

ANTIOXIDAČNÁ AKTIVITA PEĽU BRIEZ VO VZŤAHU K EXPRESII BETV1 ALERGÉNU

JANA ŽIAROVSKÁ^a, TETIANA SHEVTSOVA^b,
JÁN GAŽO^a, JÁN BRINDZA^a, KATERYNA
GARKAVA^b a MILAN BEŽO^a

^a Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, FAPZ SPU v Nitre,
Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, SR, ^b Inštitút ekologickej
bezpečnosti, NAU v Kijeve, Kosmonavta Komarova 1,
03058 Kijev, Ukrajina
jana.ziarovska@uniag.sk

Došlo 17.5.13, prijaté 29.8.13.

Kľúčové slová: peľ briez, antioxidačná aktivita, BetV1
alergén, expresia

Úvod

Prevalencia alergií, najmä respiračných, má v posledných rokoch, najmä v ekonomicky vyspelých štátoch stúpajúcu tendenciu. Zaznamenaný nárast je dávaný do súvisu so zmenami v oblasti environmentálnych faktorov zahŕňajúc vnútorné i vonkajšie znečistenie vzduchu. Hypersenzitivita k aeroalergénom spôsobuje alergické ochorenia, ktoré postihujú až 30 % populácie¹. Preto ako alergie, tak aj jednotlivé alergény sú aktuálnymi otázkami výskumu. Alergény peľu, najmä pochádzajúce z tráv, sú jedným z hlavných zdrojov spôsobujúcich dýchacie ťažkosti², avšak v rámci Európy je peľ briez primárnym zdrojom jarných polínóz³. Základným alergénom peľu briez je BetV1 bielkovina ako najznámejší zástupca PR10 skupiny bielkovín, pričom sa vyskytuje v prirodzených izoformách kódovaných siedmimi génmi, ktorých sekvencie sú vzájomne zhodné v 95 % (cit.⁴). Cieľom tejto štúdie bolo stanovenie antioxidačnej kapacity peľu a expresie BetV1 alergénu v súbore peľu briez z oblasti Ukrajiny a ich vzájomné vyhodnotenie.

Experimentálna časť

Rastlinný materiál

Peľ z jednotlivých stromov *Betula pendula* Roth. bol zozbieraný na Ukrajine v oblastiach Kieva a Rivny na začiatku kvitnutia. Jednotlivé jahňady boli vysušené pri izbovej teplote a následne bol peľ po strasení prečistený a umiestnený do plastových aseptických nádob a uskladnený pri –20 °C, aby sa zabránilo degradácii. Celkovo bolo do analýz zahrnutých sedem vzoriek s nasledovným označením: 1 – Kiev (park na sídlisku), 2a – Perejaslav-

Khmelnitsky (sídlisko), 2b – Perejaslav-Khmelnitsky (okolie múzea), 3 – Hotski (les), 4 – Ivankov, (sídlisko), 5 – Kuznetsovsk (kraj mesta susediaci s lesom), 6 – Borodyanka (oblasť letiska).

Antioxidačná aktivita

Celková antioxidačná aktivita analyzovaných vzoriek bola stanovená pomocou úrovne voľných radikálov z reakcie s DPPH (C₁₈H₁₂N₅O₆, M = 394,33; 2,2-difeny-1-pikrylhydrazyl) rozpusteného v metanole v množstve 0,025 g v 100 ml, spolu so vzorkou peľu podľa modifikovanej metódy⁵. Extrakty boli pripravené zmiešaním vody a 70 % etanolu pri izbovej teplote. Následne sa 100 ml rozpúšťadla zmiešalo s 5 g peľu a zmes bola nechaná na mechanickom miešadle po dobu 2 hodín. Po extrakcii bolo 0,1 ml extraktu zmiešaného s 3,9 ml DPPH roztoku. Farebná zmena DPPH reagujúceho s antioxidantami vo vzorke vyústila do zmeny farby v rozpätí spektra od tmavo fialovej až po svetlo žltú. Zaznamenané zmeny v absorbancii boli merané pri 515 nm spektrofotometricky (Genesys 20, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) po 10 minútach. Celková antioxidačná aktivita vyjadrená percentuálne bola vypočítaná podľa: % celkovej antioxidačnej aktivity = 100 · [(A_{kontrola} – A_{vzorka}) / A_{kontrola}], kde A_{kontrola} je absorbanca 100% roztoku metanolu v reakcii a A_{sample} je absorbanca testovanej vzorky. Všetky analýzy prebehli v piatich replikách.

Analýza expresie BetV1 alergénu

Celková RNA izolovaná zo vzoriek peľu bola extrahovaná pomocou izolačnej súpravy GeneJET™ Plant RNA Purification Mini Kit podľa pokynov výrobcu a čistota ako aj množstvo izolovanej RNA bola určená spektrofotometricky. Reverzná transkripcia bola uskutočnená použitím súpravy Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit pre 1 µg celkovej RNA rovnako podľa pokynov výrobcu. Prajмеры pre analýzu expresie boli navrhnuté na základe mRNA sekvencií pre BetV1 gén (priamy tgccggggcccggtgtgcttc a spätný gccgtccggcaagccctc) a cyklofilín (priamy ctccatcaggggtgccact a spätný atggaggcctggaaccatt) ako referenčný gén – obe sekvencie sú dostupné v NCBI databáze (BetV1 – AJ 311666.1 a cyklofilín X15877.1).

Reakcie boli uskutočnené v termocykléri Biorad CFX96, pričom 25 µl reakčného objemu obsahovalo Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master mix (2X), 0,2 µM prajмеры a 400 ng prepísanej cDNA. RT-qPCR reakcie prebehli v nasledovných podmienkach: 95 °C – 10 min; 40 cyklov (95 °C – 15 s, 60 °C – 30 s, 72 °C – 40 s). Fluorescencia vznikajúceho produktu bola odčítavaná pri 60 °C v každom cykle. Kvantifikácia expresie BetV1 alergénu bola uskutočnená podľa metodiky⁶, pričom dáta boli normalizované voči použitému metabolickému génu (cyklofilín) a porovnávané k expresii alergénu vo zvolenom kalibrátore, čo bola vzorka číslo 3 z oblasti Hotski, pochádzajúca z podmienok lesa.

Výsledky a diskusia

Antioxidačná aktivita peľových extraktov a relatívna expresia BetV1

Celková antioxidačná aktivita peľu je ovplyvňovaná najmä jeho druhovým zložením. V prípade antioxidačnej aktivity peľu brezy v súčasnosti nie sú v literatúre dostupné výsledky. Vyhodnotením dát získaných analýzou celkovej antioxidačnej aktivity je možné pozorovať vysoké hodnoty namerané v analyzovaných peľoch. Vo vodnom extrakte dosahovali úroveň 80,54–85,50 % a v etanolovom extrakte 60,27–84,91 %. Získané výsledky ukazujú na vyššiu antioxidačnú aktivitu peľu briez vo vodnom roztoku v porovnaní s etanolovým. Test ANOVA získaných výsledkov preukázal, že antioxidačná aktivita závisí z 59,8 % od typu extraktu a zo 40,2 % od analyzovanej vzorky. Vo všetkých prípadoch okrem vzorky pochádzajúcej z oblasti Kuznetsovsk antioxidačná aktivita vo vodnom roztoku stúpala v porovnaní s etanolovým významne. V prípade štúdií zaoberajúcich sa porovnaním antioxidačnej aktivity peľu rôznych druhov meranej vo vodných a etanolových extraktoch je konštatovaná vyššia antioxidačná aktivita vo vodnom roztoku pre vetrom opelivé druhy⁷, čomu zodpovedajú aj výsledky tejto štúdie uskutočnenej na peľi brezy. V prípade porovnania vzťahu antioxidačnej aktivity k iným biologickým či biochemickým vlastnostiam je v literatúre uvádzaná korelácia medzi obsahom polyfenolov a antioxidačnou aktivitou včelieho peľu v prípade repky olejnej, maku siateho a snečnice ročnej⁸.

Analýzy expresie BetV1 alergénu boli uskutočnené na vzorkách peľu pochádzajúcich z rôznych miest rastu ako pre urbanizované, tak aj pre okrajové časti urbanizovaného prostredia. Vzorka peľu z rastu v lesnom prostredí slúžila ako kalibrátor analýz expresie. RT-qPCR kvantifikácia expresie BetV1 génu ukázala variabilitu v zastúpení počtu kópií transkriptov sledovaného génu pre jednotlivé analyzované vzorky, pričom vo všetkých prípadoch bolo zaznamenané zvýšenie expresie BetV1 alergénu oproti kalibrátoru (tab. I). Rozdiely v úrovniach expresie sú zaznamenané pre viaceré alergény v súvislosti nielen s varia-

bilitou klimatických podmienok¹, ale aj v prípade jednotlivých štádií rastu⁹.

Keďže jednotlivé analyzované vzorky peľu pochádzali so stromov rastúcich na rôznych lokalitách, namerané Ct (prahový cyklus amplifikácie) hodnoty zaznamenávajúce nárast fluorescencie vznikajúceho PCR produktu boli za účelom korekcie existujúcej variability vzoriek normalizované voči kontrolnému metabolickému génu, ktorého expresia je vo všetkých rovnaká a stabilná a rovnako bola použitá vzorka slúžiaca ako kalibrátor, v tomto prípade to bola jediná vzorka, ktorá pochádzala z lesného, teda neurbanizovaného prostredia. Ako je vidieť z tab. I, expresia BetV1 alergénu je nižšia a len mierne sa líšiaca v porovnaní s kalibrátorom v prípade briez rastúcich na okraji urbanizovaného prostredia. Pri vzorkách peľu pochádzajúcich zo stromov rastúcich v mestskom urbanizovanom prostredí bolo zaznamenané zvýšenie expresie o 0,77 až dvojnásobok. Zistené úrovne expresie sú zaujímavé v porovnaní so zisteniami autorov¹⁰, ktorí uvádzajú, že extrakty peľu pochádzajúceho zo stromov rastúcich v urbanizovanom prostredí vykazujú v porovnaní so vzorkami z vidieckeho prostredia vyššiu chemotaktickú aktivitu na ľudské neutrofile, pričom celkový obsah alergénov zostáva nezmenený. Výsledky analýzy expresie BetV1 alergénu sú s vyššie uvedenými analýzami chemotaktickej aktivity v principiálnej zhode. Priemerný nárast expresie pri vzorkách pochádzajúcich zo zastavaného územia dosiahol 1,5 násobok, pričom pri vzorkách z okrajových častí to bolo len 0,55 násobok.

Analýza vzťahu antioxidačnej aktivity k expresii BetV1 alergénu

Hodnotenie vzťahov medzi Ct, celkovou antioxidačnou aktivitou vodného extraktu a antioxidačnou aktivitou etanolového extraktu prebehlo pomocou Pearsonovho korelačného koeficientu (tab. II).

Použitím Pearsonovho korelačného koeficientu bola potvrdená najvyššia miera závislosti medzi Ct a antioxidačnou aktivitou etanolového extraktu na úrovni vysoko preukaznej kladnej korelácie s hodnotou 0,712.

Tabuľka I

Vypočítané hodnoty expresie génu pre BetV1 alergén a rozdiely zvýšenia expresie voči kalibrátoru – vzorke číslo 5 z oblasti Hotski

Vzorka	Expresný pomer ^a	Zvýšenie expresie ^b
Kiev	0,58	1,72 ×
Pereyaslav-Khmel'nitsky-sidlisko	1,29	0,77 ×
Pereyaslav-Khmel'nitsky-múzeum	0,61	1,64 ×
Ivankov	0,5	2 ×
Kuznetsovsk	5,72	0,17 ×
Borodyanka	4,13	0,24 ×

^{a, b} Počítané z hodnôt prahového cyklu amplifikácie podľa metodiky⁶, expresia bola normalizovaná voči cyklofilínu

Tabuľka II
Korelácie medzi prahovým cyklom amplifikácie a antioxidačnou aktivitou

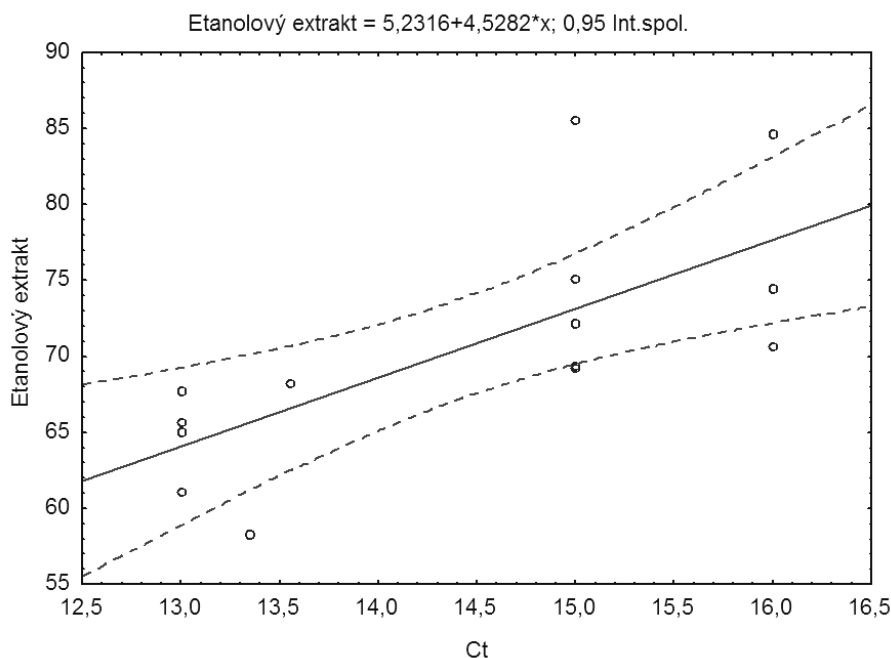
Premenná	Prahový cyklus amplifikácie	Vodný extrakt	Etanolový extrakt
Prahový cyklus amplifikácie	1,0000 $P=-----$	0,5753 ^a $P=0,31^a$	0,7124 ^a $P=0,004^a$
Vodný extrakt	0,5753 ^a $P=0,031^a$	1,0000 $P=----$	0,4304 $P=0,0125$
Etanolový extrakt	0,7124 ^a $P=0,004^a$	0,4304 $P=0,125$	1,0000 $P=----$

^a Korelácie významné nad hladinou $P < 0,05$

Vzťah medzi celkovou antioxidačnou aktivitou vodného extraktu a Ct bol stanovený na úrovni preukaznej kladnej korelácie s hodnotou 0,575. Pri použití viacnásobnej lineárnej regresnej analýzy, kde závisle premennou bola zvolená Ct aktivita a nezávisle premenné tvorili antioxidačná aktivita vodného a etanolového extraktu, bol výsledný model závislosti štatisticky preukazný ($P = 0,02$) len pre antioxidačnú aktivitu etanolového extraktu. Vzhľadom na tieto výsledky sme následne z modelu odstránili nepreukazný faktor (vodný extrakt) a získali sme lineárny model medzi Ct a etanolovým extraktom, kde hodnota regresného koeficientu bola štatisticky potvrdená ako vysoko preukazná a regresná konštanta ako štatisticky preukazná. Štatistická preukaznosť modelu lineárnej regresie bola potvrdená analýzou rozptylu. Vizualizácia

polohy zistených hodnôt Ct vzhľadom na odpovedajúce hodnoty etanolového extraktu v lineárnom regresnom modeli so zobrazením 95% intervalu spoľahlivosti je zobrazená na obr. 1.

Antioxidačná aktivita je jedným z mnohých indikátorov biologickej aktivity organizmov a v súčasnosti stúpa rozsah poznatkov i záujem o výskum a hodnotenie jednotlivých biologických látok či extraktov z tohto hľadiska. Hodnotené antioxidačné vlastnosti peľu rôznych rastlinných druhov⁵ poukazujú na to, že peľ ako taký vykazuje vysokú antioxidačnú kapacitu. Aj keď ako celok dosahuje peľ vysoké hodnoty antioxidačnej aktivity, nateraz nie sú jednoznačne identifikované jednotlivé zložky, ktoré sa na tom podieľajú najviac. V prípade vodných roztokov peľu rozhodujúcu úlohu zohrávajú hydrofilné súčasti peľu.



Obr. 1. Zobrazenie závislosti hodnôt prahového cyklu amplifikácie analýzy expresie BetV1 a celkovej antioxidačnej aktivity

V prípade druhu *Betula pendula* Roth. boli ako hydrolizované nerozpustné rezidúá v extraktoch identifikované vitamín C a kyselina *p*-kumarová¹¹. Práve kyselina *p*-kumarová je aktívnym antioxidantom blokujúcim voľné radikály¹². Ďalšou z uvádzaných funkcií kyseliny *p*-kumarovej je jej účasť na simulácii biosyntézy bielkovín, pričom aj peľové alergény sú bielkovinového charakteru¹³, konkrétne alergén peľu briez BetV1 patrí do triedy PR10 proteínov, ktoré reprezentujú triedu rozpustných kyslých bielkovín¹⁴. Na základe týchto vlastností a výsledkov získaných v analýzach, kedy vodné extrakty peľu briez vykazovali vyššiu antioxidantnú aktivitu, avšak antioxidantná aktivita etanolového extraktu korelovala so zistenou úrovňou expresie BetV1 alergénu, je možné predpokladať, že je to práve extrakcia jednotlivých zložiek BetV1 alergénu v alkohole, ktorá poskytuje dostatočnú bázu korelujúcu s expresiou BetV1 odvodenou od množstva transkribovanej RNA jeho génu. Naopak, vo vodnom prostredí jednotlivé súčasti BetV1 s vysokou pravdepodobnosťou zostávajú v kompaktnom stave, čo jednak zvyšuje ich antioxidantnú aktivitu a jednak podmieňuje samotnú alergénnosť, keďže aj sliznice dýchacieho traktu človeka sú primárne vodným prostredím.

Záver

Štúdiá uskutočnená na vzorkách peľu briez pochádzajúceho z rôznych lokalít preukázala zvýšenie expresie BetV1 alergénu v urbanizovaných oblastiach v priemere o 1,5× a okrajových oblastiach zastavaného územia priemerne o 0,55× v porovnaní s expresiou tohto alergénu pri vzorke pochádzajúcej z prostredia lesa. Na rovnakých vzorkách vyhodnotením ich antioxidantnej aktivity bola nájdená pozitívna korelácia expresie BetV1 alergénu s antioxidantnou aktivitou v etanolovom extrakte.

Použité skratky

cDNA	kópiová DNA vzniknutá prepisom mediátorovej RNA
Ct	prahový cyklus amplifikácie
PR bielkoviny	s patogénzou súvisiace bielkoviny
RT-qPCR	reverzne prepisujúca kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia

Práca vznikla za podpory grantového projektu KEGA 001SPU/4-2012.

LITERATÚRA

- Midoro-Horiuti T., Goldblum R. M., Kurosky A., Wood T. G., Brooks E. G.: *J. Immunol.* 164, 2188 (2000).
- Davies J. M., Li H., Green M., Towers M., Upham J. W.: *Clin. Transl. Allergy* 2, 1 (2012).
- Erler A., Hawranek T., Kruckemeier L., Asam C., Egger M., Ferreira F., Briza P.: *Proteomics* 11, 1486 (2011).
- Schenk M. F., Gilissen L. J., Esselink G. D., Smulders M. J.: *BMC Genomics* 7, 168 (2006).
- Kao Y. T., Lu M. J., Chen A. C.: *Jour. Food Drug. Anal.* 19, 470 (2011).
- Pfaffl M. W., Hageleit M.: *Biotechn. Lett.* 23, 275 (2001).
- LeBlanc B. W., Davis O. K., Boue S., Delucca A., Deeb T.: *Food Chem.* 115, 1299 (2009).
- Fatrcová-Šramková K., Nôžková J., Kačániová M., Máriássyová M., Rovná K., Stričík M.: *J. Env. Sci. Health, part B.* 48, 2013.133.
- Platteau C., De Loose M., De Meulenaer B., Taverniers I.: *J. Agric. Food Chem.* 59, 10803 (2011).
- Bryce M., Drews O., Schenk M. F., Menzel A., Estrela N., Weichenmeier I., Smulders M. J., Buters J., Ring J., Görg A., Behrendt H., Traidl-Hoffmann C.: *Clin. Transl. Allergy* 2, 1 (2012).
- Rozema J., Broekman R. A., Blokker P., Meijkamp B. B., de Bakker N., van de Staaij J., van Beem A., Ariese F., Kars S. M.: *Photochem. Photobiol. B.* 62, 108 (2001).
- Zhang Y., Tie X., Bao B., Wua X., Zhang Y.: *Brit. J. Nut.* 97, 484 (2007).
- El-Ghazaly G., Takahashi Y., Nilsson S., Grafström E., Berggren B.: *Grana* 34, 300 (1995).
- Walter M. H., Liu J. W., Grand C., Lamb C. J., Hess D.: *Mol. Gen. Genet.* 222, 353 (1990).

J. Žiarovská^a, T. Shevtsova^b, J. Gažo^a, J. Brindza^a, K. Garkava^b, and M. Bežo^a (^a*Department of Genetics and Plant Breeding, Slovak University of Agriculture, Nitra, Slovakia;* ^b*Institute of Ecological Safety, National Aviation University, Kiev, Ukraine*): **Antioxidant Activity of Birch Pollen in Relation to Expression of BetV1 Allergen**

The aim of the study was to determine the total antioxidant activity and expression of silver birch allergen BetV1 in pollen samples from various Ukraine areas. The obtained results show higher expression of BetV1 allergen in samples from central parts of urbanized areas (ca. 1.5 times) compared with the samples from borders of the urbanized areas (ca. 0.55 times). The total antioxidant activity of aqueous pollen extracts ranged from 80.5 % to 85.5 %, for ethanolic extracts 60.3–84.9 %. Positive correlation was found between antioxidant activity in ethanolic pollen extract and BetV1 allergen expression.