

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERZITY V BRNĚ**



**Výzkumné centrum pro chemii životního prostředí a ekotoxikologii**

**OXIDATIVNÍ STRES V ROSTLINÁCH  
-  
REAKTIVNÍ RADIKÁLY A ANTIOXIDAČNÍ OCHRANA**

**Lenka Hudcovská**

Ročníková práce



**Brno, 2002**

## OBSAH

### A) TEORETICKÁ ČÁST

<b>1.Úvod</b>	4
1.1.Oxidativní stres	4
1.2.Fyziologické, biochemické a molekulární efekty ROS	5
<b>2.Mechanismus produkce ROS</b>	6
2.1.Volné radikály a jejich charakteristika	6
2.1.1.Radikál oxidu dusnatého	7
2.1.2.Superoxidový radikál	7
2.1.3.Hydroxylový radikál	8
2.1.4.Peroxid vodíku	8
2.2.Zdroje radikálů	9
2.2.1.Chloroplasty	9
2.2.2.Mitochondrie	10
2.2.3.Peroxisomy	11
2.2.4.Expozice ze vzduchu	11
2.2.5.Sluneční záření	11
2.2.6.Vliv teploty	11
2.2.7.Oxidativní stres – interakce patogenů	12
<b>3.Fyziologický význam ROS</b>	13
<b>4.Ochrana proti radikálům</b>	14
4.1.Katalasy	15
4.2.Superoxiddismutasa (SOD)	15
4.3.Glutathion (GSH)	15
4.4.Glutathionperoxidasa (GPx)	17
4.5.Glutathionreduktasa (GR)	18
<b>5.Ekotoxikologické studie</b>	20

### B) PRAKTICKÁ ČÁST

<b>1. Metodika stanovení GSH</b>	23
1.1. Metoda Glyoxalasa I	23
1.2. o-ftaldialdehydová metoda	24
1.3. Stanovení pomocí DTNB	24
<b>2. Kalibrace GSH</b>	25
<b>3. Závěr</b>	29
<b>Seznam zkratk</b>	30
<b>Literatura</b>	31

## **A)TEORETICKÁ ČÁST**

## **1.ÚVOD**

Oxidativní stres je stav, kdy v buňce dojde k narušení redoxní rovnováhy přímou produkcí reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), nebo inhibicí antioxidačních látek. Jeho důsledkem je poškození důležitých makromolekul (proteiny, lipidy, DNA), což vede k narušení fyziologie buňky, apoptóze nebo nekróze buněk, rozvoji nádorů a k řadě dalších onemocnění. Některé látky ze skupiny environmentálních polutantů (chinony, peroxidy apod.) mohou být induktory oxidativního stresu v buněčných systémech různých skupin organismů.

### **1.1.Oxidativní stres**

Problematika stresu u rostlin je složitější než u živočichů. Je to dáno nejen jejich přisedlým způsobem života, který neumožňuje únik před působením stresorů (nepříznivé působení jednotlivých faktorů prostředí), ale také tím, že u rostlin je mnohem větší mezidruhová variabilita i heterogenita vnitřního prostředí (buněk, pletiv).

Výzkum vztahů mezi vnějším prostředím a stresem v rostlinách začíná studiem přenosu podnětů vyvolávající stres na rozhraní orgánů rostliny s vnějším prostředím, a dále pak přenosem signálů uvnitř rostliny. Stresové faktory, ať už fyzikálně-chemické nebo biologické, mohou pronikat do vnitřního prostředí rostlin různých druhů nestejně snadno, a to v důsledku různě vyvinutých ochranných struktur.

Bezprostředně po začátku působení stresového faktoru dochází k narušení buněčných struktur a funkcí. Pokud intenzita působení stresoru nepřekročí letální úroveň, dochází k mobilizaci kompenzačních mechanismů, které směřují ke zvýšení odolnosti rostliny vůči působícím faktorům. Ne vždy toto zvýšení má trvalý charakter. Při dlouhodobém a intenzivním působení stresového faktoru může být vystřídáno dalším poklesem. Působení stresorů však může na druhé straně podmiňovat průběh důležitých morfogenetických procesů, např. klíčení či tvorbu květních orgánů, a tím zvýšit reprodukční schopnosti.

Studium stresu u rostlin rostoucích v přírodních podmínkách je také komplikováno tím, že často více stresových faktorů působí současně (silné záření, vysoká teplota, aj.). Interakce mezi nimi mohou podstatně měnit charakter stresové reakce ve srovnání s působením každého faktoru odděleně. Působení stresorů bývá také často omezeno pouze na

část rostliny, ve které dochází k lokální stresové reakci, ale ta může druhotně způsobit stres i v ostatních orgánech.

## **1.2.Fyziologické, biochemické a molekulární efekty ROS**

Většina biologických systémů produkuje reaktivní kyslíkové radikály. Buňky mají vyvinuté enzymatické a neenzymatické systémy pro tvorbu kyslíkových radikálů a mechanismy pro opravu poškození. Pokud převládá proces obnovy ROS, pak vzniká oxidativní stres buněk.

Nízká koncentrace kyslíkových radikálů nastává během mírného oxidativního stresu nebo v buňkách vzdálených od místa vzniku radikálů. Nejznámější antioxidantní odpověď zahrnují antioxidantní enzymy, jako jsou superoxid dismutasa (SOD, Herouart et al. 1997), katalasy (Willekens et al. 1994a), glutathionperoxidasa (Eshdat et al. 1997) a glutathion-S-transferasa (Levine et al. 1994) a také glutathion, askorbát.

SOD společně s katalasou odstraňují ROS z biologických systémů. Kromě toho, katalasa přeměňuje  $H_2O_2$  ve vodu. Podobně askorbátperoxidasa působí společně s glutathionreduktasou. Koordinovaná indukce všech antioxidantních enzymů je nutná pro rychlou redukci oxidativního poškození (Van Camp et al. 1996). Peroxidasy využívající  $H_2O_2$ , efektivně snižují jeho koncentraci. Také glutathion-S-transferasa se účastní opravy oxidativního poškození (Knoerker et al. 1996, Levine et al. 1994).

Chemické a biochemické efekty ROS jsou popsány obecně (Halliwell and Gutteridge 1989, Wojtaszek 1997). ROS reagují s různými biologickými molekulami, včetně lipidů, proteinů, nukleových kyselin a s několika malými molekulami.

## **2.MECHANISMUS PRODUKCE ROS**

Stresové reakce rostlin jsou neodmyslitelně spojeny se zvýšenou tvorbou aktivních forem kyslíku (singletní kyslík, superoxidový radikál, hydroxylový radikál a peroxid vodíku), ale současně i se zvýšením potenciálu pro jejich odstraňování. Mechanismus jejich vzniku i způsob odstraňování je různý. Také úloha těchto látek v rostlinách je značně rozmanitá a do jisté míry rozporná. Jednak vznikají jako nebezpečné produkty při působení řady stresových faktorů, jednak mohou mít kladnou úlohu jako signály či ochranné látky při některých typech stresů, a proto je důležité, udržovat jejich koncentraci na určité úrovni.

### **2.1.VOLNÉ RADIKÁLY A JEJICH CHARAKTERISTIKA**

Volné radikály jsou molekuly nebo ionty obsahující nepárový elektron. Radikály mohou vznikat z neradikálových molekul při elektron-transportních reakcích, kdy dochází ke ztrátě nebo příjmu jednoho elektronu. Také homolytické štěpení kovalentních vazeb vede ke tvorbě volných radikálů. Energie na rozbití této vazby je získána z elektromagnetického záření nebo při vysoké teplotě.

Důležitým zdrojem volných radikálů v biologických systémech je molekulový kyslík. ROS jsou obecně velmi reaktivní molekuly. Při jejich reakcích mohou vznikat neradikálové molekuly s kovalentní vazbou, ale také jiné radikálové produkty. Hlavní zdroje ROS ukazuje tabulka 1.

<b>Molekula ROS</b>	<b>Hlavní zdroj</b>
Superoxid ( $O_2^{\cdot -}$ )	Únik elektronů z dýchacího řetězce Aktivace fagocytů Xantinoxidasa Flavoenzymy
Peroxid vodíku ( $H_2O_2$ )	Dismutací $O_2^{\cdot -}$ reakcí katalyzovanou SOD NADPH-oxidasa (neutrofilny) Glukosoxidasa Xantinoxidasa
Hydroxylový radikál ( $\cdot OH$ )	Z $O_2^{\cdot -}$ a $H_2O_2$ reakcí s přechodnými kovy (Cu a Fe)
Oxid dusnatý (NO)	NOsynthasa

**Tab. 1** Hlavní zdroje reaktivních derivátů kyslíku v buňce a dalších látek vyvolávající oxidativní stres.

### **2.1.1.Radikál oxidu dusnatého**

NO je bezbarvý plyn, který vzniká působením redukujících látek na roztok kyseliny dusičné:  $8HNO_3 + 3Cu \rightarrow 2NO + 3Cu(NO_3)_2 + 4H_2O$ . Se vzdušným kyslíkem se okamžitě slučuje na oxid dusičitý  $NO_2$ .

Volný radikál oxidu dusnatého  $NO\cdot$  je syntetizován z aminokyseliny L-argininu v různých buňkách, např. cévní endoteliální buňky, fagocyty a v některých nervových buňkách. NO má důležitou úlohu ve fyziologii, rozšiřuje cévy a slouží jako neurotransmiter. V některých savčích buňkách se podílí na zabíjení parazitů makrofágy.

V menším množství se nachází i u rostlin, ale nemá asi takový význam jako u zvířat.

### **2.1.2.Superoxidový radikál**

$O_2^{\cdot -}$  je nejvíce prostudovaný volný radikál, který vzniká přijmutím jednoho elektronu:  $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot -}$ . Tyto radikály mohou vznikat při metabolické aktivitě včetně elektron-transportního řetězce, nebo mohou být indukovány vnějšími vlivy – ozon, UV-B a  $\gamma$  záření aj. Vzniká také ve fagocytujících buňkách (neutrofilny, monocyty, makrofágové, eosinofily) a pomáhá ničit viry a bakterie, nebo vzniká při chemických haváriích.

Superoxidový radikál je jedinečný, protože z něho můžou vznikat jiné volné radikály, včetně hydroxylového radikálu (Esterbauer et al. 1986, Pryor 1984), peroxid vodíku a

hydroperoxidový radikál ( $\text{HO}_2\cdot$ ). V kyselém prostředí  $\text{O}_2^{\cdot-}$  snadno přechází na  $\text{H}_2\text{O}_2$ . V neutrálním a vyšším pH je dismutace  $\text{O}_2^{\cdot-}$  katalyzována superoxiddismutasou (SOD, Fridovicí 1975, Gregory et al. 1973).

### **2.1.3. Hydroxylový radikál**

Hydroxylový radikál je potenciálně nejsilnější oxidant vyskytující se v biologických systémech. Snadno reaguje s různými molekulami. Tyto radikály vznikají rozkladem  $\text{H}_2\text{O}_2$  Fentonovou reakcí:  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ , nebo vznikají interakcí superoxidu s peroxidem vodíku Haber-Weissovou reakcí (Haber and Weiss 1934):

$\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ . Hydroxylový radikál vzniká také při reakci  $\text{H}_2\text{O}_2$  s ionty přechodných kovů:  $\text{Cu}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cu}^{2+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ .

### **2.1.4. Peroxid vodíku**

Je to velmi slabá kyselina obsahující vazbu  $-\text{O}-\text{O}-$ . V čistém stavu i ve vodném roztoku je poměrně stálý. Katalytickým účinkem některých látek (platiny, stříbra, alk. luhů...) se jeho rozklad urychluje.

$\text{H}_2\text{O}_2$  vzniká při oxidaci superoxidového radikálu, reakce je katalyzována superoxiddismutasou:  $2 \text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ .

Peroxid vodíku není pokládán za volný radikál kyslíku. Patří ale mezi biologicky významné oxidanty. Reakcí s přechodnými kovy vzniká vysoce reaktivní hydroxylový radikál (Aruoma et al. 1991).

$\text{H}_2\text{O}_2$  má i pozitivní vliv, podílí se na dlouhodobé fyziologické odpovědi rostlin, která se nazývá systematicky získaná rezistence (SAR, Chen et al. 1993).  $\text{H}_2\text{O}_2$  indukuje biosyntézu kyseliny salicylové (Neueschwander et al. 1995), která je důležitou molekulou pro SAR (Bi et al. 1995).

## 2.2. Zdroje radikálů

Rostliny jsou více vystaveny působení přírodních faktorů než jiné organismy a jsou tudíž i více náchylné k oxidativnímu poškození (Elstner and Osswald 1994, Foyer et al. 1994a, Hippeli and Elstner 1996). Mezi faktory, které přispívají k oxidativnímu stresu v rostlinách, patří fotosyntéza (Heber et al. 1996, Polle 1996), expozice buněk atmosférickým kyslíkem (Foyer 1997), sluneční záření (hlavně UV, Hideg and Vass 1996), změna teploty (Hippeli and Elstner 1996, Wise 1995), patogeny (Edlich et al. 1989, Tiedemann 1997), vzdušné polutanty (ozon, SO<sub>2</sub>), kovy aj.

Největší množství aktivních forem kyslíku se vytváří v chloroplastech, vznikají i v mitochondriích a v jiných membránových systémech (plazmalema, tonoplast, peroxizomy, glyoxyzomy). Ve většině případů jako redukční činidlo slouží NAD(P)H ve spojení s příslušnou NAD(P)H oxidasou.

### 2.2.1. Chloroplasty

Chloroplasty jsou metabolicky aktivní organely, v nichž probíhá proces fotosyntesy. Stejně jako mitochondrie mají vnější a vnitřní membránu. Prostor uzavřený vnitřní membránou, **stroma**, obsahuje mnoho rozpustných enzymů. Vnitřní membrána tvoří křivky, ale stroma uzavírá třetí membránový systém, tvořící navzájem spojené sady diskovitých váčků, zvaných **thylakoidy**, které obsahují fotosyntetický pigment **chlorofyl**. Chlorofylem zachycenou světelnou energii používají thylakoidy k tvorbě ATP a to je využíváno při biosyntetických pochodech.

Osvětlený chloroplast vytváří O<sub>2</sub><sup>-</sup> a následně H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Je odhadováno, že přibližně 10-20% elektronů, které projdou přes fotosystém I, redukuje O<sub>2</sub> na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

V chloroplastech se rychle mění O<sub>2</sub><sup>-</sup> na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> působením superoxiddismutasy (SOD, Baum and Scandalios 1979, Hayakawa et al. 1984). Například, O<sub>2</sub><sup>-</sup> může reagovat se dvěma molekulami NAD(P)H za vzniku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nadezhdin and Dunford 1979). Také elektrony přímo z elektrontransportního řetězce fotosystému mohou redukovat O<sub>2</sub><sup>-</sup> na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Allen 1975).

Chloroplasty eliminují H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> přes askorbátglutathionový cyklus (Halliwell 1987). V tomto cyklu askorbátperoxidasa redukuje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na vodu a dehydroaskorbát. Askorbátreduktasa využívá GSH k redukci dehydroaskorbátu a k obnově askorbátu. GSH je následně obnoven působením glutathionreduktasy, využívající redukovaných ekvivalentů

z NAD(P)H. Chloroplasty mohou mít nadměrnou kapacitu pro degradaci  $\text{H}_2\text{O}_2$  a mohou hrát roli v obnově redukovaného  $\text{H}_2\text{O}_2$  v jiných subbuněčných kompartmentech.

Byly izolovány chloroplasty, které mohou rychle eliminovat  $\text{H}_2\text{O}_2$  z 5mM roztoku  $\text{H}_2\text{O}_2$  během několika minut (Asada and Nakano 1980).

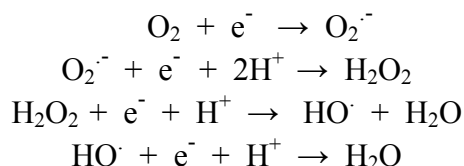
### 2.2.2.Mitochondrie

Mitochondrie jsou místem oxidačního metabolismu eukaryot. Mají dvě membrány: hladkou vnější membránu a vysoce zprohýbanou vnitřní membránu, jejíž invaginace se jmenují **kristy**.

Mitochondrie obsahují enzymy, tj. pyruvátdehydrogenasu, enzymy citrátového cyklu, enzymy katalyzující oxidaci mastných kyselin, enzymy a redoxní proteiny podílející se na transportu elektronů a oxidační fosforylaci. Tyto enzymy jsou většinou integrovány do vnitřní mitochondriální membrány.

Zde je produkce  $\text{H}_2\text{O}_2$  spojena s respirací. Mitochondriální respirace zahrnuje čtyři po sobě jdoucí jednoelektronové redukce. Dochází tak k formaci částečně redukovaných intermediátů jako je superoxid, peroxid vodíku a hydroxylové radikály, které mohou být prooxidanty.

Redukce molekuly kyslíku:



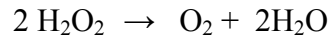
Dojde-li k rozpojení dýchacího řetězce účinkem některých xenobiotik, mohou tyto redukované formy kyslíku unikat do cytosolu a zvýšit koncentraci ROS v buňce.

$\text{O}_2^{\cdot-}$  je prekurzorem  $\text{H}_2\text{O}_2$  v mitochondriích. Ubichinon a ubisemichinon redukuje  $\text{O}_2$  na  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Cadenas and Boveris 1980).  $\text{O}_2^{\cdot-}$  neproniká přes membránu a hromadí se v mitochondriích. Mitochondriální specifický izoenzym SOD odbourává  $\text{O}_2^{\cdot-}$  na  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{O}_2$  (Fridovich 1975, Baum and Scandalios 1979).

V savčích systémech obnova  $\text{H}_2\text{O}_2$  může být částečně metabolizována glutathionperoxidasou. Důkazem je to, že významná část mitochondriálně obnoveného  $\text{H}_2\text{O}_2$  difunduje mimo mitochondrie a je odbouráván jinými systémy (Oshino et al. 1975). Kromě toho, mitochondrie obsahují katalasy, které přímo inaktivují  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Radi et al. 1994).

### 2.2.3.Peroxysomy

Jsou to organely obklopené membránou, které obsahují oxidační enzymy. Některých reakcí peroxysomů se účastní peroxid vodíku, reaktivní látka, která je využívána při enzymových oxidacích jejich sloučenin nebo degradována v reakci enzymem katalasou:



Úkolem peroxysomů je chránit citlivé části buňky před oxidací peroxidem.

Některé rostliny obsahují specializované typy peroxysomů, tzv. **glyoxysomy** (Beevers 1982).

### 2.2.4.Expozice ze vzduchu

Koncentrace kyslíku v daném pletivu závisí na difúzi, rozpustnosti a spotřebě. V rostlinných pletivech je neustálá obnova kyslíku během fotosyntézy, krátká difúzní vzdálenost vzdušného kyslíku vzhledem ke struktuře listu nebo přítomnost průduchů, to vše přispívá k vyšší dostupnosti kyslíku do vzdušných částí rostliny.

### 2.2.5.Sluneční záření

Kromě toho, že záření poskytuje energii pro fotosyntézu, může také produkovat molekuly, z nichž se tvoří radikály. Například, UV záření může vyvolat homolytické štěpení  $\text{H}_2\text{O}_2$ , při němž vznikají dva hydroxylové radikály. (Hippeli and Elstner 1996). Při absorpci světla flaviny a jinými tetrapyroly může být obnoven řetězec radikálové reakce a poškození pletiv v listech. U rostlin s nižší hladinou katalasy vznikají při vysoké intenzitě světla nekrotická poškození (Chamnongpol et al. 1996). Rostliny s redukovanou aktivitou katalasy hromadí v sobě ROS, jako výsledek poklesu produkce  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Většina radikálů je odstraněna specifickými enzymy, nekrotické poškození závisí také na intenzitě a délce trvání slunečního záření.

### 2.2.6.Vliv teploty

Delší expozice rostlin nízkými teplotami (4-7°C) způsobuje poškození nazývané zmrznutí. Tento efekt nízkých teplot je nejvíce pozorovatelný u rostlin tropického a subtropického původu. Zmrznutí je výsledkem fotooxidativního poškození. Během zmrznutí

rostlin narůstá produkce aktivních kyslíkových radikálů a mění se charakter membrán. Výsledkem poruchy pružnosti membrány vlivem teploty může být změna uspořádání membránových proteinů nebo pronikání elektronů (Prasad 1996).

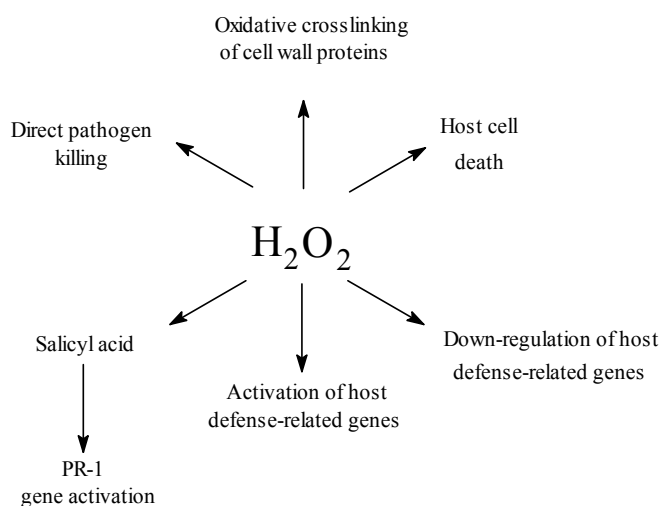
### **2.2.7.Oxidativní stres – interakce patogenů**

Při napadení rostliny patogeny reaktivní formy kyslíku poškozují membrány a vznikají tkáňové nekrosy (Doke 1996, Godiard et al. 1994). Patogenní bakterie nebo houby produkují zvláštní látky, např. cercosporin (houba *Cercospora*), které nepoškozují hostitelskou rostlinu, ale mohou být jen fotoaktivovány. Sluneční záření vyvolává chemické reakce s kyslíkem a tvoří se singletní kyslík, který způsobuje další oxidativní poškození membrán. Produkce aktivních kyslíkových radikálů může být částečně způsobena obrannými mechanismy proti patogenům.

Toto bylo studováno na několika rostlinách. Pokusy s rýží ukazují, že buňky napadené tkáňe produkují superoxid (Doke et al. 1996), také buňky *Arabidopsis* produkují superoxid za přítomnosti bakteriálního proteinu harpinu (Desikan et al. 1996), v suspenzi ze sójových bobů můžeme měřit množství  $H_2O_2$  (Legendre et al. 1993).

### 3.FYZIOLOGICKÝ VÝZNAM ROS

Protistresová úloha aktivních forem kyslíku dosud není uspokojivě prozkoumána ve všech souvislostech. Peroxid vodíku a jiné ROS mohou sloužit jako antibiotika, zvláště při napadení rostliny patogeny (Tab.2, Apostol et al. 1989). Aktuální toxicita těchto radikálů závisí na koncentraci přítomných ROS a na citlivosti patogenů vůči těmto koncentracím.



**Obr.1.** A central role for hydrogen peroxide in defense responses of plants to pathogen infection. The responses shown have been demonstrated in different plant species and may not all occur within a given species.

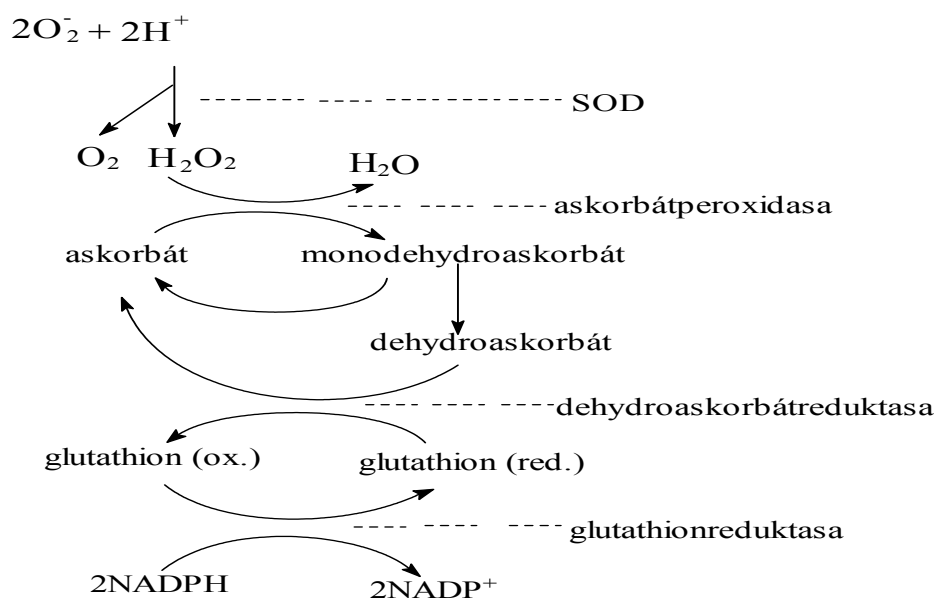
Peroxid vodíku je zapojen i do dalších obranných reakcí rostliny při napadení patogeny. Stimuluje otevření vápníkových kanálů a vtok  $\text{Ca}^{2+}$  má dalekosáhlé aktivační následky. V součinnosti s kyselinou salicylovou (ta je schopna inaktivovat katalasu a tím dočasně udržet zvýšenou koncentraci  $\text{H}_2\text{O}_2$  v buňce) indukuje tvorbu některých stresových proteinů. Funkce  $\text{H}_2\text{O}_2$  jako přenašeče signálu pro expresi některých genů je významná i u živočichů a bakterií. Regulační působení  $\text{H}_2\text{O}_2$  může být i nepřímé, a sice ovlivněním poměru mezi redukovanou (GSH) a oxidovanou formou glutathionu (GSSG). GSH vzhledem ke svému množství výrazně ovlivňuje redoxní poměry v buňce a jeho působení na aktivitu enzymů je dobře známo.

Regulovaná tvorba aktivních forem kyslíku může mít ovšem i přímý antimikrobiální účinek a může také významně přispívat ke zpevnění buněčné stěny a tím i k větší odolnosti vůči různým stresovým faktorům.  $\text{H}_2\text{O}_2$  je jednak nezbytným činidlem při tvorbě ligninu z fenylpropanoidních alkoholů, jednak se podílí na vzniku pevných vazeb mezi proteiny v buněčné stěně a na zvýšení jejich nerozpustnosti.

## 4.OCHRANA PROTI RADIKÁLŮM

Oxidativní stres vede ke tvorbě kyslíkových radikálů. Zvyšující se koncentrace těchto ROS vede k oxidativnímu poškození rostlin. Pokud intenzita působení stresoru nepřekročí letální úroveň, dochází k mobilizaci ochranných mechanismů, které směřují ke zvýšení odolnosti rostliny vůči působícím faktorům. Tyto ochranné systémy jsou složeny z hydrofilních a lipofilních metabolitů s antioxidantními vlastnostmi (askorbát, glutathion,  $\alpha$ -tokoferol, karotenoidy), z enzymů, které se setkávají přímo s toxickými oxidanty (superoxiddismutasa, katalasy, peroxidasy) a z enzymů, které udržují zásobu antioxidantů v redukovaném stavu (dehydroaskorbátreduktasa, glutathionreduktasa). K nejdůležitějším enzymům ochranného systému patří superoxiddismutasa (SOD).

SOD katalyzuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku, katalasy a glutathion (GSH). Ten je dále rozkládán buď katalasou (především v peroxisomech a glyoxisomech), nebo askorbát peroxidasou (zejména v chloroplastech, kde chybí katalasa, někdy i v cytosolu jinými typy peroxidas). K reakci katalyzované askorbátperoxidasou je nutný askorbát a k regeneraci vznikajícího dehydroaskorbátu také redukovaná forma GSH, společně s enzymy dehydroaskorbátreduktasou a glutathionreduktasou. Klíčovou úlohu v antioxidantní ochraně hrají askorbát a glutathion. Obou sloučenin bývá zejména v chloroplastech velké množství.



**Obr.2.** Schéma inaktivace superoxidu a peroxidu vodíku s navazujícími regeneračními cykly askorbátu a glutathionu s finální redukcí pomocí NADPH. Tento komplex redoxních reakcí se označuje jako Halliwell-Ashadova cesta.

#### **4.1.KATALASY**

Jsou to důležité enzymy antioxidantivní ochrany proti radikálům. Rozkládají  $H_2O_2$  na vodu a kyslík (Cheng et al. 1981) společně s glutathionperoxidasou (Gpx). Tento rozklad je přímo úměrný koncentraci enzymu a koncentraci substrátu. Je to důležité, pokud porovnáváme různé systémy.

Oba enzymy mají různou substrátovou afinitu. Katalasy mají velmi vysoké maximum katalytického poměru, ale mají nízkou substrátovou afinitu. Pokud je v buňce nízká hladina  $H_2O_2$ , organické peroxidy jsou katalyzované peroxidasami.

#### **4.2.SUPEROXIDDISMUTASA**

Je to enzym, který katalyzuje dismutaci superoxidových radikálů na peroxid vodíku a kyslík:  $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$  (Fridovich 1985). U vyšších rostlin se podílí na odstranění toxikace způsobené kyslíkovými radikály.

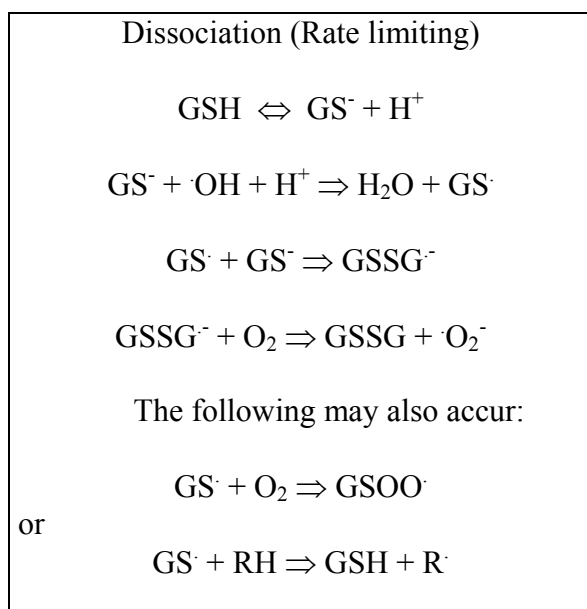
SOD můžeme rozdělit do tří tříd podle toho, který kov obsahuje – Cu/Zn SOD, MnSOD a FeSOD. MnSOD se nachází v mitochondriích, peroxisomech a glyoxisomech (delRio and Donaldson 1995), FeSOD v plastidech, peroxisomech a mitochondriích (Salin 1988) a Cu/ZnSOD je přítomná v chloroplastech a cytosolu (Jackson et al. 1978, Asada 1992).

#### **4.3.GLUTATHION**

GSH je tripeptid ( $\gamma$ -glu-cys-gly) obsahující neobvyklou  $\gamma$ -amidovou vazbu. Některé rostliny obsahují tripeptidové homology GSH, kde je koncový gly nahrazen jinou aminokyselinou. Jsou to  $\gamma$ -glu-cys- $\beta$ -ala (homoglutathion, Klapheck 1988),  $\gamma$ -glu-cys-ser (hydroxymethylglutathion, Klapheck et al. 1992) a  $\gamma$ -glu-cys-glu (Meuwly et al. 1993).

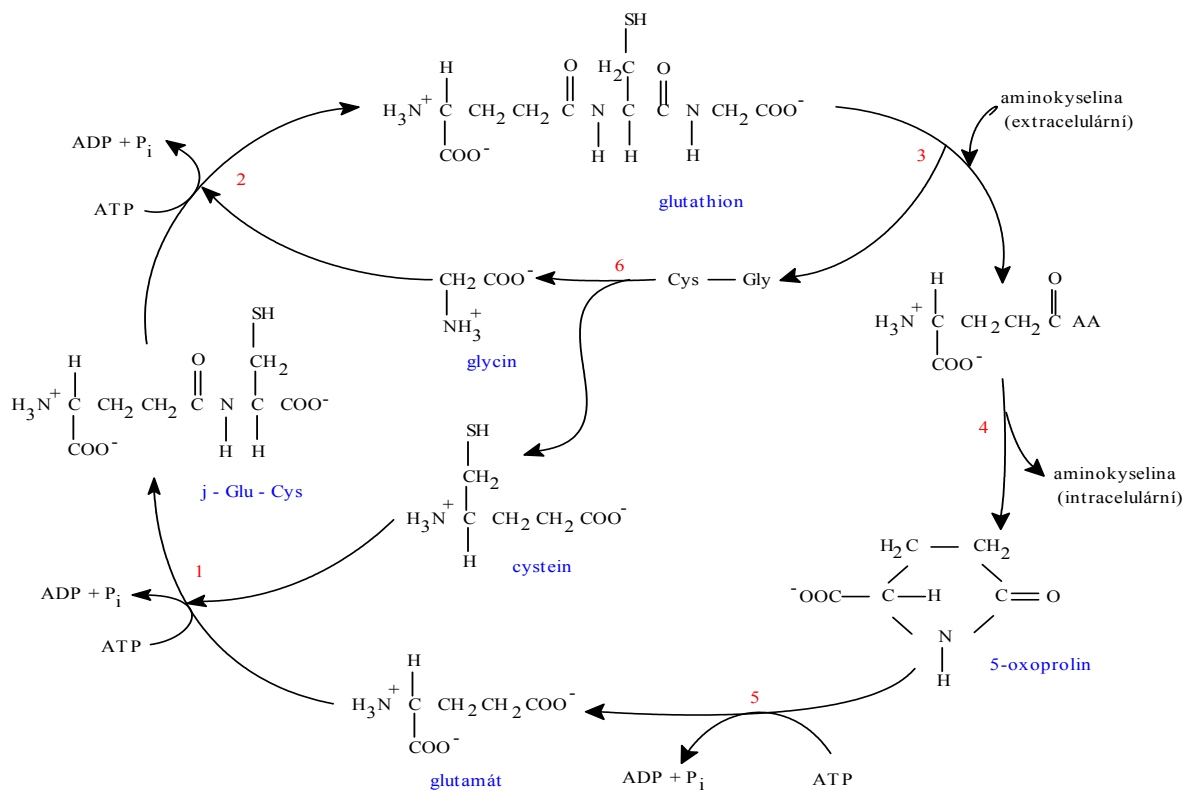
Fyziologický význam GSH v rostlinách lze rozdělit na dvě skupiny: 1)metabolismus síry. Glutathion je převládající neenzymatický thiol, který reguluje absorpci síry kořeny (Herschbach and Rennenberg 1994, Lappartient and Touraine 1996), 2)využití GSH-S-transferasy pro detoxikaci xenobiotik (cizorodé látky), 3) je prekurzorem pro fytochelatinu, které jsou důležité pro kontrolu koncentrace těžkých kovů v buňkách. GSH slouží tedy jako důležitý antioxidant a redoxní pufr (Foyer and Halliwell 1977, Law et al. 1983). Podílí se také

na biosyntéze leukotrienů a rovnováha mezi jeho redukovanou (GSH) a oxidovanou (GSSH) formou napomáhá udržovat správný oxidační stav sulfhydrylových skupin proteinů uvnitř buněk. Glutathion se podílí na tvorbě a odstraňování některých volných radikálů (viz obr.3).



**Obr.3.** Reactions of reduced glutathione (GSH).

Glutathion také působí také jako koenzym v několika enzymových redukcích a hraje důležitou úlohu v přenosu aminokyselin do určitých buněk. GSH je nejprve přenesen na vnější stranu membrány, kde se jeho  $\gamma$ -glutamylová skupina přenesne na nějakou aminokyselinu.  $\gamma$ -glutamylaminokyselina je transportována zpět do buňky, kde se ve dvou krocích uvolní transportovaná aminokyselina a přes 5-oxoprolin se opět vytvoří glutamát. Posledním krokem cyklu je hydrolýza oxoprolinu za spotřeby ATP. Tento rys reakce je dán neobvyklou stabilitou vnitřní amidové vazby 5-oxoprolinu (obr.4).



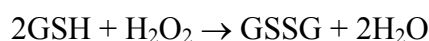
**Obr.4.** Syntéza GSH je součástí  $\gamma$ -glutamylového cyklu, jehož jednotlivé reakce jsou katalyzovány: **1.**  $\gamma$ -glutamylcysteinsynthetasou, **2.** glutathionsynthetasou, **3.**  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasou, **4.**  $\gamma$ -glutamylcyklotransferasou, **5.** 5-oxoprolinasou, **6.** vnitrobuněčnou proteinasou.

GSH je syntetizován v cytosolu a chloroplastech z glutamátu, cysteinu a glycinu za postupné katalýzy  $\gamma$ -glutamylcysteinsynthetasou a GSH-synthetasou. Volnou energii pro každou z reakcí poskytuje hydrolyza ATP. Rozklad je katalyzován  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasou,  $\gamma$ -glutamylcyklotransferasou 5-oxoprolinasou a proteinasou.

#### **4.4. GLUTATHIONPEROXIDASA**

Patří k důležitým enzymům antioxidantní ochrany proti kyslíkové toxikaci v organismu (Kappus and Sies 1981, Cohen and Doherty 1987). Nachází se v cytosolu a v mitochondriální matrix.

Glutathionperoxidáza katalyzuje redukci  $\text{H}_2\text{O}_2$  a organických hydroperoxidů:



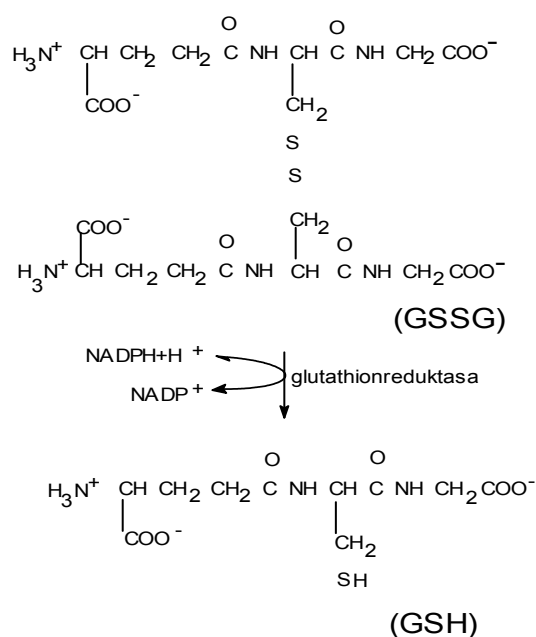
Rozlišujeme dva typy glutathionperoxidasy (Gpx), Se-závislé a Se-nezávislé. Oba enzymy se podílejí na ochraně proti radikálovému poškození během redoxní peroxidace. Se-závislé peroxidasy se nacházejí v cytosolu a vykazují nízkou kapacitu pro redukci  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### 4.5. GLUTATHIONREDUKTASA

Tento enzym katalyzuje oxidačně-redukční reakci. Tyto reakce jsou důležité pro metabolické procesy. GR postupně katalyzuje několik procesů zahrnující přenos elektronů.

GR je enzym patřící do skupiny disulfidové oxidoreduktasy. Všechny jsou přinejmenším diménní, na NAD(P)H závislé a FAD (flavinadenindinukleotid) obsahující enzymy, které ve většině případů obsahují disulfidovou skupinu s redoxní aktivitou.

GR je téměř všudypřítomný enzym, který katalyzuje na NADPH závislou redukci glutathiondisulfidu na glutathion.



**Obr.5.** Reakce glutathionreduktasy: redukce GSSG na GSH.

Tabulka 2 přehledně shrnuje dostupné informace o hlavních typech ROS, jejich zdrojích v rostlinných buňkách a biochemických mechanismech, které se podílejí na detoxikaci a odstraňování reaktivních radikálů.

**Tabulka 2.**

Hlavní typy radikálů, jejich zdroje v rostlinném organismu a mechanismy jejich odstraňování

ORGANELA	RADIKÁLY	OCHRANA	REAKCE
<b>mitochondrie</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> , ·OH	GPx SOD	$\text{O}_2 + \text{e}^- \rightarrow \text{O}_2^{\cdot-}$ $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{e}^- + \text{H}^+ \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ $\cdot\text{OH} + \text{e}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}$
<b>chloroplasty</b>	O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	SOD katalasa GSH askorbát	$2 \text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
<b>peroxysomy</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	katalasa GPx	$2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$

## 5.EKOTOXIKOLOGICKÉ STUDIE

Ekotoxikologické studie, ve kterých se studovaly mechanismy působení reaktivních radikálů na živé organismy zahrnují jak *in vitro* tak i *in vivo* testy. Existují studie jak s živočišnými tak rostlinnými druhy.

Nejvíce informací o mechanismech oxidativního stresu bylo získáno z živočišných modelů. Jako testovací organismy se používají z bezobratlých a obratlovců Daphnie, Pstruh duhový, Drosophila, Sumeček skvrnitý (*Ictalurus punctatus*), Okounek pstruhový (*Micropterus salmoides*), Kapr obecný (*Cyprinus carpio*), Treska obecná (*Gadus morhua*), Mečoun obecný (*Xiphias gladius*), krysy.

Jako příklad studie oxidativního stresu u přírodních organismů, lze zmínit práci s *Daphnia magna* (Borgeraas 2000) nebo *Daphnia longispina* (Vega 2000). Organismus byl vystaven působení UV-A a UV-B záření. Byla zkoumána aktivita antioxidantních enzymů a lipidní peroxidace. Výsledkem byly rozdíly v letalitě, způsobené UV-A a UV-B zářením. Po 2h expozice UV-B zářením bylo mrtvých 80% jedinců, zatímco po expozici UV-A zářením zemřelo asi jen 20% jedinců. Obě záření způsobují nárůst koncentrace malonaldehydu (MDA) a aktivita katalasy. Nárůst antioxidantních enzymů může být dán reakčními mechanismy na oxidativní stres. Výsledky ukazují, že také planktonní organismy jako je *Daphnia*, mají mechanismy proti fotooxidativnímu stresu.

Při rešerši literárních podkladů v internetových databázích a dalších zdrojů lze najít i řadu prací studujícími parametry oxidativního stresu (nebo detoxikace související s oxidativním stresem) v rostlinných organismech.

Existují práce využívající Okřehek menší (*Lemna minor*), Jílek vytrvalý (*Lolium perenne*), Ječmen (*Hordeum*), Tabák (*Nicotiana tabacum*), Huseniček rolní (*Arabidopsis thaliana*), Jitrocel (*Plantago ovata*), Hrách setý (*Pisum sativum*), Žito (*Secale cereale*), Kukuřice (*Zea mays*), obiloviny. Řada prací byla zaměřena na oxidativní stres u řas nebo sinic. Dalé se jako testovací organismy užívají bakterie *Escherichia coli*, *Neurospora crassa* (houba) aj.

K často testovaným látkám patří herbicidy. Mnoho herbicidů působí v rostlinách přes tvorbu aktivních kyslíkových radikálů, běžně se používají jako modelové systémy pro studium způsobu činnosti fotooxidativního stresu a zvláště antioxidačních sloučenin, podílejících se na toleranci rostlin.

Např. herbicid paraquat, známý také jako methylviologen, způsobuje nárůst koncentrace  $O_2^{\cdot-}$ . Žito (*Secale cereale*) byla exponována narůstající koncentrací paraquatu. Došlo ke ztrátě aktivity katalasy, jenž byla degradována na  $O_2^{\cdot-}$  (Kono and Fridovich 1982). Při nedostatečné rovnováhy oxidativního stresu se paraquat ukládá a výsledkem jsou příznaky poškození rostlin jako pokles chlorofylu, nárůst lipidní peroxidace a větší propustnost membrán.

Na rostlinách se také testovalo působení teploty na produkci oxidativních radikálů. U ječmene, který byl vystaven působení vysokých teplot a záření, došlo k redukci ve fotosystému II a k lipidní peroxidaci. Katalasa je velmi citlivá k fotodegradaci a ke zvýšené teplotě (Mattersand Scandalios 1986b, Volk and Feierabend 1989, Streb et al. 1993). Po ozáření jak vysokými tak i nízkými teplotami došlo k úplnému vyčerpání katalasy. Tyto poklesy v substrátové specifitě a aktivitě důležitých antioxidačních enzymů ukazují, že vysoké teploty způsobují fotooxidativní stres u rostlin, různý stupeň poškození a ztrátu schopnosti detoxikace aktivních forem kyslíku.

## **B)PRAKTICKÁ ČÁST**

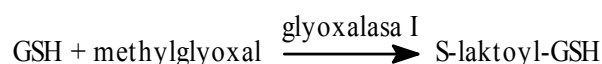
## 1. METODIKA STANOVENÍ GSH

GSH je tripeptid ( $\gamma$ -glu-cys-gly) obsahující neobvyklou  $\gamma$ -amidovou vazbu. Nachází se jak v rostlinných tak i v živočišných buňkách, kde má nezastupitelnou úlohu (viz. teoretická část, kap. 4.3.).

Glutathion můžeme stanovit pomocí několika metod, např. metoda Glyoxalasa I, o-ftaldialdehydová metoda, stanovení GSH pomocí DTNB aj. metody.

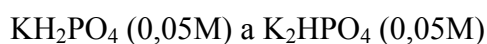
### 1.1. Metoda Glyoxalasa I

Princip: Redukovaný GSH se specificky mění Glyoxalasu I podle reakce:



Formování reakčních produktů můžeme pozorovat při 240nm (Akerboom and Sies 1981).

Činidla - pufr: 0,05M draselnofosfátový, pH = 7, připravuje se ze zásobního roztoku



- methylglyoxal, 110mM: ředit 20 $\mu$ l methylglyoxalu v 1ml pufru

- Glyoxalasa I

Postup: Do kyvety se pipetuje: 1ml pufru, vzorek obsahuje 2-100mM GSH, a 2 $\mu$ l glyoxalasy I.

Vše se smíchá a sledujeme absorbanci při 240nm, reakce je zahájena přidáním 20 $\mu$ l methylglyoxalu. Vzorky obsahují nízkou koncentraci GSH.

## 1.2. o-ftaldialdehydová metoda

Princip: GSH vytváří fluorescentní komplex s o-ftaldialdehydem (OPT), který prokazuje excitační max. při 350nm a emisní max. při 420nm. Fluorescence je úměrná množství GSH (Akerboom and Sies 1981).

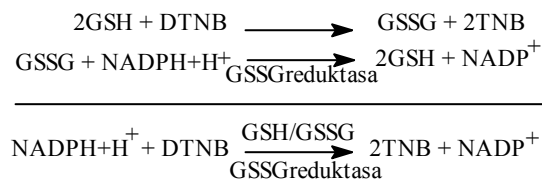
Činidla - pufr: 0,1M draselnofosfátový a 0,005M EDTA, pH = 8

- o-ftaldialdehyd, 1mg/ml: rozpustit v methanolu a uchovávat ve tmě
- GSH, 0,1mM

Postup: Do kyvety pipetujeme: 1ml pufru a vzorek obsahující 0,2-20nmol GSH. Zapišeme základní čáru fluorescence. Teplotu vykalibrujeme na 25°C a přidáme 50μl OPT. Nárůst intenzity fluorescence můžeme ukončit po 15min. Test se kalibruje přidáním přibližně stejného množství GSH standardizovaného podle metody glyoxalasa I.

## 1.3. Stanovení pomocí DTNB

Princip: Počet redukovaných a oxidovaných forem GSH můžeme určit použitím kinetického testu, ve kterém množství GSH nebo GSSG a glutathionreduktasy vyvolá kontinuální redukci 5,5'- dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina) (DTNB) přes NADPH během následujících reakcí:



Poměr reakce je přímoúměrný koncentraci GSH při hodnotě 2μM. Tvorba TNB je sledována spektrofotometicky při 412nm. Citlivější test můžeme provést měřením NADPH fluorometricky (Akerboom and Sies 1981).

Činidla - pufr: 0,1M draselnofosfátový a 0,001M EDTA, pH = 7, připravuje se ze zásobního roztoku KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,1M) a K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,1M)

- 5,5'- dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina) (DTNB), 1,5mg/ml: DTNB rozpustit v 0,5% NaHCO<sub>3</sub> a uchovávat ve tmě
- NADPH, 4mg/ml: NADPH rozpustit v 0,5% NaHCO<sub>3</sub> a uchovávat při 4°C
- glutathionreduktasa, 6units/ml

- glutathiondisulfid (GSSG)

Postup: Do kyvety pipetujeme: 1ml pufru a 100 $\mu$ l vzorku, jenž obsahuje: 0,5-2nmol GSH, 50 $\mu$ l NADPH, 20 $\mu$ l DTNB a 20 $\mu$ l glutathionreduktasy. Vše smícháme a zapisujeme lineární nárůst absorbance při 412nm. Připravíme si blank (bez GSH) a současně měříme i jeho absorbanci při 412nm. Na kalibraci se použije 100 $\mu$ l GSSG místo vzorku.

Protože test je kalibrován se standardem, množství ve vzorku musí být v rozmezí, ve kterém je reakční poměr lineárně souvislý se standardní koncentrací GSSG. Reakční poměr není závislý pouze na koncentraci GSSG, ale také na aktivitě glutathionreduktasy.

## **2.KALIBRACE GSH**

### CHEMIKÁLIE

GSH (různá ředění).....připravit zásobní roztok 1mM (3,07mg/10ml)

DTNB..... připravit zásobní roztok 39,6mg/10ml

PBs

m(GSH) = 0,7mg

rozpustit v 2,3ml PBs

m(DTNB) = 8,8mg

rozpustit v 2,2ml CH<sub>3</sub>OH

### **Ředění 1 : 9**

a) 10 $\mu$ l GSH  
90 $\mu$ l PBs

b) 160 $\mu$ l PBs  
20 $\mu$ l GSH  
20 $\mu$ l DTNB

### **Ředění 1 : 4**

a) 10 $\mu$ l GSH  
40 $\mu$ l PBs

b) 160 $\mu$ l PBs  
20 $\mu$ l GSH  
20 $\mu$ l DTNB

### **Ředění 1 : 1**

a) 30 $\mu$ l GSH  
30 $\mu$ l PBs

b) 160 $\mu$ l PBs  
20 $\mu$ l GSH  
20 $\mu$ l DTNB

### **Blank:**

180 $\mu$ l PBs

20 $\mu$ l DTNB

## Výsledky měření:

Date: 7.10.02  
Time: 12:20

Measurement mode: Absorbance  
Measurement wavelength: 412 nm  
Read mode: Accuracy  
Shake duration (Outside Normal): 10 s

### Rawdata

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	0,3320	0,3160	0,3090	0,3150	0,2620	0,2950	0,3080	0,3010	0,2680	0,2690	0,2850
B	0,3230	0,2710	0,2750	0,2600	0,2750	0,3070	0,2850	0,3040	0,2530	0,2760	0,2820
C	0,2990	0,2830	0,2560	0,2940	0,2870	0,2870	0,2970	0,2380	0,2660	0,2940	0,2750
D	0,3970	0,2790	0,2850	0,2960	0,3020	0,2870	0,2710	0,3050	0,2790	0,2870	0,2760
E	0,3460	0,2870	0,2530	0,2720	0,2660	0,2330	0,2740	0,2820	0,2750	0,2790	0,2280
F	0,3820	0,2960	0,2660	0,2810	0,2740	0,3120	0,3090	0,2850	0,2800	0,2730	0,2670
G	0,5380	0,3870	0,3170	0,3100	0,2900	0,2860	0,2670	0,2750	0,2590	0,2800	0,2560
H	0,4840	0,3760	0,2960	0,3080	0,2690	0,2740	0,2590	0,2660	0,2900	0,2900	0,2710
H	0,4970	0,3550	0,3230	0,3550	0,2980	0,2890	0,2700	0,2950	0,2920	0,2700	0,2680

### ředění 1:9

c(μM)	A	A	A
1,E+01	0,3320	0,3230	0,2990
1,E+00	0,3160	0,2710	0,2830
1,E-01	0,3090	0,2750	0,2560
1,E-02	0,3150	0,2600	0,2940
1,E-03	0,2620	0,2750	0,2870
1,E-04	0,2950	0,3070	0,2870
1,E-05	0,3080	0,2850	0,2970
1,E-06	0,3010	0,3040	0,2380
1,E-07	0,2680	0,2530	0,2660
1,E-08	0,2690	0,2760	0,2940
blank	0,2850	0,2820	0,2750

### ředění 1:4

c(μM)	A	A	A
20	0,3970	0,3460	0,3820
4	0,2790	0,2870	0,2960
0,8	0,2850	0,2530	0,2660
0,16	0,2960	0,2720	0,2810
0,032	0,3020	0,2660	0,2740
0,0064	0,2870	0,2330	0,3120
0,0013	0,2710	0,2740	0,3090
0,0003	0,3050	0,2820	0,2850
0,0001	0,2790	0,2750	0,2800
0,00001	0,2870	0,2790	0,2730
blank	0,2760	0,2280	0,2670

### ředění 1:1

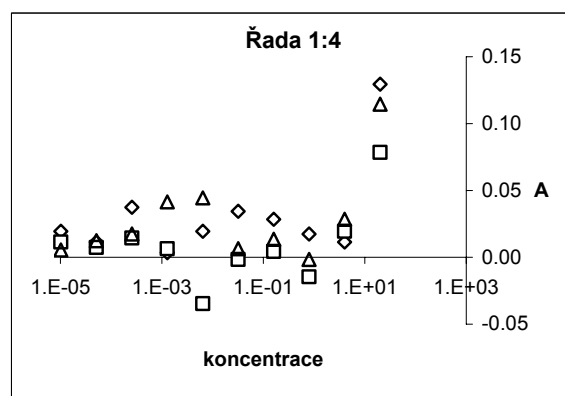
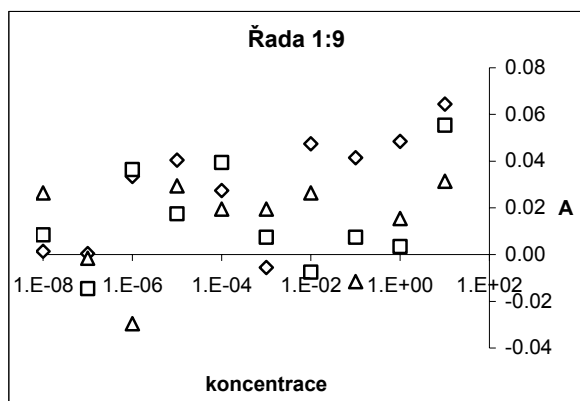
c(μM)	A	A	A
50	0,5380	0,4840	0,4970
25	0,3870	0,3760	0,3550
12,5	0,3170	0,2960	0,3230
6,25	0,3100	0,3080	0,3550
3,125	0,2900	0,2690	0,2980
1,5625	0,2860	0,2740	0,2890
0,7813	0,2670	0,2590	0,2700
0,3906	0,2750	0,2660	0,2950
0,1953	0,2590	0,2900	0,2920
0,0977	0,2800	0,2900	0,2700
blank	0,2560	0,2710	0,2680

Prům-blank 0,2676

### Výsledky po odečtení blanku

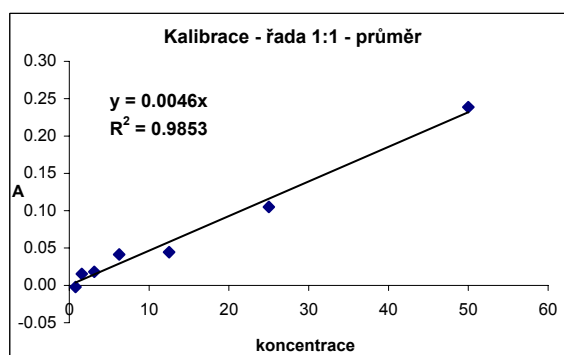
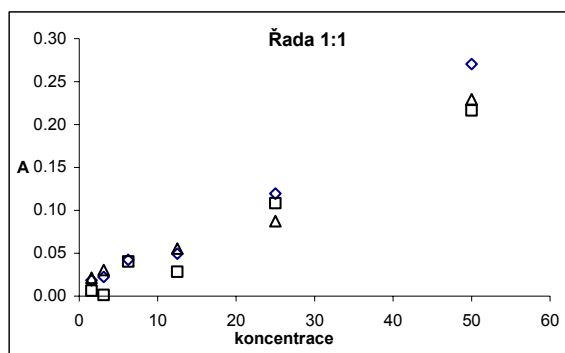
c(μM)	A	A	A
1,E+01	0,0644	0,0554	0,0314
1,E+00	0,0484	0,0034	0,0154
1,E-01	0,0414	0,0074	-0,0116
1,E-02	0,0474	-0,0076	0,0264
1,E-03	-0,0056	0,0074	0,0194
1,E-04	0,0274	0,0394	0,0194
1,E-05	0,0404	0,0174	0,0294
1,E-06	0,0334	0,0364	-0,0296
1,E-07	0,0004	-0,0146	-0,0016
1,E-08	0,0014	0,0084	0,0264

c(μM)	A	A	A
20	0,1294	0,0784	0,1144
4	0,0114	0,0194	0,0284
0,8	0,0174	-0,0146	-0,0016
0,16	0,0284	0,0044	0,0134
0,032	0,0344	-0,0016	0,0064
0,0064	0,0194	-0,0346	0,0444
0,0013	0,0034	0,0064	0,0414
0,0003	0,0374	0,0144	0,0174
0,0001	0,0114	0,0074	0,0124
0,00001	0,0194	0,0114	0,0054



### ředění 1:1

c(μM)	A	A	A	A(prům)
50	0,2704	0,2164	0,2294	0,2388
25	0,1194	0,1084	0,0874	0,1051
12,5	0,0494	0,0284	0,0554	0,0444
6,25	0,0424	0,0404		0,0414
3,125	0,0224	0,0014	0,0304	0,0181
1,5625	0,0184	0,0064	0,0214	0,0154
0,7813	-0,0006	-0,0086	0,0024	-0,0022
0,3906	0,0074	-0,0016	0,0274	
0,1953	-0,0086	0,0224	0,0244	
0,0977	0,0124	0,0224	0,0024	



### Výpočet limitu detekce a kvantifikace:

1) Výpočet na základě odchylek blanků

Směrodatná odchylka blanků (šum):  $s=0,016$

Limit detekce:  $LOD = 3*s$

$LOD = 10,7\mu\text{M}$  roztok v jamce

**$LOD = 0,66\mu\text{g GSH}$**

Limit kvantifikace:  $LOQ = 5*s$

$LOQ = 17,8\mu\text{M}$  roztok v jamce

**$LOQ = 1,1\mu\text{g GSH}$**

2) Výpočet na základě statistického srovnání variant v experimentu

Detekční limit byl vyhodnocen na základě statistického srovnání absorbancí u měřených vzorků s absorbancemi blanků. Byla využita metoda ANOVA s následnými kontrasty proti negativní kontrole Dunnetovým testem (= blank).

Ukázalo se, že koncentrace 4 ( $6,25\mu\text{M}$ , tj.  $0,38 \mu\text{g GSH}$  / jamku) se statisticky významně odlišuje od blanků. Tato hodnota je tedy experimentálně určeným detekčním limitem.

Experimentální limit detekce

$LOD = 6,25\mu\text{M}$  roztok v jamce

**$LOD = 0,38 \mu\text{g GSH}$**

### 3. Závěr:

Byla zavedena metoda stanovení glutathionu pomocí DTNB. Při pokusech s ředicími řadami 1:9 a 1:4 bylo dosaženo limitu detekce příliš brzy na stanovení kalibrační závislosti.

Ta byla stanovena z pokusu s ředicí řadou 1:1, rovnice kalibrace byla (po odečtení blanku):  $A = 0,0046*c$

## SEZNAM ZKRATEK

ATP	adenosintrifosfát
FAD	flavinadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
DTNB	5,5'- dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina)
OPT	o-ftaldialdehyd
GSH	glutathion
GSSG	oxidovaná forma glutathionu
GPx	glutathionperoxidasa
GR	glutathionreduktasa
SOD	superoxiddismutasa
ROS	reaktivní kyslíkové radikály

## LITERATURA

- Akerboom T.P.M. and Sies H., 1981 Assay of glutathion, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides  
In biological samples – Methods in enzymology, vol.77 (Academic Press)
- Allen J.F., 1975, A two step mechanism for the photosynthetic reduction of oxygen by ferredoxin, *Biochem. Res. Commun.* 66:36 - 43
- Apostol I, Heinstein PF and Low PS, 1989, Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Role in defense and signal transduction, *Plant physiol*, 90:109 –116
- Asada K, 1992, Ascorbate peroxidase – A hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants, *Physiol. Plant.* 85:235 – 241
- Asada K. And Nakano Y., 1980, Spinach chloroplast scavenge H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on illumination, *Plant cell physiol* 21:1295 - 1307
- Auroma OI, Halliwell B, Gajewski E and Dizdaroglu M, 1991, Copper-iron dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide, *Biochem J* 273:2601 – 2604
- Baum and Scandalios, 1979, Developmental expression and intracellular localization of superoxide dismutase in maize, *Differentiation* 13:133 - 140
- Bi YM, Felton GW, 1995, Foliar oxidative stress and insect herbivory: primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance, *J Chem Ecol* 21:1511 - 1530
- Bi YM, Kenton P, Mur L, Darby R, Draper J, 1995, Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression, *Plant J*, 8:235-245
- Borgeraas J, Hessen DO, 2000, UV-B induced mortality and antioxidant enzyme activities in *Daphnia magna* at different oxygen concentrations and temperatures. *J. Plankton Res.* 22: (6) 1167-1183.
- Brisson LF, Tenhaken R, Lamb C, 1994, Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance, *Plant Cell* 6:1703 – 1712
- Cadens E. and Boveris A., 1980, Enhancement of hydrogen peroxide formation by protonophores and ionophores in antimycin supplemented mitochondria, *Biochem. J.* 188:31 - 37
- Chen Z, Silva H, Klessig DF, 1993, Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid, *Science* 262:1883 –1886
- Chen Z, Chao G, Singh KB, 1996, The promoter of a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-inducible. *Arabidopsis* glutathion-S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBPI-binding sites, *Plant J*10:955 – 966
- Cheng L, Kellogg EW and Packer L, 1981, Photoinactivation of catalase, *Photochem. Photobiol.* 34:125 - 129
- Chamngopol S, Willekens H, Langebartels C, Van Montagu M, Inze D, Van Camp W, 1996, Transgenic tobacco with a reduced catalase activity develops necrotic lesions and induces pathogenesis-related expression under high light, *Plant J* 10:491 – 503
- Cohen GM and d'Arcy Doherty M, 1987, Free radical cell toxicity by redox cycling chemicals, *Br. J. Cancer* 55 (suppl. VIII): 46 – 52
- Del Rio LA and Donaldson RP, 1995, Production of superoxide radicals and superoxide dismutase activity in glyoxysomal membranes from castor bean endosper, *J. Plant. Physiol.* 146:283 - 287
- Desikan R, Hancock JT, Coffey MJ, Neill SJ, 1996, Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS Lett* 382:213 - 217
- Doke N, Miura Y, Sanchez LM, Park HJ, Noritake T, Yoshioka H, Kawakita K, 1996, The oxidative burst protects plants against pathogen attack? Mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defense, *Gene* 179:45 - 51
- Edlich W, Lorenz G, Lyr H, Nega E, Pommer EH, 1989, New aspects on the infection mechanism of *Botrytis cinerea* Pers, *Neth J Plant Pathol* 95:53-62
- Elstner EF, Osswald W, 1994, Mechanisms of oxygen activation during plant stress, *Proc R Soc Edinb B*:131 - 154
- Eshdat Y, Holland D, Faltin Z, Ben-Hayyim G, 1997, Plant glutathione peroxidases, *Physiol Plant*, 100:234 – 240
- Esterbauer H, Koller E, Snee RG, Koster JF, 1986, Possible involvement of the lipid-peroxidation product 4-hydroxynonenal in the formation of fluorescent chromolipids, *Biochem J* 239:405 – 409
- Foyer Ch, Halliwell B, 1976, The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism, *Planta* 133:21 - 25
- Foyer Ch, Descourvieres P, Kunert KJ, 1994a, Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants, *Plant Cell Environ* 17:507- 523
- Foyer Ch, 1997, Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis, In: JG Scandalios, ed., *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 587 – 621
- Fridovich I, 1975, Superoxide dismutases, *Annu. Rev. Biochem* 44:147 - 159
- Gloser Jan, *Fyziologie rostlin*, Masarykova univerzita, Brno 1998
- Godiard L, Grant MR, Dietrich RA, Kiedrowski S, Dangl JL, 1994, Perception and response in plant disease resistance, *Curr Opin Genet Dev* 4:662 – 671
- Gregory EM, Yost FJ, Fridovich I, 1973, Superoxide dismutases of *Escherichia coli*: intracellular localization and functions, *J Bacteriol* 115:987 – 991
- Guilio R.T.D., Washburn P.C., Wenning R.J., Winston G.W. and Jeweli C.S., 1988, Biochemical responses in aquatic animals: A review of determinants of oxidative stress, *Environmental toxicology and chemistry*, vol.8, pp. 1103 – 1123, 1989
- Haber F and Weiss JJ, 1934, The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts, *Proc. R. Soc. Lond. Ser. A* 147:332 – 351

- Halliwell B., 1987, Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplast, *Chem. Phys. Lipids* 44:327 - 340
- Halliwell B, Gutteridge JMC, 1989, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford: Clarendon Press
- Hayakawa T., Kanematsuand S., Asada K., 1984, Occurrence of Cu/Zn superoxide dismutase in the intrathylakoid space of spinach chloroplast, *Plant cell physiol.* 25:883 - 884
- Heber U, Miyake C, Mano J, Ohno C, Asada K, 1996, Monodehydroascorbate radical detected by electron paramagnetic resonance spectrometry is a sensitive prober of oxidative stress in intact leaves, *Plant Cell Physiol* 37:1066 - 1072
- Herouat D, Van Montagu M, Inze D, 1993, Redox-activated expression of the cytosolic copper/zinc superoxide dismutase gene in *Nicotiana*, *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3108- 3112
- Herschbach C and Rennenberg H, 1994, Influence of glutathione (GSH) on net uptake of sulphate and sulphate transport in tobacco plants, *J. Exp. Bot.* 45:1069 - 1076
- Hideg E, Vass I, 1996, UV-B induced free radical production in plant leaves and isolated thylakoid membranes, *Plant Sci* 115:251 – 260
- Hippeli S, Elstner EF, 1996, Mechanisms of oxygen activation during plant stress: biochemical effects of air pollutants, *J Plant Physiol* 148:249-257
- Jackson C, Dench J, Moore AL, Halliwell B, Foyer CH and Hall DO, 1978, Subcellular localisation and identification of superoxide dismutase in the leaves of higher plants, *Eur. J. Biochem.* 91:339 - 344
- Kappus H and Sies H, 1981, Toxic drug effects associated with oxygen metabolism, redox cycling and lipid peroxidation, *Experientia* 37:1233 - 1241
- Klapheck S, 1988, Homoglutathione: isolation, quantification and occurrence in legumes, *Physiol. Plant.* 74:727-732
- Klapheck S, Chrost B, Starke J and Zimmerman H, 1992,  $\gamma$ -glutamylcysteinylserine – a new homologue of glutathione in plants of the family *Poaceae*. *Botanica acta* 105:174 - 179
- Knoerzer OC, Durner J, Boeger P, 1996, Alterations in the antioxidative system of suspensioncultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress, *Physiol Plant* 97:388 – 396
- Lappartient AG, Touraine B, 1996, Demand-driven control of root ATPsulfurylase activity and sulphate uptake in intact Canola, *Plant. Physiol* 11:147 – 15
- Law MY, Charles SA, Halliwell B, 1983, Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacea oleracea*) chloroplasts, *Biochem. J.* 210:899 - 903
- Legendre L, Rueter S, Heinstein PF, Low PS, 1993, Characterization of the oligogalacturonide-induced oxidative burst in cultured soybean *Glycine max* cells, *Plant Physiol* 102:233 - 240
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C, 1994, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response, *Cell* 79:583 – 593
- Meuwly P, Thibault P, Rausser WE, 1993,  $\gamma$ -Glutamylcysteinylglutamic acid – a new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium, *FEBS Lett.* 336:472 – 476
- Nadezhdin D. and Dunford H.B., 1979, Oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide by hydroxyperoxyl radical, a flash photolysis study, I. *Physiol. Chem.* 83:1957 - 1961
- Neuenschwander U, Vernooij B, Friedrich L, Uknes S, Kessmann H, Ryals J, 1995, Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J* 8:227 –233
- Oshino N., Jamieson D., Sugano T. and Chance B., 1975, Optical measurement of the catalase-hydrogen peroxide intermediate compound in the level of anaesthetized rats and its implication to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in vivo, *Biochem. J.* 146:67 - 77
- Polle A, 1996, Mehler reaction: friend or foe in photosynthesis? *Bot Acta* 109:84 – 89
- Prasad TK, 1996, Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities, *Plant J* 10:1017 – 1026
- Pryor WA, 1984, Free radicals in autoxidation and in aging. In: *Free radicals in molecular biology, Aging, and Disease*, edited by D.Armstrong, RG Cutler, and TF Slater, New York:Raven pp. 13 – 42
- Radi R., Rodriguez M., Castro L. and Telleri T., 1994, Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxyne nitrite, *Arch. Biochem. Biophys.* 308:89 - 95
- Salin ML, 1988, Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast, *Physiol. Plant.* 72:681 - 689
- Smirnoff N, 1993, The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation, *New Phytol* 125:27 - 58
- Tiedemann AV, 1997, Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*, *Physiol Mol Plant Pathol* 50:151-166
- Van Camp W, Capiou K, Van Montagu M, Inze D, Slooten L, 1996, Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts, *Plant Physiol* 112:1703 – 1714
- Vega MP, Pizarro RA, 2000, Oxidative stress and defence mechanisms of the freshwater cladoceran *Daphnia longispina* exposed to UV radiation. *J. Photoch. Photobio B* 54: (2-3) 121-125
- Willekens H, Langebartels C, Tire C, Van Montagu M, Inze D, Van Camp W, 1994a, Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L), *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10450 – 10454
- Wise RR, 1995, Chilling-enhanced photooxidation: the production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light, *Photosynth Res* 45:79 - 97
- Wojtaszek P, 1997, Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection, *Biochem J* 322:681 – 692