na Slovensku upravená už zákonom NR SR č. 127/1994 Z.z. v znení neskorších predpisov [1], pričom prvá legislatívna úprava týkajúca sa ich umiestňovania bola prijatá až v roku 2001 [2]. V súčasnosti je povinnosť posudzovať návrhy parkov zakotvená v zákone NR SR č. 24/2006 Z.z. v znení neskorších predpisov v časti Infraštruktúra (9) ako projekty budovania priemyselných zón vrátane priemyselných parkov [3].

Budovanie priemyselných parkov predstavuje dlhodobé procesy rozsiahlej priemyselnej investičnej činnosti, ktoré môžu mať významné ekonomické, sociálne a environmentálne súvislosti [4]. V tejto súvislosti bola v roku 2002 vypracovaná štúdia, ktorej výsledkom bolo stanovených 66 lokalít vhodných pre umiestnenie priemyselných parkov z hľadiska podmienok životného prostredia [5]. Medzi týmito územiai bola navrhovaná i lokalita Malacky – juh, ktorej sa podrobnejšie venujeme v predkladanom príspevku s cieľom identifikovať hlavné vývojové zmeny krajinskej štruktúry v dôsledku realizácie priemyselných aktivít.

Zmeny konkrétnych štruktúrnych prvkov, ich kompozície, plošného zastúpenia,

priestorovej konfigurácie a dynamiky môžu odrážať rôzne funkčné zmeny krajiny a postihovať procesy v nej prebiehajúce. Indikátorom stavu krajiny je tiež jej ekologická stabilita, ktorá umožňuje bližšie charakterizovať štruktúru krajiny z hľadiska zachovania ekologicky významných prvkov a ich pôvodných funkcií [6]. V procese posudzovania vplyvov na životné prostredie predstavuje vyhodnotenie možných zmien stability krajiny popri hodnotení vplyvov navrhovaných činností na krajinnú štruktúru, chránené územia a krajinný obraz dôležitý údaj o možných potenciálnych zmenách územia [7].

Materiál a metódy

Hodnoteným územím v príspevku je priemyselná zóna Malacky – juh nachádzajúca sa na juhovýchodnom cípe mesta Malacky v Bratislavskom kraji západného Slovenska (Obr. 1).

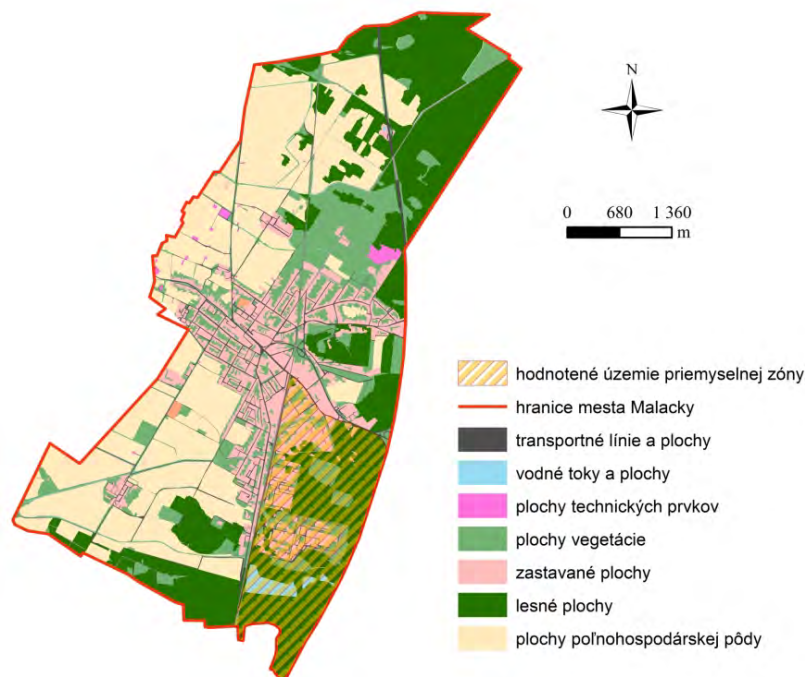


Obr. 1 Lokalizácia mesta Malacky v rámci Slovenskej republiky

V posledných rokoch sa krajina v tomto území radikálne mení dôsledkom budovania priemyselných prevádzok výroby a skladovania. Vývoj krajiny juhovýchodnej zóny mesta bol sledovaný prostredníctvom jej základných štruktúrnych prvkov stanovených v programe ArcView 9.3 na podklade ortofotomáp z rokov 2002, 2007 a 2010, kedy tu bol zaznamenaný najmarkantnejší priemyselný vývoj. Hranice skúmaného územia boli ohraničené existujúcimi dopravnými ťahmi, tzn. z východu diaľnicou D2 a zo západu železničnou traťou Devínska Nová Ves – Kúty. Pri hodnotení bola vzatá do úvahy i tretia priemyselná zóna parku Záhorie Eurovally Vasková, ktorá bola dominantne určená na účely rekreácie a športu (Obr. 2).

Vytvorením vektorových vrstiev pre jednotlivé štruktúrne prvky krajiny bol identifikovaný ich plošný rozsah. Následnou komparáciou získaných dát boli odvodené charakteristiky pre analýzu zmien krajiny a finálne determinované hlavné priestorové zmeny v priemyselnej zóne za sledované časové obdobie. Z hľadiska zhodnotenia dynamiky krajiny v tomto krátkodobom horizonte boli konfrontované najvýznamnejšie štruktúrne prvky

z hľadiska rozsahu ich zmien s primárnou krajinou štruktúrou územia.



Obr. 2 Lokalizácie priemyselnej zóny Malacky – juh a Vasková v rámci mesta Malacky

Vykonaná kvantifikácia plošného zastúpenia prvkov využitia zeme bola podkladom aj pre zhodnotenie zmien ekologickej stability územia. Vyhodnotenie ekologickej stability bolo vykonané využitím metódy stanovenia koeficientu ekologickej stability [8], ktorej východiskovými údajmi sú konkrétne priestorové rozlohy prvkov využitia zeme (p_i), rozlohy hodnoteného areálu (p) a informácia o ich ekologickej významnosti (S_i):

$$KES = \sum p_i \cdot S_i / p \quad [I.]$$

Výsledky a diskusia

Mesto Malacky je situované na západnom Slovensku uprostred Záhorskej nížiny. Toto okresné mesto je nielen významným administratívnym strediskom regiónu, ale predstavuje i dôležitý transportný uzol. Práve výhodná poloha Malaciek ležiacich v blízkosti hlavného mesta SR Bratislavy a hraníc s Českou, Rakúskou a Maďarskou republikou sú hlavnými dôvodmi jeho významného postavenia z hľadiska hospodárskeho rozvoja západného Slovenska.

V posledných rokoch je v Malackách možné badať značný nárast hospodárskych aktivít. V dôsledku procesu industrializácie sa zvýšil počet priemyselných a technizovaných areálov v katastrálnom území mesta, ktoré kopíruje súčasný trend realizácie veľkých priemyselných komplexov na okraji sídel. Priemysel predstavuje v súčasnosti odvetvie

s najvyššou zamestnanosťou v okrese, pričom momentálne najvýznamnejšou v meste je lokalita Malacky – juh nachádzajúca sa na juhovýchodnom okraji katastrálneho územia. Lokalita tvorí jednu z rozvojových zón najväčšieho priemyselného parku okresu Záhorie Eurovally. Funkčná štruktúra priemyselnej zóny je v súčasnosti tvorená prevádzkami výroby, stavebníctva a skladového hospodárstva. V južnej časti priemyselnej zóny určenej na rekreáciu bol predložený zámer vybudovania golfového ihriska. Najvýznamnejšími spoločnosťami pôsobiacimi v zóne s najvyššou mierou zamestnanosti a podielu na hospodárskom rozvoji sú spoločnosti Swedwood, s.r.o., Tower Automotive, a.s., Skylife, s.r.o., Zinkovňa Schafy, s.r.o. [9].

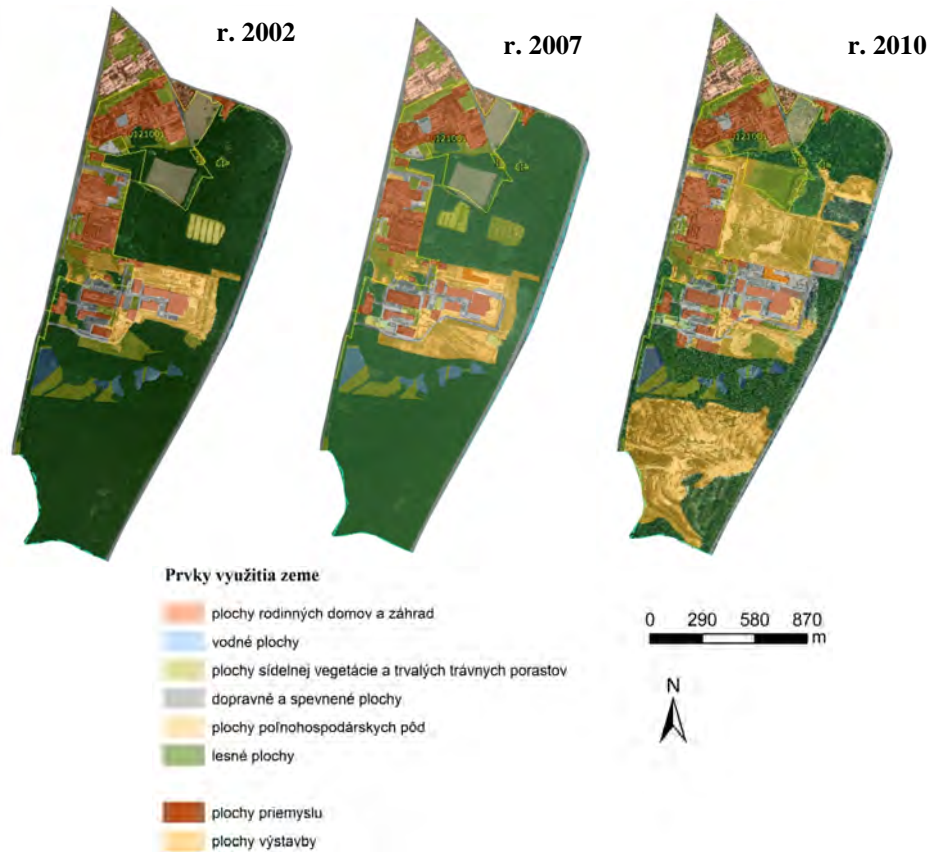
Hodnotená lokalita je zaujímavá svojou polohou na Borskej nížine v blízkosti Malých Karpát. Z hľadiska primárnej štruktúry krajiny sú v území dôležité predovšetkým rybníky Marheček, kde sa zachovali zvyšky slatinných jelšových porastov a ornitologicky cenné lokality. Marhečké rybníky sú biocentrom miestneho významu, od roku 2009 chráneným areálom a tiež súčasťou siete Natura 2000 ako územie európskeho významu SKUEV0121 [10]. Juhozápadný okraj skúmaného územia tvorili v minulosti karpatské a panónske dubovo-hrabové lesy susedného vojenského obvodu Záhorie, o ktoré boli z hľadiska potrieb rozvoja v roku 2002 rozšírené administratívne hranice mesta Malacky.

V sledovaných rokoch 2002 až 2010 zaznamenala juhovýchodná časť mesta rozsiahle štruktúrne zmeny, ktoré nastali predovšetkým v dôsledku úbytku plošného zastúpenia lesného porastu na úkor nárastu plôch priemyslu, vybudovaním doplnkových dopravných línií a spevnených plôch (Tab. 1).

Tab. 1 Zmeny plošného zastúpenia jednotlivých prvkov využitia zeme v území za roky 2002, 2007 a 2010

Prvky využitia zeme	rok	rozloha (ha)	rozloha (%)	rok	rozloha (ha)	rozloha (%)	rok	rozloha (ha)	rozloha (%)
dopravné a spevnené plochy	2002	40,5472	9,4	2007	44,0281	10,21	2010	52,7962	12,24
plochy priemyslu	2002	44,7792	10,38	2007	45,522	10,55	2010	49,9535	11,58
plochy výstavby	2002	27,6353	6,41	2007	41,0435	9,52	2010	138,937	32,21
plochy poľnohospodársky pôd	2002	13,9183	3,23	2007	13,9183	3,23	2010	6,3212	1,47
plochy rodinných domov a záhrad	2002	11,7286	2,72	2007	11,7286	2,72	2010	11,7286	2,72
plochy sídelnej vegetácie a TTP	2002	43,4651	10,08	2007	44,5619	10,33	2010	48,5173	11,25
lesné plochy	2002	242,443	56,21	2007	223,7143	51,87	2010	116,2629	26,96
vodné plochy	2002	6,8339	1,57	2007	6,8339	1,57	2010	6,8339	1,57

Práve v rokoch 2002 až 2010 bol rozvoj lokality najvýraznejší, pričom najväčšie zmeny krajiny nastali v rozmedzí rokov 2007 až 2010 (Obr. 3). Sumárne bolo odlesnených 126,18 ha lesných porastov s cieľom nového funkčného využitia pre priemyselnú výrobu a skladovanie a na rozvoj doplnkových rekreačných aktivít pričom zarátané sú i plochy aktuálne prebiehajúcej výstavby za týmto účelom. Tá v roku 2010 dosiahla nárast rozlohy o 111,30 ha.



Obr. 3 Kartografické zobrazenie vývoja južnej priemyselnej zóny Malaciek v rokoch 2002, 2007 a 2010

Vplyvy na stabilitu miestnej krajiny boli vyhodnotené využitím koeficientu ekologickej stability [8], pričom sa prihliadalo i na ekologickú významnosť hodnotených prvkov využitia zeme. Koeficient ekologickej stability miestnej krajiny v roku 2002 dosahoval hodnotu 2,2876 (krajina so strednou stabilitou), v roku 2007 sa znížil na 1,9176 (krajina s nízkou stabilitou) a v roku 2010 klesol na hodnotu 1,1534 (krajina s veľmi nízkou stabilitou), čo predstavuje takmer polovičnú hodnotu stability územia v prvom roku. Takéto výrazné zníženie hodnôt ekologickej stability krajiny je predovšetkým výsledkom úbytku lesných porastov. Vzniknuté zmeny krajiny predstavujú v lokalite úbytok ekologicky významných prvkov krajinej štruktúry územia a ich pretvorenie na plochy industrializované s prevahou prvkov výrobných a skladových hál a prvkov dopravnej infraštruktúry.

Záver

Skúmané územie na Záhorskej nížine v územnom pláne mesta Malacky vyčlenili na realizáciu priemyselných zámerov. Lokalizačnými kritériami boli blízkosť železničnej trate so stanicou, dobrá dopravná dostupnosť, disponibilita plôch, vybudovaná technická infraštruktúra a možnosť väzby na už existujúce prevádzky, možnosť rozšírenia hraníc mesta

odčlenením územia vojenského obvodu Záhorie a tiež poloha vzhľadom na prírodné danosti [9]. Napriek starostlivému vyčleňovaniu lokalít, hranicu priemyselných zón Malacky – juh a Vasková tvoria pre krajinu ekologicky veľmi významné Marhecké rybníky. Práve rozsiahle zmeny v tomto území spôsobené jeho industrializáciou majú za následok prudké znižovanie ekologickej stability krajiny, čo môže veľmi negatívne ovplyvniť biotopy a rastlinné a živočíšne druhy tohto chráneného územia. Z tohto dôvodu je potrebné prijať špecifické manažmentové opatrenia, ktoré budú znamenať zachovanie ekologickej hodnoty zvyšných významných lokalít v južnej časti mesta.

PodĎakovanie

Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Centrum pre rozvoj sídelnej infraštruktúry znalostnej ekonomiky, ITMS 26240120002, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja (100 %).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Zákon NR SR č. 127/1994 Z.z. o posudzovaní vplyvov na životné prostredie v znení neskorších predpisov
- [2] Zákon NR SR č. 193/2001 Z.z. o podpore na zriadenie priemyselných parkov a o doplnení zákona NR SR č. 180/1995 Z.z. o niektorých opatreniach na usporiadanie vlastníctva k pozemkom v znení neskorších predpisov
- [3] Zákon NR SR č. 24/2006 Z.z. o posudzovaní vplyvov na životné prostredie a o zmene a doplnení niektorých zákonov v znení neskorších predpisov
- [4] Kiseľáková, D., Kiseľák, A. (2009) Zborník vedeckých prác katedry ekonómie a ekonomiky ANNO 2009, Prešovská Univerzita v Prešove, s. 128
- [5] MŽP SR (2002) Štúdie pre umiestnenia priemyselných parkov vo vybraných oblastiach Slovenskej republiky, Bratislava, s. 13
- [6] Cebecauerová, M. (2007) Analýza a hodnotenie zmien štruktúry krajiny (na príklade časti Borskej nížiny a Malých Karpát), GÚ SAV, Bratislava, s. 15
- [7] Pavličková K., et al. (2009) Posudzovanie vplyvov na životné prostredie, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, s. 57
- [8] Rehačková, T., Pauditšová, E. (2007) Acta Envir. Univ. Comeniana 15(1), s. 33
- [9] Hrdina V. (2004) Územný plán obce mesta Malacky, AUREX, s.r.o., Malacky, s. 40
- [10] ŠOP SR (2013) Štátny zoznam osobitne chránených častí prírody SR

Ekosozologické aspekty v diverzite Thysanoptera Slovenska (konceptia a kritériá IUCN)

Jana Žáková

Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Katedra environmentálnej ekológie, Mlynská dolina, 84215 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: jana.zakova11@gmail.com

Abstract

From the historical point of view, the research of thrips in Slovakia has not been very intensive and detailed. Numerous faunistic data are published sporadically from various sites and biotopes. The best recognized fauna is recorded on the SW of Slovakia, especially nature reserves Jurský Šúr and Devínska Kobyla. A list of threatened thrips species (*Thysanoptera*, *Insecta*) in Slovakia is given with 7 species divided in four categories as a proposal. The criteria (IUCN 3.1 2012) used for classification into particular categories are based on data with the frequency of species occurrence, area of occupancy, fragmentation of sites and presence of their host plant. One species, *Ankothrips flavidus*, was classified as critically endangered, two species *Oxythrips tatricus* and *Ankothrips niezabitoskii* as endangered, three as vulnerable *Megathrips lativentris*, *M. nobilis* a *Rhipidothrips elegans* and one *Iridothrips iridis* belongs to the least concern group.

Kľúčové slová: *Thysanoptera*; ekosozologický status; kategórie IUCN

Úvod

Biologická diverzita na Zemi poníma nesporne niekoľko miliónov druhov, z ktorých zhruba 1 900 000 bolo dodnes oficiálne opísaných. Veľké rezervy, tzv. „biodiversity hotspots“ sú z taxonomického hľadiska najmä v tropických oblastiach. Na druhej strane možno paradoxne považovať za alarmujúci trend úbytku druhovej rozmanitosti, ktorého príčiny okrem prirodzených aspektov zahŕňajú aj antropogénny impakt. Medzi dominantné, evolučne veľmi úspešné skupiny patrí celkom určite aj hmyz (*Insecta*), z hľadiska diverzity reprezentovaný najmä radmi *Coleoptera* či *Hymenoptera*. Druhovo menej diverzifikované rady s menšími zástupcami unikajú veľmi často pozornosti entomológov, obzvlášť v otázke ekosozologickej evaluácie. Osobitne platí toto tvrdenie pre ekonomicky významné druhy, vrátane fytopatogénneho hmyzu (napr. *Thysanoptera*).

Z radu *Thysanoptera* je v súčasnosti na svete opísaných vyše 5500 druhov [7]. Na Slovensku bolo doposiaľ zaznamenaných vyše 180 druhov z podradov *Terebrantia* (125) a *Tubulifera* (55). Z narastajúcou intenzitou výskumu možno predpokladať, že toto číslo zďaleka nie je konečné. V súčasnosti je výskum v tomto zmysle zameraný najmä na maloplošné chránené územia, väčšinou v okolí Bratislavy (Martinský les, Ostrov Kopáč). Dlhodobejšie a syntetickejšie sa pristupuje k štúdiu fauny Devínskej Kobyly a NPR Jurského Šúru, ktoré sú pravdepodobne z hľadiska fauny strapiek najkomplexnejšie prebádanými

oblasťami Slovenska [2].

V porovnaní s inými radmi hmyzu (*Coleoptera*, *Lepidoptera*) sú Thysanoptera z hľadiska ekozozologického statusu len málo prebádané. V historickom kontexte druhovej ochrany na Slovensku ekozozologické „červené zoznamy“ nikdy nezahŕňali žiadneho zástupcu tohto radu, čoho dôvodom bola nízka intenzita thysanopterologického výskumu v našom regióne ako aj fytopatogénny potenciál viacerých karanténnych druhov (napr. *Thrips tabaci*, *Frankliniella occidentalis*).

Materiál a metódy

Tento návrh ekozozologického statusu vybraných druhov Thysanoptera Slovenska korešponduje s aktuálnymi kritériami IUCN (verzia 3.1, 2012) [4]: extinct (EX) – vyhynutý, keď nie je žiadna pochybnosť, že posledný jedinec uhynul, extinct in the wild (EW) – vyhynutý v prírode, prežívanie populácie je známe len v kultivácii, zajatí alebo ako naturalizované populácie mimo pôvodného areálu, critically endangered (CR) – kriticky ohrozený, mimoriadne vysoké riziko vyhynutia vo voľnej prírode, endangered (EN) – ohrozený, veľmi vysoké riziko vyhynutia vo voľnej prírode, vulnerable (VU) – zraniteľný, vysoké riziko vyhynutia vo voľnej prírode, near threatened (NT) – takmer ohrozený, vtedy, keď bol hodnotený pre CR, EN, VU a v súčasnosti tieto kritéria nespĺňa, ale je blízko k ich splneniu a je pravdepodobné, že v blízkej budúcnosti bude zaradený do niektorej kategórie ohrozenia, least concern (LC) – menej dotknutý (nespĺňa pôvodne navrhovaný status CR, EN, VU a NT) a data deficient (DD) – nedostatočne známy, kedy o druhu existuje málo informácií.

Výsledky a diskusia

Zo 181 druhov strapiek zaznamenaných na Slovensku možno predbežne navrhnúť 7 v rámci kategórií: CR (1), EN (2), VU (3), LC (1) uvedených v tabuľke 1 v kontexte blízkych európskych krajín.

Podmienky kategórie CR spĺňa druh *Ankothrips flavidus*, so zatiaľ endemickým výskytom na území Slovenska, opísaný v Kameníne v slaniskovej vegetácii [11]. Zur Strassen [19] ho prezentuje ako nález „stále jediný“.

Do kategórie ohrozený (EN) bol predbežne zaradený *Oxythrips tatricus*, ktorý je viazaný na montánne oblasti pásma kosodreviny, predovšetkým na *Pinus cembra* a *Pinus mugo*, zo Slovenska známy z okolia Batizovského a Velického plesa a Gerlachu [8, 9, 13].

Zur Strassen [19] uvádza jeho výskyt v južnej časti Poľska a v rakúskych Alpách. *Ankothrips niezabitowskii*, oligofág zaznamenaný Pelikánom na *Juniperus communis* na lokalite Hrhov v okolí Štúrova môže byť indikátorom (pre zriedkavý výskyt len v teoretickej rovine) stanovišť, ktoré sú, alebo boli v minulosti ovplyvnené pastvou [2]. Zur Strassen [19] ho zaradil do kategórie LC a Pelikán [1] ako EN. Kucharczyk ho kategorizovala ako druh ohrozený (EN) s pravdepodobnou severnou hranicou výskytu práve v Poľsku, kde boli nájdené 3 nové lokality výskytu v južnej časti NP Roztocze [6]. Do roku 2003 bol druh zaznamenaný iba raz v údolí rieky Poprad v pohorí Beskid Sadecki [5, 14].

Do skupiny zraniteľných druhov (VU) možno navrhnúť *Megathrips lativentris* a *M. nobilis* viazané najmä na hrabanku ekologicky stabilných vyzretých klimaxových štádií lesa s nízkou mierou antropogénneho impaktu (hoci existujú aj nálezy z monokultúr) a *Rhipidothrips elegans* preferujúci lesostepné stanovištia. Druh bol zaznamenaný v Kováčove v nízkych porastoch na svahoch s *Quercion pubescentis* [12]. V porovnaní s dostupnými červenými zoznamami bol jedine *Megathrips lativentris* zaradený ako zraniteľný druh v Poľsku, ktorého výskyt je podmienený prítomnosťou starých stromov v rôznom štádiu rozkladu [6].

Do kategórie LC možno predbežne zaradiť amfíbický druh *Iridothrips iridis*, ktorý je ako foliikol viazaný na *Iris pseudacorus*. Druh bol zaradený do červených zoznamov v Rumunsku (VU) [16], Nemecku (LC) [18] a v Poľsku, kde ho autorka klasifikovala ako druh s frekventovaným výskytom [6].

K hodnoteniu ekososozologického statusu sa na základe dlhodobejšieho výskumu dostávajú niektoré krajiny stredoeurópskeho diapazónu (napr. Nemecko, Rakúsko) [18]. V Nemecku bol červený list vypracovaný dva-krát [17, 15] a v oboch zoznamoch je uvedených 25 druhov (zhruba 11% fauny strapiek Nemecka). Ich kategorizácia bola nasledovná: CR (4), EN (5), VU (2), GR (geographically restricted) (6), LC (6) a DD (2). V Rakúsku bolo zo 198 taxónov vybraných 13 druhov (7 % fauny Rakúska) klasifikovaných do troch kategórií: EX (1), EN (3), VU (10) a R (10) [6].

Skompletizovaním 75 ročného výskumu, ktorý dovolil ohodnotiť reálnu situáciu v diverzite strapiek, bol vypracovaný červený zoznam v Rumunsku [16]. Z 215 druhov strapiek autorka vybrala 24 druhov, ktoré zaradila do kategórií: EX (1), EN (3), VU (10), R (10). Ďalší červený zoznam bol vydaný v Českej Republike Pelikánom [1], ktorý uviedol 3 ohrozené (EN) a 5 zraniteľných (VU) druhov. V Poľsku [5], kde autorka skompletizovala poznatky o faune strapiek vyše 60 ročného výskumu, z 217 druhov vybrala 44 (asi 20% fauny

Poľska), ktoré kategorizovala ako: CR (1), EN (11), VU (9), NT (15) a LC (8).

Tab.1 Zoznam navrhovaných ohrozených druhov strapiek (Thysanoptera) Slovenska v súlade s kritériami IUCN [4] a v kontexte blízkych európskych krajín

Druh	Rumunsko [16]	Česko [1]	Nemecko [15, 17]	Poľsko [5]	Slovensko
<i>Ankothrips flavidus</i>					CR
<i>Ankothrips niezabitoskii</i>		EN	LC	EN	EN
<i>Rhipidothrips elegans</i>					VU
<i>Neohydatothrips abnormis</i>			LC		
<i>Chirothrips molestus</i>		VU	GR**		
<i>Anaphothrips badius</i>				LC	
<i>Aptinothrips karnyi</i>			CR	EN	
<i>Belothrips acuminatus</i>	EN				
<i>Oxythrips priesneri</i>		VU			
<i>Oxythrips tatricus</i>					EN
<i>Prosopothrips vej dovskyi</i>				VU	
<i>Baliothrips dispar</i>	VU				
<i>Iridothrips iridis</i>	VU		LC		LC
<i>Mycterothrips albidicornis</i>				NT	
<i>Thrips dubius</i>				NT	
<i>Thrips fulvipes</i>			LC	NT	
<i>Thrips menyanthidis</i>			EN	VU	
<i>Thrips praetermissus</i>			EN	EN	
<i>Bolothrips bicolor</i>			VU		
<i>Haplothrips acanthoscelis</i>			EN		
<i>Haplothrips crassicornis</i>			GR**	VU	
<i>Haplothrips floricae</i>	R*				
<i>Phlaeothrips annulipes</i>	R*			NT	
<i>Phlaeothrips bispinosus</i>	R*				
<i>Poecilothrips albopictus</i>				NT	
<i>Hoplothrips carpathicus</i>			EN		
<i>Hoplothrips pedicularius</i>				LC	
<i>Liothrips austriacus</i>				EN	
<i>Liothrips pragensis</i>				VU	
<i>Megalothrips bonnani</i>				VU	
<i>Megathrips lativentris</i>				VU	VU
<i>Megathrips nobilis</i>					VU
<i>Lisothrips crassipes</i>	R*			EN	

*R = rare [16]

**GR = geographically restricted [18]

Záver

Strapky ako málo preskúmaná skupina živočíchov sú do červených listov zaraďované skôr sporadicky. Do týchto zoznamov sa dostali napr. v Rakúsku, Nemecku, Rumunsku,

Pol'sku, či v Českej republike. [1, 6, 16, 18]. Ochrana ohrozených druhov strapiek je možná iba na základe ochrany biotopov, ktoré obývajú, alebo ich hostiteľských rastlín (hlavne pre fytofágy), či rozkladajúcej sa drevnej hmoty (pre mnohé fungivorné druhy).

Na záver je nutné podotknúť, že návrh ekososozologického statusu vybraných druhov Thysanoptera je zatiaľ iba v rovine teoretickej a vyžaduje si hlbšiu odbornú diskusiu. Nesporne však ponúka relevantné údaje, ktoré ľahšie preniknú do roviny praktickej ale hlavne racionálnej druhovej ochrany.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Farkač, J., Král, D., Škropík, M. [eds] (2005) Červený seznam ohrozených druhů České republiky. Bezobratlí, Red list of threatened species in the Czech Republic. Invertebrates, Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha, p.138
- [2] Fedor, P., Doričová, M., Masarovič, R. et al. (2012) Strapky (Thysanoptera) Slovenska. Univerzita Komenského v Bratislave vo vydavateľstve UK, p. 184, ISBN: 978-80-223-3316-0
- [3] Fedor, P.J., Sierka, W., Majzlan, O. (2004) Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica, 39 (1 – 2), p. 299
- [4] IUCN (2001) Red list. Categories and Criteria (version 3.1) [citované: 4. marca 2013] http://www.iucnredlist.org/static/categories_criteria_3_1
- [5] Kucharczyk, H. (2006) *Ankothrips niezabitowskii* (Schille, 1910) – rare species of thrips (Insecta: Thysanoptera) in Poland. Wiad. Entomol. 25(2), p. 113
- [6] Kucharczyk, H. (2008) Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica, 43, p. 297
- [7] Mound, L.A. (2002) Revista de biologia Tropical, 50(2), p. 477
- [8] Pelikán, J. (1954) Nové nálezy třásnokřídlych z ČSR. Zool. Entomol. listy, 17, p. 202
- [9] Pelikán, J. (1955) *Oxythrips tatricus* sp. n. neznámý druh třásenky z kosodřeviny. Zool. Entomol. Listy 18, p. 21
- [10] Pelikán, J. (1957) Neue Thysanopterenarten aus der Tschechoslowakei – I. Fol. Zool., 6, p. 52
- [11] Pelikán, J. (1958) Neue Thysanopterenarten aus der Tschechoslowakei – II. Čas. Čs. Spol. Entomol., 55, p. 280
- [12] Pelikán, J. (1961) New species of Thysanoptera from Czechoslovakia – IV. Acta Soc Entomol. Čechoslov., 58, p.60

- [13] Pelikán, J. (1983) Zur Faunistik der Thysanopteren Mitteleuropas. Verh. SIEEC X., Budapest, p. 295
- [14] Schille, F. (1911) Nowe formy przyłżeńców (Thysanopterorum genera et species novae). Spraw. Kom.fizyogr. Kraków, 45, p. 3
- [15] Schliephake, G., zur Strassen, R. (1998) Rote Liste der Fransenflüger (Thysanoptera). Schr.-R. Landsch.-Pflege und Naturschutz, 55, p. 250
- [16] Vasiliu-Oromulu, L. (1998) The red list of extincted, endargered, vulnerable and rare Thysanoptera species from Romanian Fauna (Insecta: Thysanoptera). Entomol. rom., 3, p. 63
- [17] Zur Strassen, R. (1984) Rote Liste der Fransenflüger (Thysanoptera). In: J. Blab, E. Nowak, W. Trautmann, H. Sukopp [eds] (1984) Liste der Gefährdeten Tiere und Pflanzen in der Bundesrepublik Deutschland Deutschland. Naturschutz aktuell, 1, p. 38
- [18] Zur Strassen, R. (1994) Gefährdete Franseflüger-Arten Österreichs (Thysanoptera). In: GEPP, J. [ed] (2004) Rote Listen gefährdeter Tiere Österreichs, Graz, Styria Medien Service, 2, p. 269
- [19] Zur Strassen, R. (2003) Die terebranten Thysanopteren Europas und des Mittelmeer-Gebietes. Goecke and Evers, Keltern, p. 277

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA**



**ŠVK
PriF UK
2013**

SPONZORI

**ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2013
ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV**



Západoslovenská
energetika

Člen skupiny

e-on

ČISTÁ ENERGIA A BIODIVERZITA

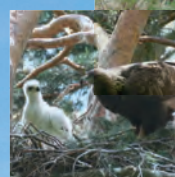
Slovenské elektrárne, člen skupiny Enel, kontinuálne rozvíjajú program Energia pre krajinu, ktorý odráža politiku sociálnej a environmentálnej zodpovednosti spoločnosti. Jeho súčasťou je aj program Energia pre prírodu zastrešujúci aktivity zamerané na ochranu prírody a životného prostredia, vrátane podpory a stabilizácie biodiverzity. V rámci partnerstva s Tatranským národným parkom už Slovenské elektrárne zrealizovali celý rad výnimočných a efektívnych projektov.

Pilotným projektom sa stal v roku 2007 projekt na ochranu kamzíka vrchovského tatranského a svišťa vrchovského tatranského. Postupne pribudli iniciatívy na záchranu sokola sťahovavého a rozšírila sa spolupráca aj v oblasti monitorovania a ochrany dravých vtákov (orol skalný, orol kriklavý) a tatranských šeliem (rys ostrovid, vlk dravý).

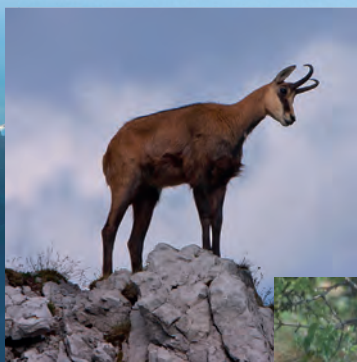
Slovenské elektrárne za projekt „Energia pre krajinu – záchrana najzázračnejších živočíšnych druhov v slovenských pohoriach“ získali cenu European Business Awards for the Environment (EBAE) v Bruseli.



Svišť vrchovský
tatranský



Orol kriklavý



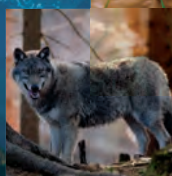
Kamzík vrchovský
tatranský



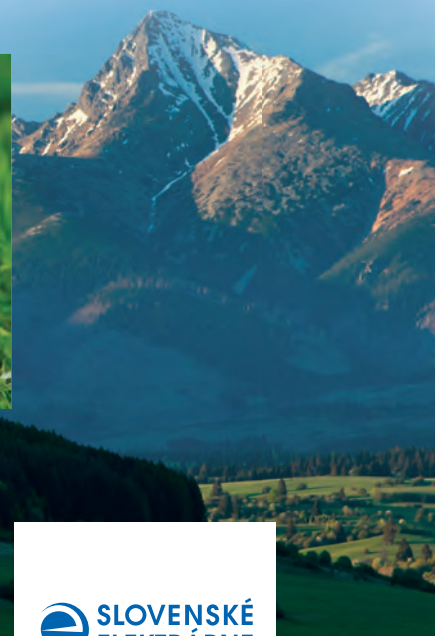
Sokol sťahovavý



Rys ostrovid



Vlk dravý



 SLOVENSKÉ
ELEKTRÁRNE



ENERGIA PRE **PRÍRODU**
ENERGIA PRE KRAJINU

www.seas.sk
energiaprekrajinu.sk



European Business
Awards for the
Environment

partneri: www.spravatanap.sk, www.sopsr.sk, www.lesytanap.sk, www.kst.sk





SLOVENSKÉ JADROVÉ FÓRUM

SLOVAK NUCLEAR FORUM

Slovenské jadrové fórum - SJF - je dobrovoľné občianske združenie, ktoré MV SR zaregistrovalo v auguste roku 2000. **Dňa 20.7.2000 sa uskutočnilo ustanovujúce valné zhromaždenie SJF.** SJF so sídlom združenia je Trnava, Hviezdoslavova 12 PŠČ 917 01, bolo prijaté do európskeho združenia FORATOM.

Cieľ činnosti združenia:

Účelom združenia, vychádzajúc z prísnych požiadaviek na jadrovú bezpečnosť je poskytovanie výsledkov výskumu a iných informácií verejnosti v oblasti mierového využívania jadrovej energie.

Združenie má za cieľ výlučne a bezprostredne verejne prospešné účely. Združenie má právnu subjektivitu.

Aktivity:

Organizovanie konferencií v spolupráci so Slovenskou nukleárnou spoločnosťou SNUS

- Medzinárodné konferencie Secure Energy Supply 2004-2012
- Národná konferencia o slovenskej jadrovej energetike 4.5.2006

Ďalšie aktivity : spolupráca s FORATOM; spolupráca so SNUS; prednášky poslancom NRSR o jadrovej energetike; prezentácia slovenskej energetike na parlamentnom zhromaždení NATO v Bratislave; vydanie knihy „Jadrová elektrárň Mochovce – Ako to bolo – spúšťanie prvého bloku do prevádzky očami účastníkov výstavby“; vydanie knihy „10 dní, ktoré otriasli Slovenskom“; odmeňovanie organizácií a osôb za prínos k rozvoju jadrovej energetiky pamätnou medailou SJF a ďalšie.

Orgány združenia:

Prezídium: Prezident: Ing. Tibor Mikuš, poslanec NRSR a predseda Trnavského samosprávneho kraja

Výkonný viceprezident Ing. Jozef Zlatňanský; **viceprezident:** Ing. Peter Líška

Generálny sekretár: Ing. Karol Bodorik,

Dozorná rada : predseda: Ing. Eduard Strýček; podpredseda: Ing. Ján Bahna CSc;

členovia : Prof. Ing. Jozef Lipka Dr. Sc ; Ing. Alexander Kšiňan; Ing. Vladimír Magula CSc; Ing. Jozef Valach;
Ing. Andrej Hanzel; Ing Michal Merga;

60,000 antibodies, 100% Bioguaranteed.

Sigma® Life Science has *the* antibody
for your research needs.

Find your antibody:

sigma.com/antibodyexplorer

To order, contact:

Sigma-Aldrich Česká republika

Phone: +420 246 003 200

czeorders@sial.com

Sigma-Aldrich Slovensko

Phone: +421 02/555 71 562

svkorders@sial.com

*Experimental results must be submitted via the Antibody Bioguarantee Form within 12 months of the date of purchase. All required fields of the Antibody Bioguarantee Form must be completed. Refunds and replacements contingent to claim review by technical service team. Credit covers the cost of antibody. Product replacements depend on product availability.

©2013 Sigma-Aldrich Co. LLC. All rights reserved. SIGMA and SIGMA-ALDRICH are trademarks of Sigma-Aldrich Co. LLC, registered in the US and other countries. Where bio begins is a trademark of Sigma-Aldrich Co. LLC.

SIGMA-ALDRICH®

SIGMA® *Where bio begins™*
Life Science

sh6314



Nenájdete lepšie riešenie

Predstavujeme Vám prvý CO₂ inkubátor a trepačku New Brunswick v jednom prístroji.

New Brunswick S41i v sebe spája to najlepšie z laboratórnych trepačiek a pokročilú technológiu priameho vyhrievania CO₂ inkubátora pre vytvorenie optimálneho prostredia pre suspenzné bunkové kultúry. Ak požadujete lepší rast buniek, viabilitu a spoľahlivý výkon, prístroj New Brunswick S41i je pre Vás tým najlepším riešením.

- > Vysoko stabilné prostredie pre bezpečný a spoľahlivý rast bunkových kultúr.
- > Zdokonalený dotykový displej poskytuje zreteľné zobrazenie podmienok v inkubátore.
- > Utesnené vnútorné dvere a zdokonalené riadenie znižujú spotrebu plynu a udržiavajú presnú teplotu.
- > Dezinfekcia vysokou teplotou.





Malé Centrum, s.r.o.

Academic Bookshop & Publisher

Resources for Academics and Lecturers



Hľadáte viac informácií
o výukových,
štúdijských a vedeckých materiáloch?

Resources for Students



Odborné informácie
vám umožnia dosiahnuť
preukázateľné výsledky.

Resources for Professionals and Institutions



Profesijný rozvoj je unikátnym
zdrojom poznatkov
pre vašu spoločnosť.

Resources for Libraries



Čitatelia oceňujú výborný
manažment informácií
a ich správne šírenie.

Sídlo firmy
FCHPT STU - 1. poschodie „C”
Radlinského 9, Bratislava
P.O.Box 71/15, 810 05 Bratislava 15
Tel./Fax +421 2 529 311 22; 02 524 964 29
e-mail: admin@malecentrum.sk
www.malecentrum.sk



MALÉ CENTRUM
1726

INTELIGENTNÉ ČÍTANIE



PC REVUE

Časopis o tom, čo sa stane realitou
v oblasti počítačov až zajtra.
Vychádza 12x do roka



INFOWARE

Odborný časopis o IT technológiách
a možnostiach ich využitia.
Vychádza 9x do roka



QUARK

Populárna veda, technika a príroda
pre tých, ktorí objavujú niečo nové.
Vychádza 12x do roka

Ako si objednať predplatné:

- **pošta:** zaslaním objednávkového formulára na tejto strane. Do stĺpca s označením „objednávka“ vyplňte **x** k titulu, ktorý si chcete objednať
- **internet:** vyplnením formulára na webe: www.itnews.sk/tituly/pc-revue/predplatne
- **e-mail:** zaslaním objednávky na predplatne@pcrevue.sk
- **SMS:** poslaním SMS objednávky na č. 0910 945 820
- **TEL.:** telefonicky na číslo 02/4342 0956
- **FAX:** zaslaním objednávky na 02/4342 0958

Nárok na **zľavnené predplatné** majú študenti, dôchodcovia a držiteľia karty Euro<26, ISIC a ITIC.



Po spracovaní objednávky vám zašleme údaje na úhradu za predplatné. Ak budete mať záujem o informácie ohľadom spracovania vašej objednávky, prípadne otázky v súvislosti s dodaním vybraného magazínu, obráťte sa na našu redakciu: **Digital Visions, s. r. o., tel. 02/4342 0956, predplatne@pcrevue.sk**



Virtuálne DVD

- Súčasťou PC REVUE PLUS je aj virtuálne DVD, ktoré prináša množstvo exkluzívneho multimediálneho obsahu. Virtuálne DVD je k dispozícii každému čitateľovi PC REVUE.
- Prístup k nemu je cez internet s ochranným kódom a to odkiaľkoľvek a z ľubovoľného zariadenia. Programy a multimediálny obsah tak budete mať stále k dispozícii.

Adresa vydavateľstva: **Digital Visions, s. r. o., Kladnianska 60, 821 05 Bratislava**

Meno a priezvisko / Firma:

Adresa:

Dňa: Tel. číslo:

Podpis:

Objednávka	PREDPLATNÉ	Ročné	Zľavnené ročné
<input type="checkbox"/>	PC REVUE PLUS	29,90 €	25,00 €
<input type="checkbox"/>	INFOWARE	17,75 €	15,75 €
<input type="checkbox"/>	QUARK	19,92 €	x
<input type="checkbox"/>	ELEKTRONICKÉ PREDPLATNÉ	Polročné	Ročné
<input type="checkbox"/>	PC REVUE a INFOWARE	12,60 €	22,55 €
<input type="checkbox"/>	Predplatné pre Apple iPad	3 mesiace	Polroka
<input type="checkbox"/>	PC REVUE	3,99 €	7,98 €
			1,72 €
			13,99 €

PC REVUE pre Apple iPad je dostupné iba v AppStore

Quark

Magazín o vede a technike

DOBRODRUŽSTVO POZNÁVANIA



Zaujíma vás, prečo je južný chladnejší ako severný?
Čo všetko si môžeme na výlete v prírode natrhať a potom s chuťou zjesť?



Vie byť špinážny malvér užitočný?

Prečo jazdí auto bez šoféra?

Ako vzniká penový hliník?

Odpovede na tieto a iné zaujímavé otázky prináša časopis **Quark**.

Quark, populárny magazín o vede a technike, oslavuje už 19. narodeniny.

Quark je mesačník, jedno číslo stojí 1,89 €. Predplatelia ho majú za zľavnenú cenu 19,92 € alebo za 8,94 € v elektronickej verzii. Nazrieť doň môžete aj na internetovej stránke www.quark.sk. Objednávky predplatného posielajte na adresu: **Quark, Karpatská 7, 811 05 Bratislava**, fax.: **(02) 52 49 97 88**, email: predplatne@perfekt.sk.

Reader's Digest

gis portal .cz



GISportal.cz je internetový magazín, který si klade za cíl přinášet kvalitní, nezávislé a aktuální informace z české i mezinárodní geoinformační scény a reportovat z domácích i zahraničních konferencí. Za dva roky naší činnosti jsme publikovali téměř 900 příspěvků a zaznamenali jsme více než 100 tis. návštěv našich webových stránek www.gisportal.cz

Jako mediální partneři jsme podpořili již dvě desítky konferencí a seminářů (např. GISáček, Študentská vedecká konferencia Pri UK, Konference GIS Esri v ČR, Student GIS Projekt, Geomatika v projektech, Sympozium GIS Ostrava, FOSS4G-CEE, Konference GIVS, ISSS, GIS Day a další).

GISportal.cz je dynamický magazín se stále rostoucí čtenářskou obcí.

Aktivně nás můžete sledovat kromě webových stránek také na sociálních sítích (Facebook – GISportal, Twitter, LinkedIn, G+)

Přidejte se k nám nebo nás přímo kontaktujte:
e-mail: redakce@gisportal.cz
Facebook: [GISportal](https://www.facebook.com/GISportal)
Twitter: [@gisportalcz](https://twitter.com/gisportalcz)

Správy a články o geografických informáciách, systémoch, technológiách a geovedných disciplínach, diskusie, dokumenty, odborné podujatia, fotky a videá zo života slovenských a českých geoinformatikov



GEOINFORMATIKA.sk

Geoinformatika.sk | Komu x
www.geoinformatika.sk



GEOINFORMATIKA.sk

Komunitný portál
používateľov geografických
informácií, systémov a technológií

Registrácia Mapa portálu O nás ▾

Hľadať



Archív Články Diskusie ▾ Dokumenty ▾ Fotky ▾ Kalendár Literatúra ▾ Videá ▾ Spolupráca ▾ Časopis Geografia ▾ Prihlásenie

Z našich fotiek



Odporúčame

- Gisplan
- Google
- Ingrad
- Intergraph
- Open Source
- Trimble



FÓRUM MLADÝCH GEOINFORMATIKOV



Geoportál skupiny ČEZ poskytuje informácie o prúběhu sítí a poloze zariadení

Št, 28/03/2013 - 14:37 | by redakcia



V ledu 2012 bol spustený geoportál skupiny ČEZ, ktorý pracuje i s mapovými podkladmi spoločnosti Central European Data Agency, a.s. (CEDA). S potěšením môžeme konštatovať, že od té doby zvládnuť vyříditi více než 186 tisíc žádostí o vyjádření k existenci sítí.

Fórum mladých geoinformatikov 2013: Predbežný program

Po, 25/03/2013 - 19:36 | by redakcia



FÓRUM MLADÝCH GEOINFORMATIKOV

Organizátor doktorandskej konferencie Fórum mladých geoinformatikov 2013 sa vzhľadom na veľký počet prihlásených príspevkov rozhodol urobiť z nej **dvojdnové vedecké podujatie od 2. do 3. mája**. Pozrite si s nami predbežný program konferencie a autorom pripomíname termín 31. marec na poslanie kompletného príspevku.

Jaroslav Hofierka riaditeľom Ústavu geografie v Košiciach

Po, 25/03/2013 - 00:54 | by redakcia



S účinnosťou od 1. apríla 2013 bol do funkcie riaditeľa Ústavu geografie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach menovaný doc. Mgr. Jaroslav Hofierka, PhD.

FOSS4G-CEE 2013: Pozvánka

So, 23/03/2013 - 17:10 | by Miroslav Ofúkaný



Naši rumunskí partneri pozývajú slovenských a českých priaznivcov slobodného a otvoreného softvéru pre geoinformatiku na stredo-východoeurópsku konferenciu FOSS4G-CEE 2013, ktorá sa uskutoční 17.-19. júna v Bukurešti.

reklama ETARGET

Nailejší leasing pre vás

Len OP a živnostenský list
emailom rýchlo a s dopravou až k vám

Náhradné diely pre Renault

Najväčšie slovenské Renault
vrakovisko. Tu určite nájdete čo hľadáte.

Zarábaj doma 1100 Eur

Práca cez internet a
telefón. Zaškolenie. Firmečná
podpora. Časová sloboda.

Batérie a akumulátory

Veľa druhov na sklade: NiCd,
NiMH, LiIon, LiPol. Poradenstvo
pri výbere.

Heroes of Might and Magic 1-

5
Skladom. Posielame ihneď.
ProGamingShop.sk - obchod pre
profi hráč

[Ďalšie odkazy](#)

RSS partnerov

- Pozrite si na Jednotke novú zábavnú šou Milujem Slovensko
- Profil konferencie iDEME Bratislava 2013
- Veľtrh Národné Dni Kariéry nasmeruje mladých na pracovný trh
- Ako robiť čo **1733** baví a dostať za to zaplatené?

Nadácia Curie

www.curie.sk

Správy a články o Vašich vedeckých výsledkoch, pozvánky a plagáty na odborné podujatia, fotky a videá môžete publikovať na

PROMO SPRAVY.sk

Propagačný portál slovenského internetu

Veda | PROMOSPRAVY.sk x

promospravy.sk/veda

Foto Kalendár Plagáty Pozvánky PR články Tlačové správy Video

streda 3. apríl

PROMO SPRAVY.sk Propagačný portál slovenského internetu pre vaše tlačové správy, PR články, pozvánky, plagáty, fotky a videá

Hľadať

Automoto Bývanie Cestovanie Ekonomika Kultúra Politika Služby Šport Technika **Veda** Zdravie Ostatné

Domov

Veda

Pozvánka na Študentskú vedeckú konferenciu Prírodovedeckej fakulty UK 2013

Publikoval *Redakcia*, 3. marec 2013

Tohtoročná Študentská vedecká konferencia Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave sa bude konať 24. apríla 2013. Viac informácií sa dozviete v [tlačovej správe](#).

[Čítať viac](#)

Študentská vedecká konferencia Prírodovedeckej fakulty UK 2013

Publikoval *Redakcia*, 3. marec 2013

Tohtoročná Študentská vedecká konferencia Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave (ŠVK PríF UK) sa bude konať 24. apríla 2013. Cieľom podujatia je poskytnúť študentom z rôznych, domácich a zahraničných univerzít príležitosť verejne prezentovať výsledky svojej vedeckej práce. Výstupom podujatia so zahraničnou účasťou bude recenzovaný zborník plnotextových príspevkov s ISBN, ktorý dostane každý aktívny účastník konferencie.

[Čítať viac](#)

Pätnásť ročník Festivalu vedy a techniky zanechal silné emócie

Publikoval *Ofukany*, 21. november 2012

Tohtoročný Festival vedy a techniky sa uskutočnil v priestoroch Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského počas Týždňa vedy v dňoch 8. – 10. november 2012. Súťažnú prehliadku vedecko-technických prác žiakov stredných a základných škôl, zorganizovala asociácia AMAVET za pomoci mnohých partnerov a priateľov, za čo im patrí veľké ĎAKUJEM.

[Čítať viac](#)

reklama ETARGET

Dr.Oz Jednodňová diéta

Hovorí jej diéta hollywoodu, ktorá ničí brušný tuk ako nič iné predtým!

Kúpa auta v zahraničí?

Už netreba! Kúpte si nové doma. Kúpte si svoju Mazdu doma.

Máme Super Kurzy

Štvrtfinále Ligy majstrov! Stavte si na futbalové hviezdy

Schudni 3-5 kg/mes. Určite

Vieme ako na kilá i tukové vankúšky a to zdravo, bez námahy a navždy.

Svaly ako z Hollywoodu

Chcete vyzerat' ako akčný hrdina? Poznáme tajomstvo celebrit a ich svalov

[Ďalšie odkazy](#)

Nadchádzajúce udalosti

- Dni indonézskeho filmu
8 dní
- Leica Tour 2013
8 dní
- Leica Tour 2013
1 týždeň
- Inner Winner Slovensko 2013
1 týždeň
- Leica Tour 2013
1 týždeň
- Dni indonézskeho filmu
1 týždeň
- Dni indonézskeho filmu
2 týždne
- Študentská vedecká konferencia Prírodovedeckej fakulty UK 2013

1733

GASTRO

L I N E

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA



ŠVK
PriF UK
2013

REGISTER PRÍSPEVKOV

ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2013
ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV

REGISTER PRÍSPEVKOV

Lucia Achbergerová - Evolučne staré enzýmy polyfosfátkinázy	9
Jana Ambrušová - Vplyv rotačného svetelného režimu používaného pri práci na smeny s fázovými posunmi smerom dopredu na expresiu hodinových génov per2 a bmal1 v srdci potkana	13
Lucia Ančicová - Sledovanie vplyvu herpetickej, chrípkovej a zmiešanej infekcie na vybrané parametre bunkovej a humorálnej imunity	18
Martin Babič - Analýza proteín-DNA interakcií v procese replikácie plazmidovej DNA	24
Martin Babič - Klonovanie, expresia a charakterizácia DnaB proteínu z octových baktérií	29
Dominika Balážiová - DNA analýza génov zodpovedných za familiárnu hypercholesterolémiu (LDLR, ApoB-100 a PCSK9) u slovenských pacientov	35
Terézia Balážová - Vývinové štádiá nostokálnej cyanobaktérie Rivularia haematites tvoriacej stromatolity v Šujskom rašelinisku v Rajeckej doline	41
Branislav Bednár - Identifikácia promótorov a expresia vybraných neuropeptidov priadky morušovej	445
Gábor Beke - Matematický model interakcie bakteriofág-baktéria	53
Eva Bíliková - Optimalizácia procesu transformácie a regenerácie transgénnych rastlín z listových explantátov Drosera rotundifolia L.	59
Silvia Bittnerová - Rozšírenie a variabilita spoločenstiev zväzu Vaccinium myrtilli na území Krivánskej Malej Fatry a Oravských Beskýd	65
Daniela Blahutová - Agresívne správanie samcov línií prepelíc japonských selektovaných na vysoký a nízky obsah testosterónu v žltku	71
Csaba Bognár - Analýza mutácií v alfa-synukleínovom géne (SNCA) u slovenských pacientov postihnutých Parkinsonovou chorobou	76
Lenka Briatková - Legius syndróm- identifikácia prevalencie mutácií v SPRED1 géne v slovenskej populácii	82
Juraj Bugala - Štúdium interakcií DnaA proteínu s vybranými iniciačnými proteínmi v procese iniciácie replikácie v bunkách octových baktérií	87
Oldrich Černý - Zmeny dennej aktivity u druhu Romanogobio vladykovi (Fang 1943) na riekach východného Slovenska (predbežné výsledky)	93
Iveta Červenková - Optimalizácia metód pre transgenézu priadky morušovej, Bombyx mori	99
Barbora Chattová - A preliminary study on diversity and ecology of soil diatoms in urban habitats	105

Barbora Chattová - 12 new species of the genus <i>Pinnularia</i> (Bacillariophyta) on Ile Amsterdam (TAAF, Southern Indian Ocean)	111
Lenka Chodáková - Porovnanie účinku kvercetínu a jeho komplexov s hliníkom vo vybraných systémoch	117
Martin Chudík - Prenatálny vplyv kyseliny valproovej na expresiu génov, kódujúcich GAD 65 a GAD 67 v prefrontálnom kortexe mozgu potkana.....	123
Michal Chvostáč - Ekológia <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato a <i>Anaplasma phagocytophilum</i> v modelovom urbánom ohnisku	129
Daniel Čižmár - Molekulové mechanizmy neuroendokrinnnej regulácie správania a vývinu hmyzu	134
Zsófia Csáky - Druhovú identifikáciu akvatických izolátov <i>Enterobacter cloacae</i> molekulárno-biologickými metódami a stanovenie ich citlivosti na vybrané antimikrobiálne látky	140
Hana Čuláková - Vplyv delécie génu PDR16 na susceptibilitu patogénnych kvasiniek <i>Candida glabrata</i> a akumuláciu xenobiotík	146
Petra Cupperová - Vplyv monoklonovej protilátky IVA-50 (anti-CD9) na väzbu spermií na zonu pellucidu oocytov hovädzieho dobytku	152
Kristína Doležalová - Effect of activated fibroblasts on proliferation and phenotype of B leukemic cell lines	158
Zuzana Drongová - Zmena hydrologických parametrov pôdy pod vplyvom rastu biologickej pôdnej krusty	164
Eva Drozdíková - Vplyv mutácie <i>pgs1</i> na zloženie bunkovej steny kvasiniek <i>Kluyveromyces lactis</i>	168
Matúš Durdík - Vplyv mikrovlnného a ionizačného žiarenia na tvorbu DNA opravných fokusov v lymfocytoch z pupočníkovej krvi.....	173
Helena Fábryová - Impact and fate of fetal DNA in mouse and its implication to research concerning preeclampsia	179
Eva Farkašová - Potravné správanie lariev obojživelníkov	183
Soňa Fekečová - Výber a optimalizácia najvhodnejšej metódy na extrakciu proteínov zrna pšenice (<i>Triticum aestivum</i>)	189
Jana Feraszová - Kvantitatívna analýza génovej expície apoptózy nenádorových buniek indukovaná fotoaktivovaným hypericínom.....	194
Jana Feraszová - Apoptóza nádorových buniek indukovaná fotoaktivovaným hypericínom	199
Lucia Fiačanová - Príprava glykokonjugátu z manooligosacharidu a proteínu ako potenciálnej antifungálnej vakcíny	205
Michala Gáriková - Sledovanie antioxidačného účinku extraktu z <i>Armoracia rusticana</i> pomocou metód DPPH assay a Reducing power assay	211

Beáta Gajdošechová - Stanovenie výskytu génových fúzií v bunkách pupečníkovej krvi	217
Terézia Gálusová - Vývin morfológických znakov počas vegetačného obdobia pri druhoch z rodu <i>Mentha</i>	223
Lucia Gavulová - Increased bacterial persistence in <i>Escherichia coli</i> under selective pressure	229
Tomáš Grivalský - Biodegradačné účinky termofilných a termotolerantných baktérií z vodného prostredia	234
Jana Hlinková - Influence of NGF on CaV1.2 and CaV1.3 voltage-dependent calcium channels in rat pheochromocytoma cells.....	240
Viera Holíková - Hostiteľská špecificita bakteriofágov infikujúcich kmene <i>Cronobacter</i> spp.	245
Katarína Hollá - Vybrané populačné charakteristiky <i>Microtus oeconomus</i> mehelyi (Éhik, 1928) a jeho postavenie v synúziách	251
Diana Hopková - Príprava klonov <i>Pichia pastoris</i> schopných produkovať ľudský rastový hormón	257
Kristína Hôrková - Hypotéza alternatívnych ontogénéz a invázneho potenciálu na príklade býčka čierouústeho <i>Neogobius melanostomus</i>	263
Júlia Hunková - Využitie vírusu šarky slivky na tranzientnú expresiu cudzorodých génov v <i>Nicotiana bethamiana</i>	269
Petronela Imreová - Štúdium genotoxického a antimutagénneho účinku hyperforínu.....	274
Ol'ga Janíčková - Testovanie vplyvu Isoprinosinu na replikáciu myšacieho lymfotropného gamaherpesvírusu (MHV-68) a na proliferáciu myšacích nádorových buniek.....	280
Katarína Janšáková - Analýza markerov oxidačného stresu a mikroflóry v slinách pacientov s periodontitídou	286
Jana Jarčušková - Antivírusový účinok kynurénových kyselín (KYNA) na in vitro replikáciu myšacieho herpetického vírusu MuHV-4	292
Katarína Jašková - Role of calcium transporters in the process of neurodegeneration.....	298
Kristína Jiríčková - Produkcia ľahkého reťazca ľudskej enterokinázy v metylotrofnej kvasinke <i>Pichia pastoris</i>	304
Lenka Jurčišinová - Kvantitatívna analýza biologického materiálu na forenzné účely.....	310
Michal Jurík - Izolácia a charakterizácia kmeňových buniek z tukového tkaniva	316

Katarína Juríková - Characterization of telomere-binding properties of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in non-conventional yeast <i>Yarrowia lipolytica</i>	322
Katarína Juríková - Orphan gene detection in yeast.....	328
Erik Kerekeš - Test abortivity peľu natívnej flóry a <i>Tradescantia</i> MCN test v dlhodobej fytoindikácii zmien ekogenotoxickej záťaže v Horných Opatovciach.....	334
Petra Kmeťová - Neobvyklé fyzikálno-chemické vlastnosti rastového faktora asociovaného s myším herpetickým vírusom (MHV-68)	339
Ján Kočišek - Mapovanie a ochrana zástupcov radu Lepidoptera skupiny Rhopalocera na Kysuciach	344
Lenka Koptašiková - Anticancer and antiproliferative effects of atranorin on mammary cancer 4T1 and normal NMuMG cells.....	349
Lucia Kotlárová - Fúzogénna aktivita ako faktor ovplyvňujúci pandemický potenciál vírusu chrípky	355
Daniela Kramárová - Somatometria slovenských vysokoškolských študentiek z PriF UK v Bratislave.....	361
Eva Krascenitsova - Local-scale genetic structure in the spruce bark beetle, <i>Ips typographus</i> L. (Curculionidae, Scolytinae) in Carpathian Mountains.....	367
Miroslav Krausko - Mäsožravosť rastlín – výhoda v prostredí s nedostatkom živín.....	373
Jakub Križák - Expresia Cx40 počas zápalu v aorte normotenzného potkana vo fáze subakútneho zápalu	379
Ivona Kubalová - Porovnanie antioxidantnej aktivity resveratrolu a jeho imínových analógov	385
Monika Kudrnová - Rozsivky jako indikátor kvality vody v řece Rokytné – předběžná studie.....	391
Eva Kurilová - Heterologická expresia génu CgPDR16 v nepatogénnych kvasinkách	396
Veronika Lachová - Sledovanie vplyvu potencionálnych rastových faktorov asociovaných s MHV na replikáciu vírusu chrípky typu A.....	402
Jozef Lacko - Kvalitatívno-kvantitatívna charakteristika ornitocenóz alúvia stredného toku Váhu (Piešťany - Nové Mesto nad Váhom)	408
Andrej Lackovič - Transport a translokácia kadmia v rastline s kontraktílnymi koreňmi.....	414
Lucia Lapínová - Influence of different culture condition on store-operated calcium entry and membrane potential in HT22 hippocampal neuronal cell line.....	419

Barbora Lapuníková - Diferenciálna diagnostika zmiešaných herpetických infekcií v klinických materiáloch	425
Lucia Lichvárová - L-type calcium channels isoformes during neurogenesis of PC12 cells.....	431
Lucia Lichvárová - Štúdia vplyvu metanolu a etanolu na T-tyt vápnikových kanálov	436
Denis Líška - Odvodenie kalusovej kultúry zástupcov dvojkľúčolistových a jednokľúčolistových rastlín v podmienkach in vitro.....	441
Dušan Loderer - Sledovanie potenciálnych bioprotektívnych účinkov emodínu	446
Katarína Lopušná - Nová stabilná bunková línia exprimujúca interleukín-29 Vero/IL-29 ako nástroj na štúdium antivírusového účinku IL-29 voči herpetickým vírusom.....	452
Kristína Lukáčová - Chronické podávanie syntetických analógov pre dopamínové D3 receptory ovplyvňuje regeneráciu mozgu a správanie zebričky červenozobej (Taeniopygia guttata) po striatálnom poškodení.....	458
Jana Makroczyová - Asymmetric cell division in Bacillus subtilis	464
Radka Matúšková - Charakterizácia replikačného proteínu gp41 koryneféaga BFK20.....	470
Lucie Mečířová - Effect of silver ions on oxidative stress in zebra fish hepatoma cell line.....	476
Lívia Medžová - Lytická aktivita endolyzínu bakterioféaga phiBP	480
Judita Mezovská - Genetické determinanty rezistencie voči erytromycínu u potravinových a klinických izolátov Staphylococcus spp.	486
Veronika Michalcová - Stanovenie divergencie divorastúcich a domestikovaných taxónov pšenice pomocou indexu fixácie (FST)	492
Soňa Michlíková - Activity of plasma membrane redox system after growth stimulation.....	498
Ján Miškovic - Travinno-bylinné spoločenstvá zo zväzov Cirsio-Brachypodium pinnati Hadač et Klika ex Klika 1951 a Geranion sanguinei Tüxen in Müller 1962 na Devínskej Kobyle (JZ Slovensko) na troch lokalitách mimo územia národnej prírodnej rezervácie	503
Miroslava Mokošáková - Hodnotenie posturálnej stability žien počas dňa	509
Veronika Mrázová - Neproduktívna infekcia myšacieho herpetického vírusu MHV-68 in vitro.....	515
Nina Noskovičová - The effect of carbon sources on upstream regulatory regions controlling the expression of the Candida utilis α -glucosidase gene	520

Lucia Olexová - Sociálne správanie VPA potkanov – animálneho modelu autizmu.....	526
Barbora Onderová - Molekulárna genetika ochorenia Chronická myeloická leukémia.....	532
Elena Ondrisková - Vplyv laktátu sodného ako signálnej molekuly na expresiu a funkciu CA IX.....	538
Lenka Pačutová - Localization of VP1 in pancreas of infected mice	544
Zuzana Panáková - Vplyv zvýšenej hladiny angiotenzínu II na materské správanie samíc potkana laboratórneho.....	550
Soňa Pastorková - Vplyv zinku na <i>Rumex crispus</i> L., rastlinu využívanú v tradičnej juhoafrickej medicíne	556
Csilla Patasi - Vplyv Elm1 proteín kinázy na kvasinkový septínový komplex...	561
Andrea Perrone - Drug combination study on histone deacetylase inhibitors and hypericin-mediated photodynamic therapy.	567
Barbora Petrušková - Porovnanie hypofrakcionálnych ožarovacích protokolov používaných v liečbe karcinómu prostaty pomocou externej rádioterapie.....	573
Ružena Pilišiová - Detekcia glukán-špecifických a G9-BSA špecifických protilátok u imunizovaných Balb/c myší	578
Terézia Pošiváková - Sledované hematologické parametre v procese starnutia u koní plemena Nonius.....	584
Lenka Raabová - Niektoré zaujímavé terestrické riasy zátoky Petuniabukta na Svalbarde, Arktída	590
Matej Remenár - Izolácia bakteriálneho spoločenstva z pôdy znečistenej ťažkými kovmi pomocou difúznej komory	596
Alena Rendeková - Nepôvodné druhy v synantropnej vegetácii Bratislavy	602
Peter Rózsa - Molekulárna charakterizácia metilín rezistentných <i>Staphylococcus epidermidis</i> izolovaných z bryndze	608
Andrea Rúfusová - Biologické a ekologické vlastnosti spoločenstva podeniiek a pošvatiek ako indikátor využitia riečnej krajiny.....	613
Nikola Rybáriková - The evaluation of morphological variability of selected members of Geoglossaceae (Ascomycota).....	618
Zita Rydzyková - Zmeny ruderalnej vegetácie po 50 rokoch v Doline Siedmich prameňov	623
Magdaléna Šafářová - Změny společenstev fytoENTOSU řeky Dřevnice – hodnocení ekologického stavu v prostoru a čase	629
Simona Saksonová - Testovanie účinku nízkoteplotnej plazmy na DNA v jadrách <i>P. sativum</i> L. pomocou Comet assay.	635

Balázs Sallay - Baktérie prítomné pri výrobe vína v Malokarpatskej vinohradníckej oblasti	641
Soňa Šarmírová - Comparison of the oral and intraperitoneal routes of infection with coxsackievirus B3 using recombinant virus vector	645
Lukáš Šebest - Analýza ľudskej mitochondriálnej aDNA z archeologického materiálu.....	649
Peter Seč - Vplyv lipidových partikul na sekréciu mastných kyselín v kvasinke <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	655
Mária Šedivá - Analýza obsahu antimikrobiálneho peptidu v materských kašičkách	661
Darina Šedovičová - Posouzení transpozice musculus tibialis posterior na základě matematické simulace chůze	665
Tomáš Senko - Vplyv prenatálne a perinatálne navodenej hypertenzie na anxiétu a habituáciu laboratórneho potkana v období po odstave, v puberte a dospelosti – predbežná štúdia	671
Aneta Šidíková - Štúdium významu metabolickej dráhy syntézy tetrapyrolov v procese vybiel'ovania euglén	677
Lenka Šimková - Rozdiely v bielkovinovom obraze kľúčnych rastlín kukurice (<i>Zea mays</i> L.) v podmienkach zasolenia, pod vplyvom kremíka a zinku	682
Darina Šípošová - Molekulárna a morfológická analýza podeniék (Ephemeroptera: Leptophlebiidae: Atalophlebiinae) z Venezuely.....	688
Elena Školníková - Rezistencia na antihelmintiká u <i>Haemonchus contortus</i> – rozdiel v in vitro odpovedi pri experimentálnej infekcii oviec a kôz	694
Lucia Škorvanová - Detekcia interferónov typu I a typu III v pľúcach Balb/c myší.....	700
Eva Šliková - Príprava produkčného kmeňa na produkciu rekombinantného pretrombínu-2 s afinitným His-tagom na N-terminálnom konci proteínu.....	706
Martina Šnegoňová - Príprava a analýza cDNA z miRNA-21 pre použitie v kapilárnej izotachoforéze malých nukleových kyselín.....	712
Dorota Šoltésová - Expresia hodinových génov <i>per2</i> , <i>clock</i> a <i>npas2</i> a glukózových transportérov v tkanivách chránených a nechránených hematoencefalickou bariérou u kontrolných a diabetických potkanov.....	718
Milan Soukup - Vizualizácia kremičitanových depozitov v <i>Sorghum bicolor</i> L. prostredníctvom fluorescenčnej mikroskopie.....	724
Michaela Špalková - Pôsobenie nízkych dávok ionizujúceho žiarenia, azoxystrobinu a vybraných ťažkých kovov na modelový organizmus druhu <i>Artemia franciscana</i>	729

Ján Štetka - P-glycoprotein expression patterns in L1210 cells after all-trans retinoic acid and 9-cis retinoic acid treatment suggest involvement of post-transcriptional regulation	735
Tibor Stolárik - Vplyv nízkoteplotnej plazmy na vybrané biologické parametre hrachu siateho (<i>Pisum sativum</i> L.).....	741
Milan Surový - Analýza kandidátneho génu SCN1A u slovenských pacientov s Dravetovým syndrómom.....	747
Petra Švančarová - Inhibícia replikácie vírusu chrípky v BALB/c myšiach pomocou siRNA namierených voči NS génu	752
Marianna Švancárová - Veľkosť kremičitanových fytolitov tvorených v rastlinách sa dá cielene ovplyvniť pomocou kadmia	758
Pavel Svitok - Vplyv zvýšeného príjmu soli v skorých ontogenetických štádiach vývinu na kardiovaskulárne charakteristiky potkanov	762
Kristína Švolíková - Nezvyčajne vysoká plodnosť v bulharských populáciách hrúzovca sieťovaného <i>Pseudorasbora parva</i> (Temminck a Schlegel, 1846)....	768
Alexandra Svrbická - Analýza fyziologickej funkcie permeázy Knq1p kvasiniek <i>Kluyveromyces lactis</i>	773
Róbert Szabó - Molekulárna evolúcia hantavírusov v strednej Európe	779
Klaudia Talafová - Cielené rozpoznávanie adhezínu baktérie <i>Helicobacter pylori</i> bakteriálnymi inklúznymi telieskami konjugovanými so sialylovaným proteínom	785
Barbara Tóthová - Molekulárna genetika ochorenia Charcot-Marie-Tooth typu 1B	791
Evelína Turňová - Molekulárne prístupy na stanovenie farby srsti u psov	797
Miroslava Vaculíková - Vplyv rôznych foriem antimónu na rast kukurice siatej (<i>Zea mays</i> L.)	803
Tatiana Vaculová - Ohniská patogénov prenášaných kliešťom <i>Ixodes ricinus</i> (Linnaeus, 1758) na vybraných lokalitách v Bratislave.....	809
Magdaléna Vaváková - Gén GJB6, autozomálne recesívne formy hluchoty a hluchotu spôsobujúce mutácie v mitochondriálnom genóme	815
Henrieta Végešiová - Vplyv prenatálne a perinatálne navodenej hypertenzie na správanie potkana laboratórneho vo vyvýšenom bludisku tvare plus	821
Emília Vendel'ová - Modulácia imunitnej odpovede flavonoidom silymarínom počas experimentálnej infekcie larválnym štádiom cestóda u myší	827
Katarína Venglovská - Vplyv rôznych foriem mangánu v diétach nosníc na aktivitu antioxidantných enzýmov	833
Magdaléna Vreštiaková - Vplyv glykozylácie na funkciu proteínu CAIX.....	839

Magdaléna Wágnerová - Koinfekcia MHV-68/H3N2 a jej vplyv na imunitnú odpoveď BALB/c myší.....	845
Monika Wencelová - Ovpływňovanie bachorovej fermentácie, ciliátovej protozoálnej populácie a obsahu mastných kyselín kombináciou chitosanu s olejmi in vitro.....	851
Iveta Zadražilová - 2-hydroxy-N-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidy – Potenciální léčiva infekcí MRSA?.....	857
Martina Zámorová - Využitie metódy Multiplex Ligation- dependent Probe Amplification (MLPA) v diagnostike.....	863
Monika Záškarová - Chorioalantoická membrána prepelice japonskej ako experimentálny model pre štúdium angiogenézy a fotodynamicky aktívnych látok.....	869
Alexandra Zibrinová - Expresia a funkcia receptorov v corpora allata B. mori.....	875
Zuzana Zvadová - Optimalizácia exprese a purifikácie rekombinantnej alkoholdehydrogenázy.....	881

CHÉMIA

Juraj Adamuščin - Chromatographic determination of BTEX in water samples by Large Volume Injection	888
Peter Antal - Štvorjadrové tartarátokomplexy vanádu(V) s chirálnymi kationmi	893
Iveta Bartošová - Cladding tube materials for advanced nuclear facilities with closed fuel cycle	899
Carmen Bekeová - Charakterizácia génov modifikujúcich sacharidovú zložku polyketidového antibiotika auricínu v kmeni <i>Streptomyces aureofaciens</i> CCM 3239.....	905
Nikoleta Biherczová - Analýza proteínov elektroforetickými fokusačnými technikami s hmotnostne spektrometrickou detekciou	911
Ján Bilohuščin - Rapid determination of ⁹⁰ Sr in urine samples using AnaLig® Sr-01.....	917
Peter Boháč - Rezonančný prenos energie v systémoch vrstevnatý kremičitan/kyanínové farbivá	923
Katarína Boriová - Extrakcia využívajúca micely pre selektívnu separáciu a nakoncentrovanie antimónu(III) z prírodných vôd pred jeho stanovením metódou atómovej absorpčnej spektrometrie s elektrotermickou atomizáciou	929
Miroslava Bursová - Nové možnosti optimalizácie v analytické chemii.....	935
Luboš Cehlárik - Návrh a syntéza derivátov bitiazolou určených pre organické tranzistory n-typu.....	941
Alexandra Čibová - Lineárne benzobistiazolové soli a od nich odvodené konjugované deriváty s nelineárno optickými vlastnosťami	946
Simona Čurmová - Využitie extrakcie teploty zákalu micelárnych roztokov na stanovenie stopových koncentrácií medi v ľudskom moči metódou atómovej absorpčnej spektrometrie s plameňovou atomizáciou	950
Martin Daňo - Príspevok k riešeniu problému stanovenia hydraulických vlastností bentonitov.....	956
Ladislav Éhn - Elektrónová štruktúra a vlastnosti fluorovaných uhl'ovodíkov	962
Viktória Ferenczy - Syntetické imínové antioxidanty podobné resveratrolu.....	967
Anna Fleischhackerová - Imunomodulačné vlastnosti pripravených glykokonjugátov pozostávajúcich z detoxikovanej molekuly lipopolysacharidu <i>V. cholerae</i> O139 a proteínového nosiča.....	973

Blanka Fusková - Niektoré štatistické spracovania parametrov taviaceho procesu skla, vzhľadom na početnosť chemických nehomogenít.....	979
Blanka Fusková - Evaluation of Chemical Inhomogeneities from the aspect of their numbers, largeness and shapes.....	985
Veronika Gardoňová - Stanovenie rádionuklidov ^{90}Sr , $^{239,240}\text{Pu}$, ^{238}Pu a ^{241}Am v pôde využívajúce metódy extrakčnej chromatografie a spoluzrážania	990
Alexandra Hengerics Szabó - Analýza výdychových plynov človeka pomocou plynovej chromatografie.....	996
Martina Hesticová - Vplyv reakčných podmienok bez rozpúšťadla na enantioselektívnu Michealovu adíciu katalyzovanú vodíkovými väzbami	1002
Renata Hodossyová - Interakcie rôznych aniónových foriem fosforu s vybranými adsorbentami.....	1008
Jana Holekšiová - Development of Synthesis Methodology and Synthesis of Small-molecule VEGFR-2 Inhibitors of Tumor Angiogenesis Using Cycloaddition Reactions	1014
Miroslav Horváth - Príprava derivátov rigidizovaného trifenylamínu s možným optoelektronickým využitím.....	1020
Bianka Horváthová - Stanovenie ^{129}I pomocou x-ray spektrometrie.....	1026
Iveta Hukelová - Štúdium separácie alifatických a aromatických kyselín v jednom behu metódou kvapalinovej chromatografie.....	1032
Martin Kontrík - Korózia superzliatiny Incoloy 800H/HT v eutektickej zmesi LiF-NaF-KF s rôznym prídavkom fluoridu chromitého.....	1038
Jiří Kos - Syntéza amidů hydroxynaftoových kyselín jako biologicky aktivních látek.....	1044
Adrián Krajňák - Sorption of uranium cationic species from aqueous solutions on Slovak bentonite Jelšový potok.....	1048
Katarína Krčová - Analýza fenolových zlúčenín v rôznych druhoch čajov využitím techniky LC-MS	1054
Lukáš Krivosudský - Totálna spontánna rezolúcia TBA[VO ₂ (N-sal-DL-Ile)].....	1059
Elena Kupcová - Simultánna chromatografická analýza endogénnych estrogénov v moči.....	1065
Matej Kurek - Distribúcia veľkosti častíc frakcií bentonitu Stará Kremnička – Jelšový potok, získaných sedimentačnou frakciáciou vodnej suspenzie bentonitu	1071

Monika Kvaková - Syntéza, charakterizácia a fluorescenčné štúdie chemosenzora pre enzýmové stanovenia.....	1076
Michal Májek - Nová fotokatalytická alkyltolácia arómátov	1082
Michal Májek - Neočakávaná reakcia pri syntéze izochinolinónov: mechanistická štúdia.....	1088
Marián Miškóci - Hydrotermálna syntéza nanorúrok titanátu sodného	1094
Melinda Mojzesová - Organokatalytické 1,3-dipolárne cykloadície nitrónov.....	1100
Olivier Monfort - Preparation and characterization of vanadium oxide thin films	1106
Marianna Moskaľová - Enantioména separácia s využitím nového typu chirálneho selektora	1112
Martin Motola - Príprava nanotrúbiek TiO ₂ , štúdium ich morfológie a fotokatalytických vlastností	1115
Eva Noskovičová - Určovanie hyperpolarizovateľnosti molekúl metódou hyper-Rayleighovho rozptylu.....	1120
Daniela Nýblová - Štúdium procesu gelácie izopropoxidu titaničitého metódou pozitronovej anihilačnej spektroskopie.....	1125
Gabriela Orešková - Kvantovochemické výpočty glykoláto-peroxidokomplexu vanádu(V) s hexaakvazinočnatým katiónom.....	1131
Lukáš Petra - Príprava a charakterizácia organoílov obsahujúcich L-cysteín.....	1136
Peter Podolec - GC-MS/MS stanovenie sevofluránu a hexafluórizopropanolu v plazme	1142
Eva Proroková - In silico štúdia potenciálnych inhibítorov Auróry A	1148
Monika Radičová - Využitie preparatívnej izotachoforézy a extrakcie tuhú fázou pred HPLC-MS analýzou nesteroidných protizápalových liečiv.....	1154
Zdenka Radičová - Použitie preparatívnej izotachoforézy ako metódy na frakcionáciu humínových kyselín	1160
Peter Ribar - Syntéza 2-aminoxazol-5-karbonitrilu a jeho využitie pri príprave inhibítora KDR receptora.....	1166
Marína Rudašová - Využitie mikročipovej elektroforézy na stanovenie hlavných zložiek vo farmaceutických preparátoch.....	1172
Ján Škoviera - Chémia vo vnútri rádio-frekvenčného zdroja negatívnych iónov vodíka.....	1178
Pavol Suchánek - Vplyv aniónov a katiónov na kvapalinovú extrakciu TcO ₄ ⁻ v iónových kvapalinách.....	1182

Pavol Tisovský - Organokatalytické reakcie s využitím SOMO aktivácie	1188
Dominika Tunegová - Glykácia, glykooxidácia a zápal u pacientov s diabetes mellitus 2. typu.....	1194
Eliška Vaculíková - Příprava nanočástic atorvastatinu metodou odpařování rozpouštědla	1199
Eva Viglašová - Sorption of uranium species from aqueous solutions by Greek zeolite Metaxades.....	1205
Veronika Vojtková - RP-HPLC separácia vybranej skupiny profénov na chirálnej stacionárnej fáze v reverznofázovom móde.....	1211
Matej Žabka - Addition of azlactones to imines catalyzed by thiourea catalysts.....	1216
Daniel Zich - Příprava a štúdium hybridných vrstevnatých materiálov pomocou THz-TDS.....	1222

GEOLÓGIA

Kristína Bátorová - Využitie satelitnej radarovej interferometrie na monitorovanie deformácií zemského povrchu.....	1229
Vladimír Čavajda - Charakterizácia vplyvu mletia a ultrazvuku na zmenu štruktúry a technologických vlastností mastenca	1235
Tomáš Čeklovský - Faunistické spoločenstvo z Prepoštskej jaskyne v čase prítomnosti neandertálcov	1241
Patricia Ekkertová - Využitie digitálnej fotogrametrie pre štruktúrnu analýzu skalných svahov.....	1247
Samila Hrvanović - Metaultramafics in the eclogitic Siegraben complex (Eastern Alps).....	1253
Martin Krajňák - 3D density modelling of Turiec basin including topographic gravity effect of the sedimentary fill.....	1259
Alexander Lačný - Petrografický a biostratigrafický rozbor klastov kržlianskej brekcie – významného paleokrasového fenoménu Malých Karpát	1265
Marika Mikudíková - Nové nálezy druhu Discosauriscus pulcherrimus (Seymouriamorpha, Discosauriscidae) zo spodného permu Boskovickej panvy na Morave (Česká republika).....	1271
Igor Murin - Geophysical survey of Rossnaree Enclosure, Bru na Boine, Ireland.....	1276
Mariana Pašiaková - Geoelektrické merania v strednej časti dunajskej panvy.....	1281
Ondrej Pelech - Predbežné výsledky analýzy krehkých štruktúr v severnej časti Považského Inovca a pril'ahlych oblastiach.....	1284
Barbara Porubčanová - Mikrogravimetrické merania vertikálneho gradientu na lokalite Dómu sv. Mikuláša v Trnave.....	1289
Dagmar Stojkovová - Hodnotenie sucha v hladinovom režime podzemnej vody vo Vyšnom Slavkove	1294
Marek Tomasch - Hydraulicke a hydrogeochemické parametre v okolí vrtu HGŠ-1 na lokalite Šúr.....	1300
Juraj Žitňan - Au-porfýrová mineralizácia na lokalite Kráľová v stratovulkáne Javorie	1306

GEOGRAFIA

Dominik Abrahám - Tvorba webovej aplikácie s podporou mapovej služby WFS-T	1313
Michal Beniak - Hodnotenie softvérov GIS z hľadiska vektorovej tvorby.....	1318
Adriána Chovancová - Trasovanie s využitím frikčných povrchov	1324
Marek Chovanec - Komplexná geografická analýza fotovoltického priemyslu na Slovensku so zameraním na pozemné systémy.....	1330
Juraj Dobšovič - Ballová metóda využitá na hierarchizáciu regiónov cestovného ruchu na Islande	1336
Lucia Foltýnová - Zmeny v rodinnom správaní na Slovensku počas druhého demografického prechodu	1342
Barbora Funková - Lokalizácia a klasifikácia singulárnych bodov štruktúrnych polí georeliéfu.....	1348
Jozef Garaj - Geografická analýza Kaliningradskej oblasti a súčasný stav	1354
Michal Gazda - Analýza komponentov pohybu obyvateľstva vo funkčnom mestskom regióne Michalovce	1360
Mária Gažiová - Formovanie suburbánnych zón stredne veľkých miest Nitrianskeho samosprávneho kraja.....	1366
Michal Hladký - Časopriestorová analýza národnostnej štruktúry v pobaltských republikách (Litva, Lotyšsko, Estónsko) po roku 1918.....	1373
Júlia Jurištová - Hodnotenie odlesnenia s využitím regresie	1379
Arnold Kakaš - Využitie dištančne vážených migračných mier a indikátorov priestorovej autokorelácie vo výskume migrácie.....	1385
Martin Kalivoda - Zhodnotenie presnosti výpočtu parciálnych derivácií prvého rádu z TIN.....	1391
Anton Kasagranda - Predpoklady cestovného ruchu v Strážovských a Súľovských vrchoch	1397
Anton Kasagranda - Vplyv hospodárskej krízy na stav priamych zahraničných investícií a mieru evidovanej nezamestnanosti v okresoch Trenčianskeho kraja	1403
Pavel Krajčí - Vzťah rozloženia snehovej pokrývky a morfometrických parametrov reliéfu vo vybranej časti Žiarskej doliny 27.1.2013	1409
Veronika Madleňáková - Podpora cestovného ruchu vo vybranom regióne s využitím GIS.....	1415
Anna Máriássyová - Priestorové aspekty záujmu USA o Afriku	1421

Roman Mikuš - Charakterizácia riadnych volieb starostov/primátorov obecných a mestských zastupiteľstiev na Slovensku v rokoch 2002-2010	1427
Ján Morvic - Demogeografická analýza územia mesta Žarnovica.....	1433
Miriama Mramúchová - Zmeny využitia zeme v kopaničiarskom osídlení na príklade obcí Krajné a Podkylava v kontexte prebiehajúcich transformačných procesov.....	1439
Jiří Pánek - Participativní mapování vodních zdrojů – Koffiekraal, Jihoafrická republika.....	1445
Vladimír Pelech - Výpočet kartografického pólu pre valcové zobrazenia.....	1451
Ladislav Poliak - Zlučovanie obcí - zvýšenie rozvojového potenciálu obcí? ...	1457
Štefan Poništiak - Kvalita pôd a degradácia pôd vo vybraných archeologických lokalitách v ČR.....	1463
Štefan Poništiak - Zmeny v cereálnej produkcii v závislosti na environmentálnych podmienkach v mladšej dobe bronzovej až staršej dobe železnej	1469
Michal Rosol - Gated communities	1475
Martin Šuvada - Segregácia Rómov na príklade vybraných slovenských miest	1481
Martin Svoboda - Současný stav hald v Rosicko – oslavanském uhelném revíru a možnosti jejich využití	1487
Michal Szabo - Migračná atraktivita v kontexte polohy územia	1493
Michal Veselský - Využitie regresnej analýzy pre potreby modelovania kontaminácie pôd potenciálne toxickým prvkom – arzénom	1498

DIDAKTIKA

- Jaroslav Baričák - Modifikácia syntéznych úloh na laboratórne cvičenia z anorganickej chémie..... 1504
- Miriam Černá - Využitie vybraných vojenských objektov Bratislavy v návrhoch exkurznej činnosti z predmetu geografia..... 1509
- Vladimír Gašparík - Aplikácia školských počítačových meracích systémov vo vyučovaní chémie na ZŠ..... 1515
- Ján Goruška - Motivačné prepojenie minulosti a súčasnosti – didaktický príklad Bergakadémie a rastrujúcej sondovacej mikroskopie v nanotechnológii..... 1520
- Henrieta Hambalková - Návrh databázy filmových scén z prírodopisných filmov pre aplikáciu vo vyučovaní biológie na základnej a strednej škole..... 1526
- Igor Kokavec - Námety výučby ekológie pre gymnáziá na príklade vodných ekosystémov..... 1532
- Gabriella Németh - Chemický projekt pre žiakov prvého ročníka osemročného gymnázia..... 1538
- Miroslava Šárová - Vizualizácia vybraných foriem georeliéfu ako doplnkový materiál ku štúdiu geomorfológie na vysokých školách..... 1544
- Martin Šponiar - Mentálne a konceptuálne mapovanie ako nástroj kvalitatívneho výskumu v nižšom sekundárnom vzdelávaní s aplikáciou na tému „Voda“..... 1550
- Petra Tomčalová - Projektové vyučovanie k téme "Srdcovo-cievne (kardiovaskulárne) ochorenia"..... 1556
- Zuzana Vasilová - Kompetencie prírodovednej gramotnosti v komplexných učebných úlohách z chémie..... 1562

ENVIRONMENTALISTIKA

- Viera Baštáková - Priestorová dynamika mestskej štruktúry v urbánnom území Bratislavy..... 1569
- Katarína Boriová - Bioakumulácia a biosorpcia bizmutu Bi(III) mikroskopickou vláknitou hubou *Aspergillus clavatus*..... 1575
- Stanislava Brnkaľáková - Strategické plánovanie rozvoja mikroregiónu Biela Orava s ohľadom na mienku vybraných hlavných aktérov v území..... 1581
- Malvína Čierniková - Zaujímavé peľové objekty na rašelinisku PR Nad Šenkárkou 1587
- Marek Gális - Výskyt invázných druhov rastlín vo vegetácií ramien rieky Nitry v okrese Topoľčany..... 1593
- Michal Hlodák - Štúdium bioakumulácie, fytotoxicity a predpoveď mobility a fytopristupnosti ortuti pomocou aplikácie jednoduchej extrakčnej metódy (0,11 M kyselina octová) v systéme pôda-rastlina (*Hordeum vulgare* L.) 1599
- Erika Igondová - Využitie podkladových máp vytvorených v prostredí GIS v posudzovaní vplyvov na životné prostredie 1605
- Martin Kolesár - Štúdium transferu niklu z pôd do rastlín v geochemicky anomálnych oblastiach centrálno-karpatského paleogénu a magurskej časti flyšového pásma Slovenska 1611
- Marianna Kollárová - Ohodnotenie vybraných mimoprodukčných funkcií pôdy na katastrálnom území obce Bielovce..... 1617
- Michal Kupec - Vybrané problémy priestorovej variability hydraulických parametrov pôd Borskej nížiny 1623
- Lucia Lachká - Distribúcia potenciálne toxických prvkov v urbánnych pôdach Bratislavy..... 1629
- Alexandra Lešková - Účinok akumulácie Mn a Ni v *Arabidopsis thaliana* na vybrané rastové parametre a architektúru koreňa..... 1635
- Michal Lipták - Adaptace vodního hospodářství na změnu klimatu 1641
- Alexandra Pažická - Geogénne vs. anropogénne znečistenie riečnych sedimentov ťažkými kovmi na modelových lokalitách 1647
- Matúš Peško - Vplyv Zn²⁺ na niektoré rastové a biochemické parametre rastlín repky olejky (cv. Verona)..... 1653
- Ivana Pífková - Experimentálne biolúhovanie hliníka z tuhej fázy Al₂O₃ v podmienkach statickej kultivácie mikroskopickej vláknitej huby *Aspergillus niger*..... 1659
- Ivana Pilková - Výskyt liečivých rastlín v Bábskom lese..... 1665

Zuzana Pšenáková - Miera ohrozenia historických krajinných štruktúr v dôsledku sukcesie –modelové územie k.ú. mesta Čadca	1671
Simona Škultétyová - Hodnotenie vybraných obcí Slovenskej republiky na základe výskytu rakovinových ochorení v spojitosti s obsahmi makroprvkov v pôdach.....	1677
Barbora Slabeciusová - Vplyv rozvoja mesta Žilina na rieku Váh.....	1683
Monika Šmelková - Fytotoxicita ťažkých kovov (Sb, Ni, V a Zn) hodnotená inhibíciou rastu semenáčikov Sinapis alba L.	1689
Angelika Tamášová - Cezhraničné posudzovanie vplyvov činností na životné prostredie medzi Slovenskou republikou a Maďarskom	1694
Roman Tóth - Hodnotenie mobility potenciálne toxických prvkov v sedimentoch odkaliska Markušovce	1700
Monika Vyskupová - Vývoj priemyselného využitia mesta Malacky v rokoch 2002 až 2010	1706
Jana Žáková - Ekosozologické aspekty v diverzite Thysanoptera Slovenska (konceptia a kritéria IUCN)	1712

Študentská vedecká konferencia PriF UK 2013

Zborník recenzovaných príspevkov

Dátum a miesto konania:	24. apríl 2013 Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta
Editori:	RNDr. Michal Galamboš, PhD. RNDr. Vladimíra Džugasová, PhD. RNDr. Andrea Ševčovičová, PhD.
Recenzenti:	Členovia odborného výboru Za jazykovú úpravu príspevkov zodpovedajú autori.
Vydalo:	Univerzita Komenského v Bratislave vo Vydavateľstve UK
Tlač:	AFINITA s.r.o.
Grafická úprava:	Mgr. Martin Vataha
Vydanie:	prvé
Rozsah strán:	1756
Náklad:	430 ks
ISBN:	978-80-223-3392-4



ŠVK
PriF UK
2013

ISBN 978-80-223-3392-4