

**DETEKCIA CELIAKÁLNE AKTÍVNYCH BIELKOVÍN ELEKTROFORETICKOU
A IMUNOCHEMICKOU METÓDOU
DETECTION OF CELIAC ACTIVE PROTEINS BY ELECTROPHORETIC AND
IMUNOCHEMICAL METHODS**

Eva Palenčárová, Zdenka Gálová

ABSTRACT

Celiac disease is characterized by small-intestinal mucosal injury and nutrient malabsorption in genetically susceptible individuals in response to the dietary ingestion of wheat gluten and similar proteins in barley and rye. At present, so called pseudocereals appear to be the perspective group of crops for gluten-free diet for celiac disease. The aim of our study was to compare various methods of detection of celiac active proteins in different genotypes of agricultural plants. The results of the fractional composition of proteins confirmed that analysed genotypes of buckwheat, amaranth and chickpea are characterised by a low content of allergic proteins, which was confirmed also by electrophoretic profiles of storage proteins with the help of ISTA SDS PAGE method. ELISA assay confirmed the possibility of pseudocereals and legumes for application in production of foodstuffs suitable for patients suffering from celiac disease. Results of the present study also confirm that ELISA assay is a more objective method in comparison to SDS PAGE.

Key words: amaranth, buckwheat, chickpea, protein fractions, SDS PAGE, ELISA-test

ÚVOD

Celiakia (celiakálna sprue) je ochorenie, ktoré môže postihnúť niektorých geneticky predisponovaných jedincov. Táto disfunkcia vedúca k malabsorpcii je príčinne spájaná s potravinami obsahujúcimi prolamíny obilného zrna ako sú gliadíny pšenice, sekalíny raže, hordeíny jačmeňa, prípadne aveníny ovsa. Bielkoviny týchto obilnín iniciujú patofyziologické procesy, ktoré môžu nakoniec viesť k vážnemu poškodeniu absorpčného epitelu sliznice tenkého čreva (**Wieser, Koehler, 2008**).

V súčasnom období sa venuje veľká pozornosť využitiu pseudocereálií v racionálnej výžive ako čiastočná náhrada chlebového obilia (**Moudrý et al., 2005**), nakoľko neobsahujú celiakálne aktívne bielkoviny (**Petr et al., 2003; Cooper et al., 1998**).

Veľmi dôležité je presné testovanie prítomnosti resp. neprítomnosti celiakálne aktívnych bielkovín v surovinách pre bezlepkovú diétu. V našej práci sme sa zaoberali detekciou celiakálnych peptidov elektroforetickou a imunochemickou metódou v rôznych druhoch pšenice, láskavca, pohánky a cícera.

Elektroforetické metódy sú najbežnejšie používané techniky separácie bielkovín endospermu zrna, ktoré sú založené na princípe rozdielnej pohyblivosti elektricky nabitých makromolekúl v jednosmernom elektrickom poli, ktoré v prítomnosti detergenta ako je SDS sa separujú podľa molekulovej hmotnosti (**Kráčmar et al., 2004**).

ELISA je jednou z najpoužívanejších imunologických metód používaných na detekciu protilátok. Táto metóda, tak ako všetky ostatné imunochemické metódy, využíva interakciu antigénu so špecifickými protilátkami za tvorby imunokomplexu antigén-protilátka. Stanovenie tohto komplexu je umožnené naviazaním vhodnej značky, v tomto prípade enzýmu, na jeden z imunoreaktantov.

Cieľom predloženej práce bolo porovnať viaceré metódy detekcie celiakálne aktívnych bielkovín v obilninách, pseudoobilninách a strukovine.

MATERIÁL A METODIKA

V práci sme analyzovali kolekciu genotypov láskavca (*Amaranthus* sp.) a pohánky (*Fagopyrum esculentum* MOENCH.), ktoré sme porovnávali s vybranými genotypmi pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.) a cícera (*Cicer Arietinum* L.). Analyzovaný materiál bol získaný z Génovej banky semenných druhov SR SCPV VÚRV v Piešťanoch.

Stanovenie celkového dusíka podľa Kjeldahla

Obsah celkového dusíka bol stanovený podľa Kjeldahla (Michalík et al., 2006). Percentuálne zastúpenie hrubých bielkovín sme vypočítali prepočtom z obsahu dusíka stanoveného podľa Kjeldahla, ktorý sme vynásobili prepočítavacím koeficientom (%N x 6 pre pohánku a cícer, %N x 5,7 pre pšenicu a láskavec).

Metóda diskontinuálnej frakcionácie bielkovinového komplexu zrna podľa Osborna

Základné bielkovinové frakcie (albumíny, globulíny, prolamíny, glutelíny) sa získajú extrakciou v príslušných rozpúšťadlách podľa unifikovanej Golenkovej metódy (ICC metóda) Michalíka (2002).

Elektroforetická frakcionácia zásobných bielkovín (SDS PAGE)

Gluténové bielkoviny boli extrahované a analyzované vertikálnou diskontinuálnou elektroforézou na PAGE v prítomnosti SDS podľa metodiky ISTA (Wrigley, 1992). Elektroforetické profily boli vyhotovené na denzitometri LD - 01 Instrument pri vlnovej dĺžke 232 nm. Denzitometrické záznamy elektroforetických profilov jednotlivých genotypov boli vyhodnotené pomocou systému GelWorks 1D pre Windows. Ako štandardy boli použité odrody pšenice letnej, Marquis a Chinese Spring.

ELISA test

ELISA – enzýmová imunoabsorbčná analýza (Enzyme Linked ImunnoSorbent Assay) je metóda detekcie a kvantifikácie látok, založená na princípe špecifickej väzby medzi antigénom a zodpovedajúcou protilátkou. V práci sme použili sendvičovú enzýmovú imunoassay RIDASCREEN® Gliadin pre kvantitatívne stanovenie gliadínov od firmy R-Biopharm, SRN. Vo vzorkách bola stanovená absorbancia roztoku pri 450 nm. Zo zostrojenej kalibračnej krivky sme zistili hodnotu koncentrácie gliadínu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Problematika celiakálnych peptidov je dnes intenzívne študovaná na celom svete, avšak presný mechanizmus vzniku a pôsobenia celiakie nebol doposiaľ uspokojivo objasnený. Pri výskume patogenézy tejto choroby bolo vytvorených niekoľko hypotéz, pričom dnes prevládajú dve hypotézy a to hypotéza o dedičnej poruche metabolizmu a autoimúnná hypotéza. Doporučenou terapiou takto postihnutých pacientov je vylúčenie gliadínu z diéty (bezlepkové potraviny) alebo permanentné podávanie peptidázových preparátov (Michalík et al., 2006).

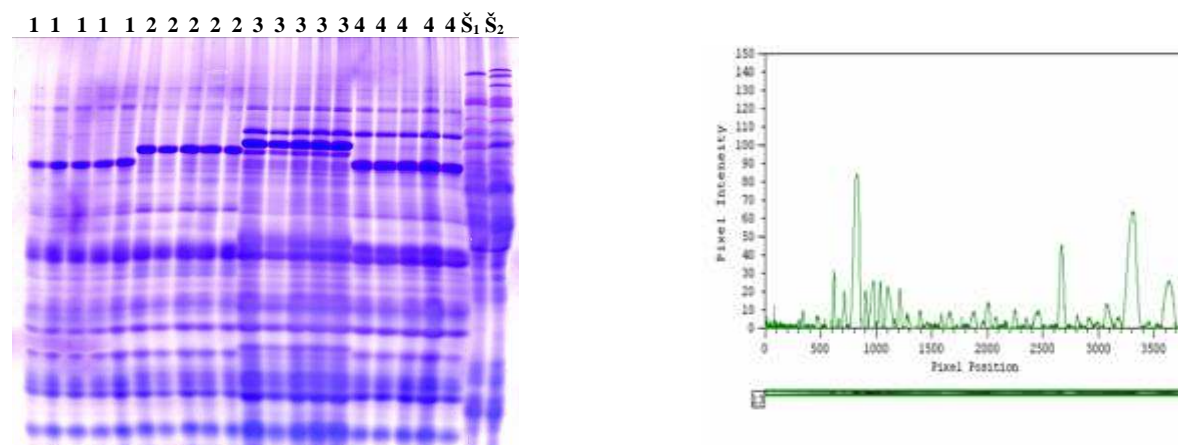
Celiakálne aktívne bielkoviny sú prítomné v prolamínovej frakcii a zo zdravotného hľadiska je zaujímavá najmä frakcia s nízkou molekulovou hmotnosťou okolo 20 až 30 tisíc Da, nakoľko práve táto frakcia, nazývaná α – gliadíny vykazuje toxické vlastnosti vyvolávajúce celiakálne ochorenie (Petr et al., 2003).

Pšenica letná sa vyznačuje charakteristickou skladbou frakcií bielkovinového komplexu, kde dominantné postavenie pripadá práve na prolamíny (gliadíny), ktorých zastúpenie tvorí v priemere 40%. Naproti tomu podiel prolamínových bielkovín v nekonvenčných obilninách, konkrétne v semenách láskavca bol v priemere 2,93%, pričom v jednotlivých genotypoch varíroval od 2,0% do 3,99 %. V semenách pohánky sme zistili porovnateľné priemerné

zastúpenie prolamínov 3,14% (2,57%-3,99%). Najnižšie percentuálne zastúpenie prolamínov vykázali genotypy cícera – 2,01%, pričom ich podiel varíroval od 1,4% do 2,72%.

Medzi genotypy s najnižším percentuálnym zastúpením prolamínov z kolekcie láskavca možno zaradiť Lider, Plainsman, A102, z kolekcie pohánky genotypy PY-EP-1, Špačinská 1 a z kolekcie cícera genotypy Slovák, BC 004 233 a 87 192. Vo všeobecnosti platí, že nízky podiel prolamínových bielkovín na úrovni 4-8% vyhovuje potrebám bezpečkovej diéty (Michalík et al., 2006). Z uvedeného vyplýva, že všetky hodnotené genotypy láskavca, pohánky aj cícera sú vhodné pre výrobu potravín pre celiatikov.

Hodnotenie frakčnej skladby bielkovinového komplexu na základe ich rozdielnej rozpustnosti v rozdielnych rozpúšťadlách neumožňuje dostatočne vysvetliť prítomnosť alergénnych bielkovinových determinant. Z uvedeného dôvodu sme realizovali frakcionáciu zásobných bielkovín elektroforetickou metódou PAGE v prítomnosti SDS.



Obrázok 1 Elektroforetické spektrum zásobných bielkovín láskavca a denzitometrický záznam genotypu A 47

Vysvetlivky: 1 – RRC 386, 2 - BURGUNDY, 3 – PI 604 671, 4 – A 47, Š₁ – CHINESE SPRING, Š₂ – MARQUIS

Kráčmar et al. (2004) uvádzajú, že pri separácii bielkovín elektroforetickými technikami sa najčastejšie ako nosiče používajú polyakrylamidové gély, ktoré majú výhodu v tom, že sú nenáročné na prípravu, vyznačujú sa veľmi dobrými mechanickými vlastnosťami, sú priehľadné, neobsahujú elektricky nabitú skupinu, štruktúra gélu je veľmi dobre reprodukovateľná, má nízku elektroosmózu a zo všetkých nosičov majú najväčšiu rozlišovaciu kapacitu.

Elektroforetickú separáciu zásobných bielkovín na SDS-PAGE sme aplikovali aj v našich experimentoch, pričom sa zásobné bielkoviny separovali na veľmi dobre rozlíšiteľné individuálne vysokomolekulárne glutenínové podjednotky (HMW-GS), nízkomolekulárne glutenínové subjednotky (LMW-GS), monoméne gliadíny (α , β , γ , ω), zvyškové albumíny a globulíny.

Z nami získaných výsledkov elektroforetickej analýzy zásobných bielkovín (Obr. 1) vyplýva, že zastúpenie zásobných glutenínových bielkovín s vysokou molekulovou hmotnosťou (HMW-GS), nepresahuje v láskavci 4,44% a v pohánke 8,8%, pričom podiel HMW-GS v láskavci varíroval od 0,37% do 4,4% a v pohánke od 1,57% do 8,8%. K porovnateľným výsledkom dospeli aj Petr et al. (2003), Michalík et al. (2006) a Urmínská et al. (2008). Nízky obsah HMW-GS potvrdzuje, že múka z láskavca a pohánky nevyhovuje kritériám pekárskej kvality, preto môže byť pri výrobe chleba použitá iba ako aditívum k pšeničnej alebo ražnej múke. Zastúpenie HMW-GS v analyzovaných genotypoch cícera a pšenice bolo

vyššie. Priemerný podiel HMW-GS v cíceri dosiahol 17,16% a v pšenici 17,45%, čo potvrdzujú aj výsledky Michalíka et al. (2006).

Priemerné zastúpenie zásobných bielkovín s nízkou molekulovou hmotnosťou (LMW-GS) a monoméryných gliadínov (α , β , γ a ω) predstavovalo v laskavci 46,11%, 50,96% vo vzorkách cícera a 57,09% vo vzorkách pšenice. Najvyšší podiel LMW-GS sme zaznamenali v sledovaných genotypoch pohánky (66,98%). Prezentované výsledky potvrdili predpoklad, že pseudocereálie (pohánka a laskavec), ako aj strukoviny (cícer), kde zastúpenie celiakálne aktívnych agens je nízke, sú vhodné pre bezlepkovú diétu.

Tabuľka 1 Variabilita obsahu lepkových bielkovín stanovená ELISA testom (%) v genotypoch laskavca a pohánky

Genotypy laskavca	Obsah prolaminov (%)	Obsah gluténu (%)	Genotypy pohánky	Obsah prolaminov (%)	Obsah gluténu (%)
PLAINSMAN	0,0034	0,0068	PYRA	0,0013	0,0026
1008	0,0026	0,0052	ŠPAČINSKÁ 1	0,0006	0,0011
KONIZ	0,0026	0,0051	HRUSZOWSKA	0,0012	0,0024
A 102	0,0033	0,0066	GEMA	0,0010	0,0020
K 266/1	0,0040	0,0081	LA HARPÉ	0,0005	0,0010
PI 604 671	0,0023	0,0045	V. KRAJOVÁ	0,0015	0,0029
x	0,0030	0,0061	x	0,0010	0,0020
σ	0,0006	0,0013	σ	0,0004	0,0008
V_K	21,13	22,29	V_K	39,06	39,62

Vysvetlivky: x - priemer, σ – smerodajná odchýlka, V_K – variačný koeficient

Michalík et al. (2006) konštatujú, že výsledky frakčnej skladby bielkovinového komplexu síce čiastočne umožňujú charakterizovať analyzované vzorky z hľadiska ich rizikovosti vo výžive chorých na celiakiu, avšak neposkytujú priame dôkazy o prítomnosti bielkovinových determinant, ktoré bezprostredne vyvolávajú toto ochorenie. V súčasnej dobe objektívny záver je možné urobiť iba na základe obsahu lepkových bielkovín stanovených imunochemickou metódou ELISA.

Tabuľka 2 Variabilita obsahu lepkových bielkovín stanovená ELISA testom (%) v genotypoch pšenice a cícera

Genotypy pšenice	Obsah prolaminov (%)	Obsah gluténu (%)	Genotypy cícera	Obsah prolaminov (%)	Obsah gluténu (%)
letná	6,4284	12,8569	SLOVÁK	0,0023	0,0045
jednozrnová	6,7892	13,5785	KNOOR 91	0,0025	0,0050
dvojrznová	6,5696	13,1392	ALFA	0,0024	0,0049
tvrdá	5,3460	10,6921	89 ETA 403	0,0028	0,0056
špaldová	5,7539	11,5078	87 192	0,0032	0,0064
Kamut	7,0716	14,1432	189 SLOCRE 99	0,0023	0,0046
x	6,3265	12,6618	x	0,0026	0,0052
σ	0,6524	1,3089	σ	0,0004	0,0007
V_K	10,3119	10,3371	V_K	13,7224	13,8852

Vysvetlivky: x - priemer, σ – smerodajná odchýlka, V_K – variačný koeficient

V našej práci sme použili na detekovanie prítomnosti gluténu Elisa test RIDASCREEN®, na základe ktorého sme stanovili obsah prolaminov v sledovaných genotypoch laskavca (Tab. 1) v rozmedzí 0,0023%-0,004%, v genotypoch pohánky od 0,0005% do 0,0015% a v genotypoch cícera od 0,0023% do 0,0032% (Tab. 2). V analyzovaných druhoch pšeníc (Tab. 2) sa potvrdil nadlimitný podiel prolaminov 6,33% (12,66% gluténu), ktorý varíroval od 5,35 % v pšenici tvrdej do 7,07% v pšenici Kamut.

Priemerný obsah prolamínov v kolekcii láskavca dosiahol 0,003%, čo predstavuje 0,006% gluténu. V kolekcii pohánky sme oproti kolekcii láskavca zaznamenali ešte nižší priemerný podiel prolamínov - 0,001%, ktorý predstavuje 0,002% gluténu. Zo všetkých, ELISA testom analyzovaných vzoriek sme najvyšší obsah gluténu detekovali v pšenici. Získané výsledky potvrdzujú svojimi prácami viacerí autori (**Petr et al., 2003; Michalík et al., 2006; Urminská et al., 2008**).

Komisia Codex Alimentarius Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) a Organizácie pre výživu a poľnohospodárstvo OSN (FAO) vytvorila pravidlá pre potraviny označené ako bezgluténové, resp. neobsahujúce lepok (gluten-free). Kódex noriem editovaný v marci 2006 navrhol maximálny obsah gluténu 20 mg.kg⁻¹ pre prirodzene lepok neobsahujúce potraviny a maximálny obsah 200 mg.kg⁻¹ (0,02%) gluténu pre potraviny označované ako bezlepkové (**Wieser, Koehler, 2008**). Taktiež podľa **Vestníka MP SR (2004)** platnom v SR, zastúpenie lepkových bielkovín by nemalo prekročiť limitovanú hranicu 200 mg.kg⁻¹. Vo vzorkách sledovaných pseudocereálií a strukoviny obsah gluténových bielkovín nepresahoval limitné hodnoty (0,02 %), čo umožňuje ich využitie pre potreby bezlepkovej diéty.

ZÁVER

Na základe porovnania výsledkov detekovania celiakálne aktívnych peptidov pomocou elektroforetickej metódy SDS-PAGE a Elisa testu môžeme konštatovať, že použitá imunochemická analýza je presnejšia a citlivejšia metóda, pomocou ktorej je možné nielen presne detekovať, ale aj kvantitatívne vyhodnotiť obsah prolamínov v sledovaných vzorkách. V nami analyzovaných druhoch pšeníc sa potvrdil nadlimitný podiel gluténu, ktorý sa pohyboval v rozmedzí 10,69% - 14,14%, čím niekoľkonásobne presahoval maximálny povolený obsah gluténu (0,02%). V analyzovaných genotypoch pseudocereálií a strukoviny sme nezaznamenali prekročenie limitovanej hranice, pričom obsah gluténu v genotypoch láskavca varíroval od 0,0045% do 0,0081%, v genotypoch pohánky od 0,001% do 0,0029% a v genotypoch cícera od 0,0045% do 0,0064%. Prezentované výsledky potvrdili predpoklad, že pseudocereálie, ako aj strukoviny, kde zastúpenie celiakálne aktívnych agens je nízke, sú vhodné pre bezlepkovú diétu.

LITERATÚRA

- COOPER, H. D. – SPILLANE, C. - KERMALI, I. - ANISHETTY, N. M. 1998. Harnessing plant genetic resources for sustainable agriculture. In *Plant Genetic Resources Newsletter 114*, 1998, p. 1 – 8.
- KRÁČMAR, S. – KUČEROVÁ, J. – CERKAL, R. – ZEMAN, L. 2004. Vhodnosť skladby bielkovín ke krmným účelom. In *Proteiny 2004, Zborník*. Brno: MZLU, 2004, s. 127-130. ISBN 80-7157-779-0.
- MICHALÍK, I. 2002. Unifikovaná metóda diskontinuálnej frakcionácie bielkovinového komplexu zrna obilnín. In *Pol'nohospodárstvo*, roč. 48, 2002, č. 7, s. 333-341.
- MICHALÍK, I. – GÁLOVÁ, Z. – URMINSKÁ, D. – KNOBLOCHOVÁ, H. 2006. Bielkovinový komplex zrna obilnín a pseudoobilnín. In *Výživná a technologická kvalita rastlinných produktov a ich potravinárske využitie*. Monografia. Nitra: SPU, 2006. s. 68 – 101. ISBN 80-8069-780-9.
- MOUDRÝ, J. – KALINOVÁ, J. – PETR, J. – MICHALOVÁ, A. 2005. Pohánka a proso. Praha: ÚZAPI, 2005. 206 s. ISBN 80-7271-162-8.
- PETR, J. - MICHALÍK, I – TLASKALOVÁ, H. - CAPOUCHOVÁ, I. - FAMĚRA, O. – URMINSKÁ, D. – TUČKOVÁ, L. - KNOBLOCHOVÁ, H. 2003. Extension of the spectra of plant products for the diet in coeliac disease. In *Czech J. Food Scientia*, roč. 21, 2003, č. 2, s. 59 - 70.

VESTNÍK MP SR, 2004, Bezgluténové potraviny pre celiatikov, roč. XXXVI, 1. apríl 2004, čiastka 10, 1. časť

URMINSKÁ, D. – HOBLÍK, J – SOCHA, P. et al. 2008. Bielkoviny cereálií a pseudocereálií a ich vzťah k celiakii. In *Zborník Bezpečnosť a kvalita surovín a potravín*. Nitra: SPU, 2008. s. 573 - 577. ISBN 978-80-8069-996-3.

WIESER, H. – KOEHLER, P. 2008. The biochemical basis of celiac disease. In *Cereal Chemistry*, roč. 85, 2008, č.1, s. 1 - 13.

WRIGLEY, C. W. 1992. Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain proteins. In Linskens, H. F. - Jackson, J. F.: seed analysis, Verlin, Heidelberg, Springer – Verlag, 1992, s. 17 – 41.

Pod'akovanie

Táto práca bola riešená v rámci grantovej výskumnej úlohy VEGA č. 1/0471/09 „Genetické a molekulárne markery kvality cereálií a pseudocereálií“. Kolektív autorov ďakuje Génovej banke semenných druhov SR SCPV VÚRV v Piešťanoch za poskytnutie vzoriek.

Kontaktná adresa:

Ing. Eva Palenčárová, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KBB, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra. Tel.: 037 641 4679, E-mail: eva.palencarova@gmail.com

Prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KBB, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra. Tel.: 037 641 4596, E-mail: zdenka.galova@uniag.sk