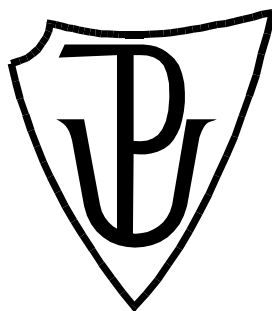


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Hemoxygenasa – klíčový enzym v propojení signálních drah oxidů uhelnatého a dusnatého

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

| | |
|-------------------|---|
| Autor: | Petra Vašíčková |
| Studijní program: | B1406 Biochemie |
| Studijní obor: | Biochemie |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | Doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr. |
| Rok: | 2016 |

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 6.5.2016

Vašíčková Petra

Děkuji svému vedoucímu práce panu doc. Mgr. Markovi Petřivalskému, Dr. za odborné vedení, ochotu, cenné rady a čas věnovaný při zpracování teoretické i experimentální části bakalářské práce.

Děkuji kolektivu Katedry biochemie za cenné rady a pomoc při experimentální činnosti.

Bibliografická identifikace

| | |
|-------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora | Petra Vašíčková |
| Název práce | Hemoxygenasa – klíčový enzym v propojení signálních drah oxidů uhelnatého a dusnatého |
| Typ práce | Bakalářská |
| Pracoviště | Katedra biochemie |
| Vedoucí práce | Doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr. |
| Rok obhajoby práce | 2016 |

Abstrakt

Bakalářská práce je v teoretické části zaměřena na enzym hemoxygenasu (HO) a oxid uhelnatý (CO). V úvodu práce jsou nejprve shrnuty obecné poznatky týkající se HO, na které navazují biologické funkce HO u živočichů a rostlin, které jsou dále zaměřeny na ochrannou funkci HO proti oxidačnímu stresu rostlin. Následující kapitoly se zabývají CO, který je jedním z produktů reakce HO. Významné je zapojení CO v biologických drahách živočichů a rostlin, s využitím CO jako signální molekuly.

V praktické části práce byla extrahována biliverdinreduktasa (BVR) z vepřové sleziny, pro kterou byla měřena aktivita. Dále byl měřen obsah proteinů a aktivita ve vzorcích *S. lycopersicum* po aplikaci roztoku heminu, látky povzbuzující aktivitu HO. V praktické části byla provedena imunodetekce proteinů na membráně, která ale nevyšla dle předpokladů. Veškeré provedené postupy vedly k zavedení protokolu metod studia HO v rostlinách.

| | |
|---------------|--|
| Klíčová slova | Hemoxygenasa, biliverdinreduktasa, hem, hemin, <i>Solanum lycopersicum</i> , oxid uhelnatý |
| Počet stran | 51 |
| Počet příloh | 0 |
| Jazyk | Český |

Bibliographical identification

| | |
|--------------------------------|--|
| Autor's first name and surname | Petra Vašíčková |
| Title | Heme oxygenase - key enzyme in the cross-talk of signalling pathways of carbon monoxide and nitric oxide |
| Type of thesis | Bachelor |
| Department | Department of biochemistry |
| Supervisor | Doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr. |
| The year of presentation | 2016 |

Abstract

The bachelor work is focused on heme oxygenase (HO) and carbon monoxide (CO) in its theoretical part. The introduction summarizes basic information about HO which is followed by biological function of HO with animals and plants that are then focused on protection from plants' oxidation stress. The following part focuses on CO which is one of HO reaction products. Involvement of CO in animals and plants biological pathways using CO as a signal molecule is significant.

The practical part describes extraction of biliverdin reductase (BVR) from pig's spleen for which activity was measured as well as contents of proteins and activity in samples of *S. lycopersicum* after solution of hemin (substance supporting HO activity) was applied. In addition, immunodetection of proteins in membrane was done, however the result was not as expected. All processes were used to set methods to study HO in plants.

| | |
|----------------------|--|
| Keywords | Heme oxygenase, biliverdin reductase, heme, hemin, <i>Solanum lycopersicum</i> , carbon monoxide |
| Number of pages | 51 |
| Number of appendices | 0 |
| Language | Czech |

Obsah

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | ÚVOD | 1 |
| 2 | SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY | 2 |
| 2.1 | Hemoxygenasa | 2 |
| 2.1.1 | Hemoxygenasa rostlin..... | 3 |
| 2.1.2 | Hemoxygenasa živočichů..... | 6 |
| 2.2 | Role hemoxygenasy v ochraně proti oxidačnímu stresu | 8 |
| 2.2.1 | Oxidační stres rostlin..... | 8 |
| 2.2.2 | Oxidační stres živočichů | 10 |
| 2.3 | Oxid uhelnatý | 12 |
| 2.3.1 | Funkce CO u rostlin | 15 |
| 2.3.2 | Funkce CO u živočichů..... | 17 |
| 3 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 22 |
| 3.1 | Materiál a chemikálie | 22 |
| 3.1.1 | Rostlinný materiál | 22 |
| 3.1.2 | Použité chemikálie | 22 |
| 3.2 | Přístrojové vybavení..... | 23 |
| 3.3 | Metody..... | 24 |
| 3.3.1 | Příprava pufrů a roztoků..... | 24 |
| 3.3.2 | Kultivace semenáčků rajčat | 27 |
| 3.3.3 | Extrakce rostlinného materiálu | 27 |
| 3.3.4 | Extrakce biliverdinreduktasy ze sleziny..... | 27 |
| 3.3.5 | Měření aktivity biliverdinreduktasy | 28 |
| 3.3.6 | Stanovení množství proteinů ve vzorku Bradfordovou metodou | 28 |
| 3.3.7 | Kalibrační křivka pro bilirubin..... | 29 |
| 3.3.8 | Stanovení aktivity hemoxygenasy | 29 |
| 3.3.9 | SDS-PAGE..... | 30 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.3.10 | Western blotting | 31 |
| 3.3.11 | Imunochemická detekce proteinů na membráně..... | 31 |
| 4 | VÝSLEDKY A DISKUZE | 32 |
| 4.1 | Měření aktivity biliverdinreduktasy | 32 |
| 4.2 | Stanovení množství proteinů ve vzorku Bradfordovou metodou..... | 33 |
| 4.2.1 | Měření množství proteinů v rostlinných vzorcích | 34 |
| 4.3 | Měření aktivity hemoxygenasy | 36 |
| 4.3.1 | Kalibrační křivka pro bilirubin..... | 36 |
| 4.3.2 | Stanovení aktivity hemoxygenasy v rostlinných vzorcích..... | 36 |
| 4.4 | Analýza rostlinných vzorků metodou SDS-PAGE | 39 |
| 4.5 | Imunochemická detekce proteinů na membráně | 40 |
| 5 | ZÁVĚR | 42 |
| 6 | LITERATURA..... | 43 |
| 7 | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK | 51 |

CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši shrnující funkce oxidu uhelnatého u živočichů a rostlin, známé pochody produkce se zaměřením na enzym hemoxygenasu (HO) a signální dráhy CO v rostlinách, včetně obranných odpovědí ve stresových podmínkách.

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo zavést protokol metod studia HO v rostlinách. Dalším cílem bylo měření enzymové aktivity HO, sledování množství proteinu v extraktech Western blottingem s použitím anti-HO protilátky, případně i histochemická detekce HO v rostlinných pletivech. Dalším cílem byla aplikace metod na vhodný modelový systém klíčení a vývoj semenáčků rajčete včetně tvorby laterálních kořenů.

1 ÚVOD

Živočiškové a rostliny jsou vystaveni během svého života mnoha stresovým faktorům způsobujícím oxidační stres. Enzym hemoxygenasa je významnou složkou organismů, jelikož katalýza odbourávání hemu vede ke tvorbě látek podílejících se na obranných mechanismech, které udržují stabilitu organismu. Nejvýznamněji se na těchto obranných reakcích podílí první z produktů odbourávání hemu - biliverdin, který může být dále redukován na bilirubin. Další z produktů odbourávání hemu - oxid uhelnatý působí jako signální molekula. Pro poslední produkt odbourávání hemu - Fe^{2+} není do dnešní doby zcela objasněná dráha působení.

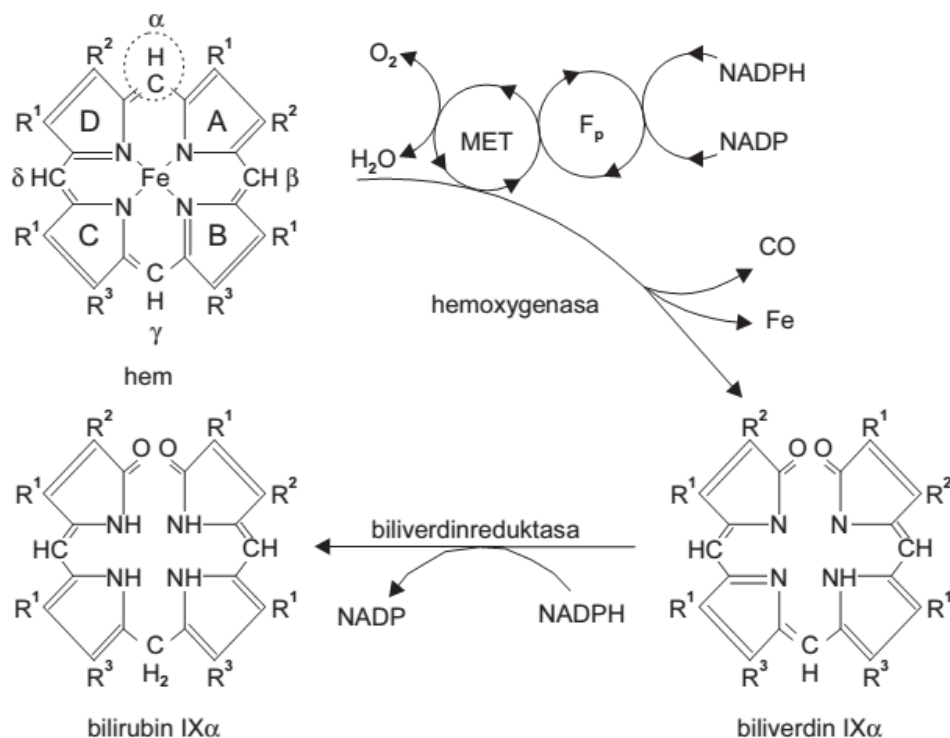
Hemoxygenasa je enzym, který byl dříve rozsáhle zkoumán převážně v živočišných tkáních. Výzkum v rostlinných buňkách se stal významný až v posledních letech. Velká pozornost je kladena na zvyšování aktivity hemoxygenasy za použití aplikace látek, které mají její zvýšení vyvolat. Se zvýšením aktivity enzymu pak dále úzce souvisí studium kořenového systému rostlin, na který by měla mít vyšší aktivita hemoxygenasy vliv (Chen *et al.*, 2012; Xuan *et al.*, 2008a).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Hemoxygenasa

Hemoxygenasa (HO; EC 1.14.99.3) je všudypřítomný a vysoce aktivní enzym. Katalyzuje odbourávání hemu na biliverdin-IX α , Fe²⁺ a oxid uhelnatý (Obr. 1). Vzniklý biliverdin-IX α je dále odbouráván biliverdinreduktasou (BVR; EC 1.3.1.24) na bilirubin-IX α . Pro průběh reakce je potřebný molekulární kyslík a NADPH, jako zdroj elektronů (Muramoto *et al.*, 2002; Terry *et al.*, 2002; Gohya *et al.*, 2006). Reakce odbourávání hemu za přítomnosti HO je společným rysem rostlin i živočichů, ovšem v různých organismech je pozorováno rozdílné využití produktů reakce (Noriega *et al.*, 2004; Shekhawat a Verma, 2010). Navíc je obecně známo, že rostliny, které nemají ekvivalent savčí BVR nevytváří bilirubin (Kohchi *et al.*, 2001).

HO byla nejprve identifikována v játrech potkana, jako klíčový enzym při degradaci hemu (Tenhunen *et al.*, 1968). Až poté následovala identifikace HO i u fotosyntetických organismů. HO byla rozsáhle zkoumána hlavně v živočišných tkáních, kde bylo zjištěno, že se enzym podílí na degradaci hemu a je součástí antioxidantního obranného systému savců (Synder a Baranano, 2001). Tyto získané informace vedly k podobnému výzkumu u rostlin, kde byly objeveny zatím 4 geny kódující HO – HO1, HO2, HO3 a HO4. Bylo zjištěno, že HO rostlin se podílí nejen na degradaci hemu, ale i na mnoha dalších buněčných procesech. Významně se uplatňuje při získávání železa, ochraně buněk, tvorbě postranních kořenů, syntéze fytochromů, ale také i při regulaci otevírání a uzavírání průduchů (Shekhawat a Verma, 2010).



Obr. 1 Katabolická přeměna hemu na bilirubin-IX α za přítomnosti hemoxygenasy, MET = mikrosomální elektronový transportní systém (převzato z Vítek *et al.*, 2003).

2.1.1 Hemoxygenasa rostlin

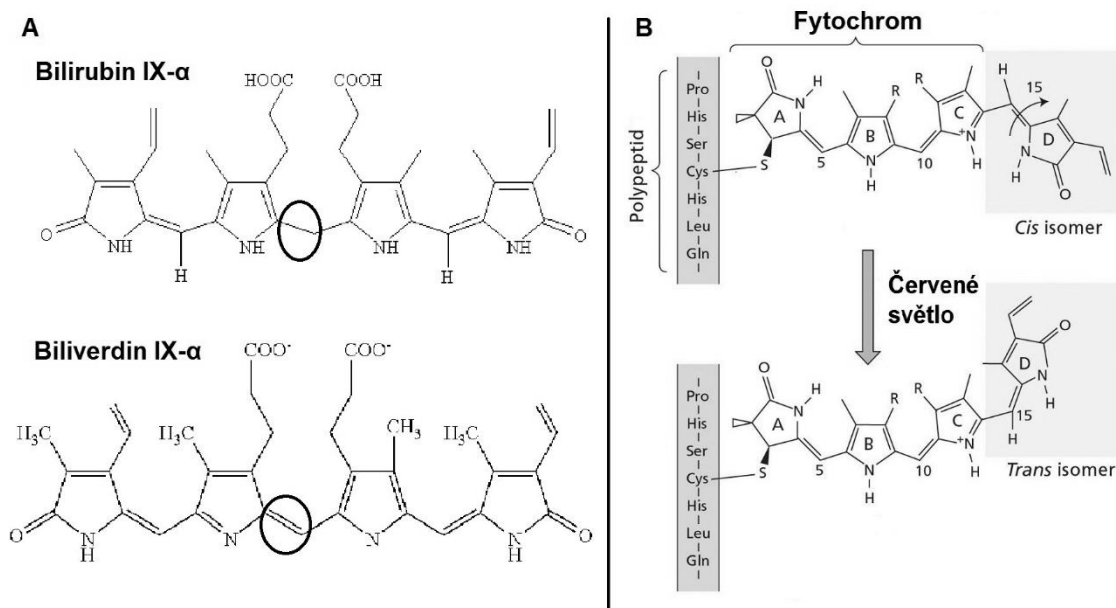
Prvním fotosyntetizujícím organismem, kde byla hemoxygenasa identifikována, byla červená řasa *Cyanidium caldarium* (Troxler *et al.*, 1979). Od té doby byla HO postupně identifikována nejen v červených řasách, ale i v sinicích a vyšších rostlinách (Muramoto *et al.*, 1999; Ortiz de Montellano a Wilks, 2001; Terry *et al.*, 2002; Balestrasse *et al.*, 2008). Byly pozorovány rozdílné funkce HO červených řas oproti HO vyšších rostlin nebo zvířecí HO (Troxler *et al.*, 1979). Příkladem rozdílných funkcí HO může být využití jednoho z produktů HO reakce - biliverdinu-IX α nebo bilirubinu-IX α . V červených řasách je využit především k syntéze fytochromů, zatímco pro vyšší rostliny a živočichy má význam jako antioxidační činidlo (Elich *et al.*, 1989; Stocker *et al.*, 1987; Stevens a Small, 1976).

Jak bylo již zmíněno, do dnešní doby byly identifikovány 4 geny HO, které lze rozdělit do dvou tříd, na základě rozdílné aminokyselinové sekvence v proteinu. První třídu tvoří 3 izoformy – HO1, HO3 a HO4. Druhou třídu tvoří pouze HO2 izoforma. Nejvíce

zastoupeným a zároveň i prozkoumaným izoenzymem je HO1, zatímco izoenzymy HO3 a HO4 jsou zastoupeny nejméně a byly identifikovány pouze v *Arabidopsis thaliana* (Davis *et al.*, 2001; Emborg *et al.*, 2006).

U vyšších rostlin bylo za pomoci značení zeleným fluorescenčním proteinem a imunodetekce zjištěno, že HO1 je umístěna v chloroplastech rostlin a většina množství byla nalezena převážně ve stromatech chloroplastů (Muramoto *et al.*, 1999). Doposud ale není zcela objasněno, zda má HO1 původ v plastidovém genomu nebo jiném genomu. Přesná lokalizace dalších tří izoenzymů HO rostlin není známa. Jediné, co v tomto směru bylo zjištěno, je fakt, že N-terminální sekvence na konci proteinu směřuje HO do místa jejího působení, v případě HO1 jsou to chloroplasty. Dalším místem působení HO mohou být i mitochondrie, případně obě zmíněné buněčné organely (Silva-Filho, 2003; Rudhe *et al.*, 2004). Veškeré tyto poznatky je ale potřeba více prokázat dalšími studiemi.

Produkty reakce HO vyšších rostlin se podílí na řadě procesů v nich probíhajících. Vzniklý biliverdin-IX α a bilirubin-IX α jsou prekurzory pro tvorbu fytochromů (Obr. 2A) (Elich *et al.*, 1989). Fytochromy jsou součástí fotosyntetického aparátu rostlin, který je potřebný pro růst a vývoj rostliny. Systém reaguje na světelné podmínky okolního prostředí a jeho změny. Fytochromy absorbují červenou složku světelného spektra (Obr. 2B). Tento fakt může hrát velkou roli u fotoperiodických rostlin, kdy krátké a dlouhé dny ovlivňují rostlinu tak, že ji buď indukují či inhibují ve vývoji (Shekhawat *et al.*, 2011). Biliverdin-IX α se také podílí na ochraně buněk proti oxidativnímu stresu rostlin (Balestrasse *et al.*, 2005; Shekhawat a Verma, 2010). Byl sledován i vliv biliverdinu-IX α na snížení stresu z nadměrného množství soli v okolním prostředí klíčících semen (Liu *et al.*, 2007).



Obr. 2 Bilirubin-IX α a biliverdin-IX α jako prekurzory pro syntézu fytochromů. Základem struktury je lineární tetrapyrrol. A – porovnání struktury bilirubinu-IX α a biliverdinu-IX α . Reakcí biliverdinu-IX α a BVR za přítomnosti NADPH dochází k nasycení dvojné vazby ve struktuře tetrapyrrolu. B – zachycení přeměny cis izofomy na trans formu vlivem červeného světla.

Expresí rostlinné hemoxygenasy je regulována mnoha činiteli, kterými jsou například světlo, UV záření, množství železa v organismu, hematin, oxid dusnatý, reaktivní formy kyslíku nebo kyselina abscisová (Xuan *et al.*, 2008a; Chen *et al.*, 2012). Typickým inhibítorem HO je protoporfyrin zinku (ZnPPIX) nebo hemoglobin (Shekhawat a Verma, 2010; Chen *et al.*, 2012). Mnohé studie se zabývaly zapojením hemoxygenasy do tvorby postranních kořenů rostlin, která byla vyvolána auxiny a oxidem dusnatým. Pro různé studie byly vybrány odlišné rostliny (rýže, *Arabidopsis*, rajče). Vždy ale byly aplikovány na skupiny sazenic rostlin látky hematin nebo hemin, auxin, zdroj NO – např. SNP. Hematin či hemin měl vždy pozitivní vliv na aktivitu HO (Chen *et al.*, 2012). Jako inhibitory aktivity HO byly použity ZnPPIX, hemoglobin či specifický „vychytávač“ NO cPTIO. Důležitou informací získanou těmito studiemi bylo, že aplikace auxinu nebo zdroje NO vedla ke zvýšení aktivity HO, což následně vedlo i ke zvýšení tvorby postranních kořenů již po několika dnech od aplikace látky. Některé studie také zachytily při zvýšené koncentraci HO vyšší koncentraci CO. Při aplikaci inhibitorů bylo sledováno potlačení aktivity HO. Což se následně projevilo i menším počtem vzniklých postranních kořenů. Studie prokázaly vliv aplikovaných látek na aktivitu HO. Dosažené výsledky

dokazují stimulaci tvorby postranních kořenů rostlin HO, čímž prokazují provázanost mezi auxiny, NO a systémem HO/CO (Xuan *et al.*, 2008a; Chen *et al.*, 2012; Fang *et al.*, 2014).

2.1.2 Hemoxygenasa živočichů

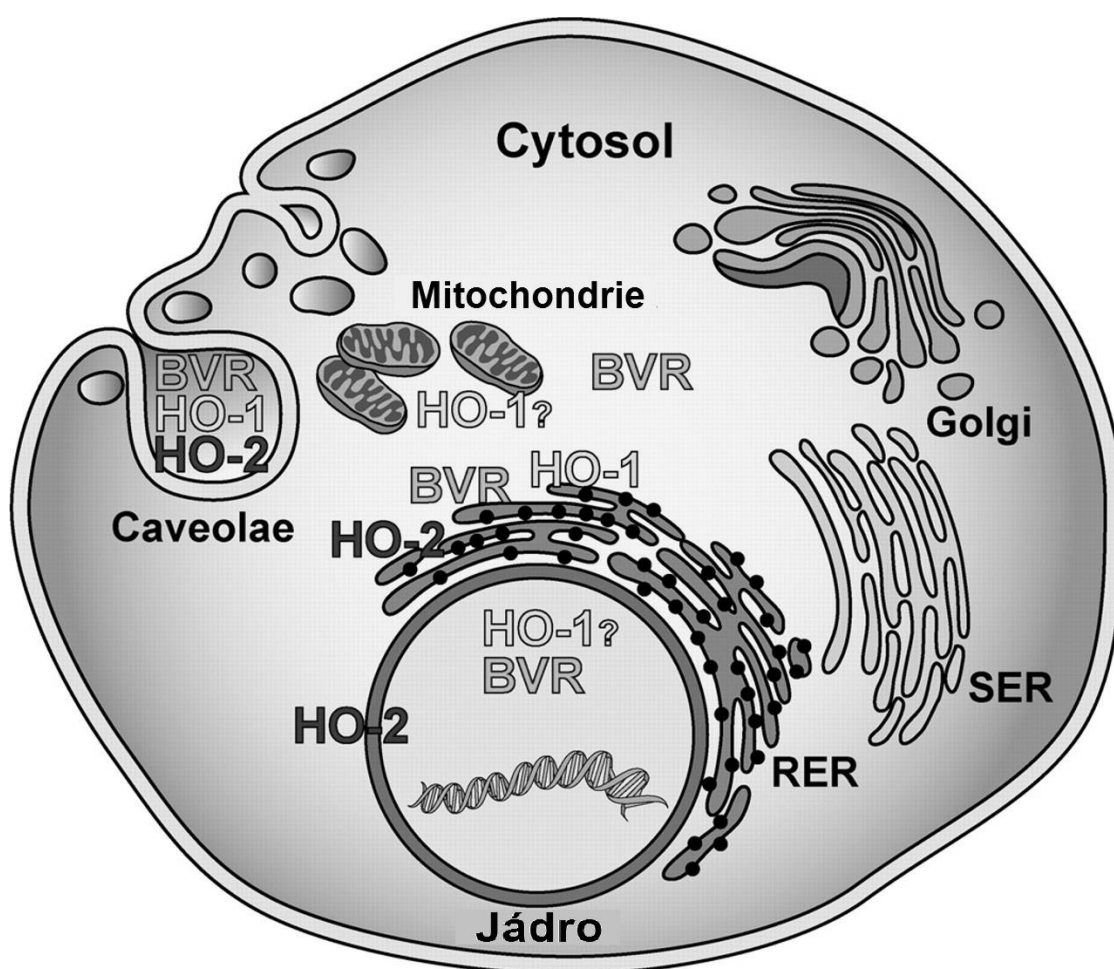
Reakce katabolismu hemu na biliverdin IX α , CO a Fe²⁺ za katalýzy HO je hlavním intracelulárním zdrojem železa a oxidu uhelnatého (Ryter *et al.*, 2006). Navíc všechny vzniklé metabolity jsou buď významnými signálními molekulami - CO, nebo jim byly prokázány antioxidační vlastnosti – biliverdin-IX α , Fe²⁺ (Stocker *et al.*, 1987). V savčích organismech byly identifikovány tři izoformy HO – HO1, HO2 a HO3. Izoforma HO1 je přítomna v celém organismu a její aktivita je ovlivňována mírou oxidačního stresu, který může být vyvolán mnoha podněty. Izoforma HO2 se vyskytuje v mozku a varlatech. Aktivita HO2 je stabilní a je konstitutivně produkována ve stejném množství. Poslední izoforma HO3 vykazuje velmi nízkou aktivitu a předpokládá se, že se podílí na vazbě hemu (Shekhawat *et al.*, 2011). Každá z izoform je v organismu kódována jiným genem (Ryter *et al.*, 2006).

Indukovatelná forma HO1 je nejvíce zastoupena ve slezině a dalších tkáních, kde dochází k degradaci červených krvinek (Tenhunen *et al.*, 1969; 1970). HO1 se vyskytuje v hematopoetických kmenových buňkách kostní dřeně, kde ovlivňuje tvorbu nových červených krvinek na základě koncentrace hemu v organismu. Pokud je koncentrace hemu nízká, probíhá krvetvorba pomaleji (Abraham *et al.*, 1989; 1991). Posledním místem, kde je pozorována vysoká koncentrace HO, je jaterní parenchym. Zde dochází k vychytávání a degradaci plazmatického hemu, hemoglobinu a methenalbuminu (Pimstone *et al.*, 1971; Tenhunen *et al.*, 1970). Za normálního stavu organismu bylo pozorováno, že tkáně, které nejsou zapojeny do tvorby a odbourávání červených krvinek, případně metabolismu hemoglobinu, obsahují minimální, někdy až nedetekovatelné množství HO1. Pokud ale dojde ke stimulaci fyzikálním či chemickým podnětem, který je signálem oxidačního stresu, dochází k silné expresi této izoformy, která je součástí ochranného systému organismu (Ryter *et al.*, 2006).

Izoforma HO2 je tvořena ve stabilním množství a největší zastoupení má ve varlatech a mozku. Je součástí celého nervového systému, cév, jater a střev (Maines, 1997). Signály

organismu upozorňující na oxidační stres nemají vliv na aktivitu této izoformy. Jediná známá regulace HO2 probíhá za účasti glukokortikoidů, které jsou tvořeny v nadledvinkách. Tvorba těchto steroidních hormonů je řízena předním lalokem hypofýzy (Maines *et al.*, 1996; Raju *et al.*, 1997).

Umístění izoform HO v buňkách není jednoznačné a předpokládá se rozdílná a variabilní subcelulární lokalizace (Obr. 3). Nejčastější a nejznámější je lokalizace HO1 v endoplazmatickém retikulu. Dále byl pozorován výskyt izoform v jádru, cytoplazmatické membráně a caveolách buněk (Kim *et al.*, 2004; Ishikawa *et al.*, 1991; Shibahara *et al.*, 1985).



Obr. 3 Subcelulární lokalizace enzymů katalyzující rozklad hemu. HO - hemoxygenasa, BVR - biliverdinreduktasa, RER - hrubé endoplazmatické retikulum, SER - hladké endoplazmatické retikulum (upraveno dle Ryter *et al.*, 2005).

2.2 Role hemoxygenasy v ochraně proti oxidačnímu stresu

Živočichové i rostliny jsou během svého vývoje vystaveny biotickému a abiotickému stresu, který vede ke tvorbě volných kyslíkových radikálů (ROS). ROS způsobují nerovnováhy v metabolismu, které vedou až k narušení buněk. Proto je důležité, aby byly jejich zvýšené koncentrace včas rozpoznány a eliminovány. To se děje sledem reakcí, které ROS nejprve rozpoznávají, následně signalizují jejich přítomnost a na závěr je odbourávají tak, aby nebyly pro organismus nebezpečné (Shekhawat a Verma, 2010; Verma *et al.*, 2008; Sharma a Dietz, 2008). Tyto vyvolané reakce jsou obrannými mechanismy, které zabraňují většímu poškození organismu. Ochranu před oxidačním stresem zajišťují katalasy, peroxidasa a superoxiddismutasa. Významným členem této antioxidační sítě je také hemoxygenasa (Balastrasse *et al.*, 2005).

2.2.1 Oxidační stres rostlin

Důvodem, ke zkoumání HO jako ochranné složky před oxidačním stresem u rostlin byl fakt, že produkt HO reakce biliverdin má silné antioxidační účinky *in vitro*. Tato úloha HO není zatím u rostlin prostudována do takové míry, jako u živočichů. Do dnešní doby existuje pouze několik studií, které přímo prokazují antioxidační účinky HO v rostlinách (Balastrasse *et al.*, 2005, 2008; Yannarelli *et al.*, 2006). Navíc mechanismus působení při ochraně rostlinných buněk není zcela objasněn. Prozatím byl navržen modelový systém, který předpokládá, že do ochrany proti oxidačnímu stresu se zapojují všechny tři produkty HO reakce, ale každý samostatně (Obr. 4). Proto by mohl obranný mechanismus proti ROS běžet třemi způsoby, tak jak je tomu u živočichů (Shekhawat a Verma, 2010).

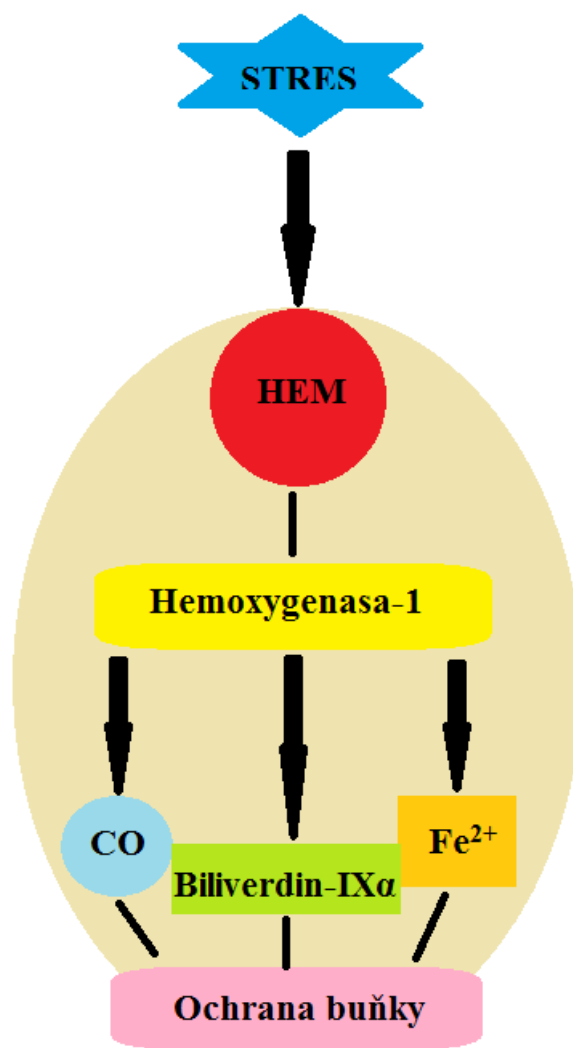
Ten první uvažuje biliverdin jako účinný zhášec ROS (Stocker *et al.*, 1987; Stocker, 1990). Při aplikaci těžkých kovů (kadmia) na rostlinky sóji, byl pozorován nárůst množství biliverdinu v důsledku zvýšené aktivity HO1. Při společné exogenní aplikaci kadmia a biliverdinu byl sledováno pokles množství ROS. Z tohoto pozorování lze usoudit, že biliverdin má vliv na snížení oxidačního stresu vyvolaným těžkými kovy (Balastrasse *et al.*, 2005; 2008).

Druhým produktem HO reakce je CO. Byly sledovány cytoprotektivní a antioxidační účinky CO v rostlinách při abiotickém stresu, způsobeném vysokou salinitou. CO působí

jako signální molekula, která má vliv na různé signální dráhy. Mechanismus působení je přibližně takový, že CO aktivuje nebo stimuluje tvorbu jiných signálních molekul, které vyvolávají odpověď na daný podnět (Sa *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; Otterbein a Choi, 2000). CO je schopen aktivovat rozpustnou guanylátcyklastu, která stimuluje produkci cGMP, který bývá označován jako druhý posel (Duckers *et al.*, 2001). Dále působí na dráhu MAPkinasy, která přenáší signál o oxidačním stresu a zánětlivých reakcích (Otterbein a Choi, 2000). Příkladem výsledku signalizace pomocí CO může být uzavření průduchů v listech rostliny, vlivem nedostatku vody či vysoké teploty okolního prostředí (Yu *et al.*, 2007). Zapojení CO do významných signálních drah, obdobně jako u živočichů, vedlo k přisouzení cytoprotektivních účinků této molekule (Otterbein a Choi, 2000).

Třetím produktem, u kterého se předpokládají antioxidační účinky, je uvolněné dvojmocné železo. Ochranné účinky proti oxidačnímu stresu byly dokázány pouze u živočichů a pro důkaz u rostlin je potřeba další výzkum (Shekhawat a Verma, 2010).

Rostliny jsou během svého vývoje velmi často vystaveny vysokému oxidačnímu stresu. Často na ně působí i několik stresových faktorů najednou. Například UV záření, znečištěné ovzduší, vysoká salinita a množství těžkých kovů v prostředí, kde rostliny rostou. Studie dokázaly, že HO je jedním z faktorů, který rostlinám napomáhá se s tímto stresem vyrovnat a umožňuje růst a vývoj i v takto nepříznivém prostředí. (Shekhawat a Verma, 2010; Shekhawat *et al.*, 2011).



Obr. 4 Předpokládaný model působení HO1 v ochraně proti oxidačnímu stresu. Každý z produktů HO reakce se účastní na buněčné ochraně rozdílnou signální dráhou. CO působí jako signální molekula a biliverdin-IX α jako antioxidant (upraveno dle Shekhawat a Verma, 2010).

2.2.2 Oxidační stres živočichů

Obdobně jako u rostlin, jsou do obranného mechanismu zapojeny všechny tři produkty HO reakce. Zatímco u rostlin není mechanismus působení důkladně prozkoumán, u živočichů je znám velmi dobře.

Většina vzniklého biliverdinu-IX α a bilirubinu-IX α v organismu je produktem degradace hemu. Degradace probíhá za katalýzy HO, kdy vzniká jako jeden ze tří produktů biliverdin-IX α . Ten je následně BVR přeměněn na bilirubin-IX α (Ostrow *et al.*, 1962). V obou případech se jedná o žlučová barviva, přičemž biliverdin má nazelenalou

barvu, zatímco bilirubin je nažloutlý. Struktura obou barviv je srovnána na Obr. 2-A. Jedná se o metabolické odpadní produkty, které mají ve větším množství škodlivé účinky a za normálních fyziologických podmínek jsou rychle eliminovány. V organismu jsou vychytávány v játrech, kde jsou dále metabolizovány, což zabraňuje jejich zpětné resorpci ve střevech. Pomocí žluči a výkalů jsou následně z organismu vylučovány (Roy-Chowdhury, 1996). Pokud dojde k nahromadění vzniklého bilirubinu v plazmě, dochází k onemocnění zvané žloutenka. Jedná se o toxický stav, který může způsobovat poškození nervové soustavy. Neurotoxita bilirubinu souvisí s jeho lipofilními vlastnostmi. Je schopen reagovat s fosfolipidy neuronů a buněk mozku (Mustafa a King, 1970; Nagaoka a Cowger, 1978). Tento stav se velmi často vyskytuje u novorozenců jako novorozenecká žloutenka, která se léčí pomocí fototerapie. V závažných případech se dokonce využívá transfúze krve, aby nedošlo k poškození organismu dítěte. Tyto vážné stavy vedly k hypotéze, že by se mohla využít inhibice HO pomocí farmakologických přípravků, což by zabránilo další produkci těchto toxických látek, při stavu ohrožení života (Kappas, 2004). Tento model je navržen pro případy, kdy toxicita bilirubinu je daleko vyšší, než očekávané antioxidační účinky.

První antioxidační účinky bilirubiny byly popsány již v roce 1976, kdy bylo pozorováno, že zháší kyslíkový radikál v organickém rozpouštědle, čímž zabraňuje fotooxidaci uhlovodíků (Stevens a Small, 1976). Toto zjištění vedlo k mnoha experimentům, jejichž výsledkem bylo zjištění, že jak bilirubin, tak i biliverdin jsou považovány za silné antioxidyanty. Mohou působit v tkáních, kde vznikají. Dále pak v séru, kde jsou transportovány a také ve žluči (Stocker, 1990). Působí jako významné složky ochrany proti oxidaci a peroxidaci lipidů. Bilirubin je donorem elektronů a stabilizuje tak ROS, zatímco biliverdin sám reaguje s radikály za vzniku adičních produktů (Stocker *et al.*, 1987; Neužil a Stocker, 1993). Navíc jsou schopny likvidovat i volné dusíkaté radikály, jako je NO nebo sloučeniny, které mohou být donorem NO (Kaur *et al.*, 2003, Mancuso *et al.*, 2003). Veškeré tyto poznatky přisuzují antioxidační funkci HO, jako primárnímu tvůrci žlučových barviv.

Železo uvolněné z hemu činností HO je dostupné pro buněčné procesy, které jsou na jeho přítomnosti závislé (Ryter *et al.*, 2000). Při nedostatku potřebného množství železa buňka není schopna syntetizovat DNA a neroste. V takovém případě dochází k apoptóze

(Greene *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Kovar *et al.*, 1997; Simonart *et al.*, 2002). HO hraje klíčovou roli s hospodařením železa v organismu. Existují tři cesty, kterými může být vzniklé železo jako Fe^{2+} využito. První naznačuje, že by mohlo v daném okamžiku podporovat vznik ROS, jako katalyzátor škodlivých reakcí (Halliwell a Gutteridge, 1999). Zatímco ta druhá, poukazuje na jeho propojení s Fe-regulačním proteinem, který zajišťuje jeho zachycení. Následně dochází ke vzniku feritinu, který je označován za cytoprotektivní molekulu. Tento fakt přisuzuje HO ochrannou funkci i přes uvolněné železo (Balla *et al.*, 1992; 1993; Lin a Girotti, 1998; Vile *et al.*, 1994). Poslední cesta vede k uskladnění železa pro buněčné procesy. Bylo zjištěno, že pokud HO vykazuje zvýšenou aktivitu, dochází méně k ukládání železa, což by mělo vést k větším cytoprotektivním účinkům (Ferris *et al.*, 1999).

HO je pro živočichy jediným endogenním zdrojem CO, který je pro organismus velmi důležitý. Jedná se o molekulu, která je zapojena do řady signálních drah. Při exogenní aplikaci těžkých kovů, vystavení UV záření, hypoxii či hyperoxii byl sledován nárůst aktivity izoformy HO1, což vedlo k větší produkci CO (Maines a Kappas, 1976; Maines, 1988; Keyse a Tyrrel, 1989; Tomaro *et al.*, 1991; Noriega *et al.*, 2004; Yannarelli *et al.*, 2006; Balestrasse *et al.*, 2008). Tyto výsledky vedly k závěru, že CO působí jako signální molekula, která ve spolupráci s dalšími signálními molekulami, kterými jsou cGMP a NO, zajišťuje odpověď na stresové faktory (Otterbein a Choi, 2000). To znamená, že jak CO tak i HO, jako jeho zdroj, jsou významnou složkou obranného systému organismů (Maines, 1997).

2.3 Oxid uhelnatý

Oxid uhelnatý (CO) je dvouatomární molekula s nízkou molekulovou hmotností (MW 28,01), která se přirozeně vyskytuje jako plyn, který je bezbarvý a bez zápachu. Obecně je CO znám jako toxická látka, vznikající nedokonalým spalováním organické hmoty a znečišťující životní prostředí (Xuan *et al.*, 2008b; Von Berg, 1999). Jedná se o velmi stabilní a málo reaktivní molekulu. Tyto vlastnosti jsou důsledkem trojné vazby mezi uhlíkem a kyslíkem (Allen, 1977).

CO bývá označován jako „tichý zabiják“. Může se hromadit v nevětraných prostorech, kam se uvolňuje např. ze špatně táhnoucích kamen. Právě díky jeho neviditelnosti a

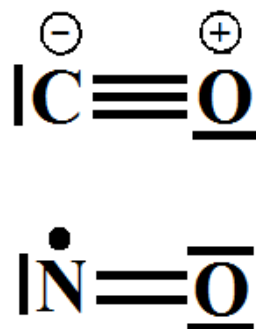
nemožnosti jej cítit, bývá vdechován, aniž by si člověk uvědomoval jeho přítomnost (Von Berg, 1999). Vysoké koncentrace nebo delší expozice CO jsou velmi nebezpečné a mohou být až smrtelné (Tab. 1). Mezi projevy otravy CO patří závratě, zvracení, bolesti hlavy, ospalost a špatná koordinace (Gorman *et al.*, 2003; Weaver, 1999). Dlouhodobější vystavení CO vede k dýchacím potížím, bolestem na hrudi, dezorientaci a ztrátě vědomí, což může vést až ke smrti. Opakovaná expozice vysokým koncentracím CO způsobuje poškození nervové soustavy (Weaver, 1999). Důvodem toxických vlastností CO je fakt, že CO se reverzibilně váže na hemoglobin (Hb) za vzniku karboxyhemoglobinu (CO-Hb), přičemž afinita vazby CO k Hb je přibližně 240krát větší než vazba O₂ k Hb (Smith, 1986). Hb je metaloprotein, zajišťující transport O₂ a CO₂ v těle obratlovců. O₂ je transportován z dýchacích orgánů do tkání a CO₂ opačným směrem. Hb obsahuje 4 hemové skupiny, které zajišťují vazbu O₂ a CO₂. Celkem lze tedy na jednu molekulu Hb navázat až 4 O₂ (CO₂) (Wikiskripta). Pokud dojde k expozici CO, začnou spolu O₂ a CO soutěžit o vazebná místa. Pouhé obsazení poloviny vazebných míst Hb CO, vede k inhibici uvolňování O₂ do tkání, což vede ke stavu zvanému hypoxie a ohrožení organismu (Smith, 1986; Von Berg, 1999). CO z komplexu CO-Hb lze uvolnit expozicí většinu množství kyslíku a Hb je pak znovu schopen zásobovat tkáň O₂ (Gorman *et al.*, 2003). Mimo Hb, může CO vytvářet komplexy i s jinými metaloproteiny. Např. vazba CO na cytochromy způsobuje inhibici enzymové aktivity (Brown a Piantadosi, 1989; Estabrook *et al.*, 1970).

Tab. 1 Patofyziologické účinky CO odpovídající expozici daným obj. % CO ve vzduchu a případné nebezpečí pro organismus, 0,01 obj. % = 100 ppm (upraveno dle Otterbein a Choi, 2000).

| CO (obj. %) ve vzduchu | Možná doba expozice a vliv na organismus |
|------------------------|---|
| 0,01 | Přípustná expozice několik hodin |
| 0,04 - 0,05 | Může být inhalován po dobu 1 hodiny bez znatelného vlivu |
| 0,06 - 0,07 | Znatelný vliv po expozici 1 hodinu |
| 0,1 - 0,12 | Nepříjemné, ale ne nebezpečné symptomy po expozici 1 hodinu |
| 0,15 - 0,20 | Nebezpečný pro expozici 1 hodinu |
| 0,4 a více | Smrtelně nebezpečný při expozici <1 hodina |

I přes fakt, že exogenní CO je toxický, tak endogenní CO je pro organismus velmi významný. Je zapojen do mnoha signálních drah účastnících se protizánětlivých, antikoagulačních, antiapoptických a antiproliferativních účinků (Ryter a Otterbein, 2004). Hlavním endogenním zdrojem CO je reakce degradace hemu za přítomnosti HO. Tato tvorba zahrnuje cca 86% endogenní produkce CO. Zbytek produkce představují degradace látek, neobsahující ve své struktuře hem. Příkladem může být metabolismus xenobiotik, oxidace lipidů nebo degradace halogenderivátů uhlovodíků, které musejí být v organismu eliminovány pro svoji vysokou toxicitu (Archakov *et al.*, 2002; Vreman *et al.*, 1998; 2000; Guengerich a Shimada, 1991; Oh *et al.*, 2002; Stewart *et al.*, 1972). Množství vytvořeného CO závisí přímou úměrou na aktivitě HO. Aktivita HO reaguje na fyziologické podmínky, např. zánět, fyzickou zátěž nebo kvalitu životního prostředí. Bylo prokázáno, že vyšší hladiny CO ve vydechovaném vzduchu se objevují u lidí trpících zánětlivým stavem (Donnelly a Barnes, 2001; Horvath *et al.*, 1998; Maestrelli *et al.*, 2001; Slebos *et al.*, 2003; Yasuda *et al.*, 2002).

Pro CO, jako signální molekulu se uvádí obdobný systém působení, jako pro oxid dusnatý (NO). Oba plyny jsou tvořeny endogenně a v organismu se uplatňují jako signální molekuly. Bylo zjištěno, že tyto molekuly spolu úzce spolupracují a vzájemně ovlivňují svoji aktivitu (Hartsfield, 2002). Příkladem může být fakt, že jak CO tak i NO, je schopen se vázat na atom železa hemové skupiny. To vede k aktivaci rozpustné guanylátcyklasy (GC; EC 4.6.1.2), která stimuluje tvorbu cGMP z GTP (Longo *et al.*, 1999; Verma *et al.*, 1993; Watts *et al.*, 2003). Navíc CO je schopen zesílit signál NO, který vede k aktivaci GC (Dulak a Józkowicz, 2003). Obě molekuly mají podobnou strukturu i velikost. I přes tyto důkazy jsou molekuly CO a NO odlišné (Obr. 5). Zatímco CO je stabilní a nemá ve své molekule volný elektron, tak NO jej má, což způsobuje jeho reaktivnost (Maines, 1997; Ryter *et al.*, 2006).



Obr. 5 Porovnání elektronových vzorců CO a NO. Molekula NO obsahuje nepárový elektron, díky kterému není natolik stabilní jako molekula CO.

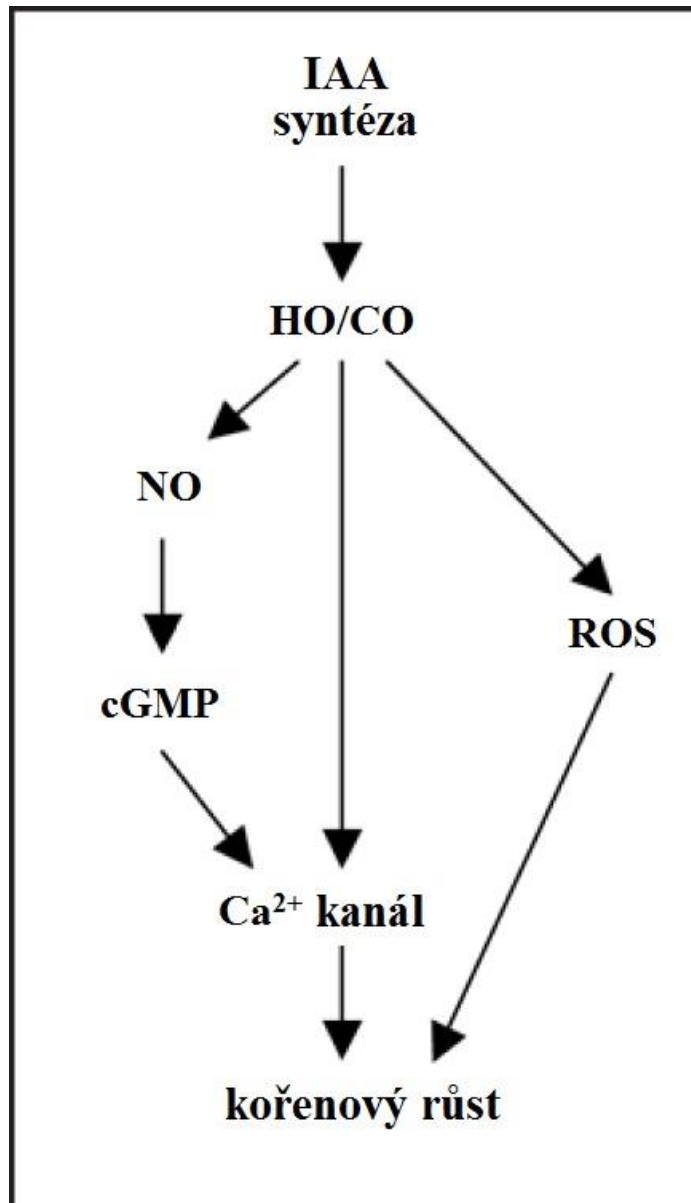
2.3.1 Funkce CO u rostlin

Výzkum významu CO v rostlinách se intenzivně rozvinul během posledních let a je převážně zkoumána signalizace pomocí této molekuly. Bylo zjištěno, že při signalizaci pomocí CO se uplatňují i další molekuly a to hlavně NO a cGMP. Zajímavé je zapojení ROS do signalizace (Xuan *et al.*, 2008b).

Vznik NO v rostlinách probíhá pomocí dvou enzymatických systémů. Prvním je syntasa oxidu dusnatého (NOS; EC 1.14.13.39), tím druhým nitrátreduktasa (NR; EC 1.7.1.1). Dalšími zdroji jsou reakce, které nejsou katalyzovány enzymy. Při těchto procesech dochází k uvolňování NO z dusitanů (Crawford, 2006). Vzniklý NO je využit pro intercelulární a intracelulární signalizaci. Signální dráhy vedou k různým odpovědím. Těmi může být uzavření průduchů, klíčení semen, růst a kvetení rostliny, apoptóza nebo odolnost vůči patogenům (Beligni a Lamattina, 2000; Delledonne, 2005; Kolla a Raghavendra, 2007; Neill *et al.*, 2002, She a Song, 2006; Wendehenne *et al.*, 2004).

Studie prokázaly propojení CO a NO s indukcí auxinů, které vedlo ke zvýšené tvorbě postranních kořenů (Pagnussat *et al.*, 2002; 2003; 2004; She a Huang, 2004; Cao *et al.*, 2007a; Xu *et al.*, 2006a). Dále byl sledován vliv CO/NO signálů na uzavírání průduchů vyvolaných kyselinou abscisovou (Cao *et al.*, 2007b; Song *et al.*, 2008). CO také působí na fytohormony ovlivňující období klidu a klíčení semen (Dekker a Hargrove, 2002; Liu *et al.*, 2007). Navíc CO a NO chrání rostliny před oxidačním stresem, způsobeným např. vysokou salinitou prostředí (Chen *et al.*, 2004; Ruan *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2006b).

Studie věnující se propojení CO/NO systému s auxiny nebo jeho zapojení do vlivu na průduchy rostlin, využívaly exogenní aplikace CO a NO. Zdrojem CO byl buď hematin, hemin nebo vodný roztok sycený CO, což jsou látky zvyšující aktivitu enzymu HO. Jako zdroj NO byl pak použit SNP. V různých variantách byly aplikovány i specifické zhášedce CO a NO, kterými byly hemoglobin, ZnPPiX a cPTIO (Song *et al.*, 2008; Xuan *et al.*, 2008b). Bylo prokázáno, že vyšší koncentrace CO a NO vedou k uzavření průduchů. Důležitým poznatkem také je, že jak CO tak i NO, mohou přenášet signál samostatně. Tedy, i když jeden z nich byl zachycen specifickým zhášedcem, k uzavření průduchů došlo. Pokud byly zachyceny obě signální molekuly, k uzavření průduchů nedošlo. Navíc bylo zjištěno, že CO a NO jsou také zapojeny do uzavírání průduchů, v reakci rostlin na tmu. Z toho lze usuzovat, že existuje určitá provázanost mezi CO, NO a uzavíráním průduchů rostlin. Předpokládá se, že největší vliv má signál NO, jehož syntézu lze ovlivnit CO signálem (Song *et al.*, 2008). Ve studiích zabývajících se propojením CO, NO a auxinů při tvorbě kořenů bylo prokázáno, že exogenní aplikace CO donorů vedla ke zvýšené tvorbě kořenového systému jako samostatná aplikace auxinů nebo donoru NO. Navíc byla pozorována vyšší aktivita HO1 a zvýšená endogenní tvorba CO, zatímco specifické zhášedce způsobily přesný opak. Aktivita HO1 a tvorba CO byla nízká. Byla sledována i snížená tvorba kořenů. Na základě výsledků se předpokládá jednoduchý systém signálních drah, vedoucí k růstu kořenů (Obr. 6). V tomto modelu působí CO, vzniklý reakcí HO, jako signální molekula, zajišťující spojení mezi signálem auxinu a následnými signály vedoucími k prodloužení kořene. Těmi může být NO, aktivující cGMP, který přes Ca²⁺ kanál vyvolá prodloužení kořene. Ca²⁺ kanál může být také aktivován přímo CO signálem. Poslední možná dráha vedoucí od signálu CO k tvorbě kořenů může být zprostředkována pomocí ROS. Pro potvrzení předpokládaných drah a pochopení jejich průběhu je nadále potřeba dalšího výzkumu (Xuan *et al.*, 2008b).



Obr. 6 Schéma návrhu signální dráhy HO/CO vedoucí ke kořenovému růstu. Auxin kyselina indol-3-octová (IAA) vyvolává přechodné hromadění CO, které aktivuje NO nebo ROS dráhu, vedoucí k prodloužení kořene (upraveno dle Xuan *et al.*, 2008b).

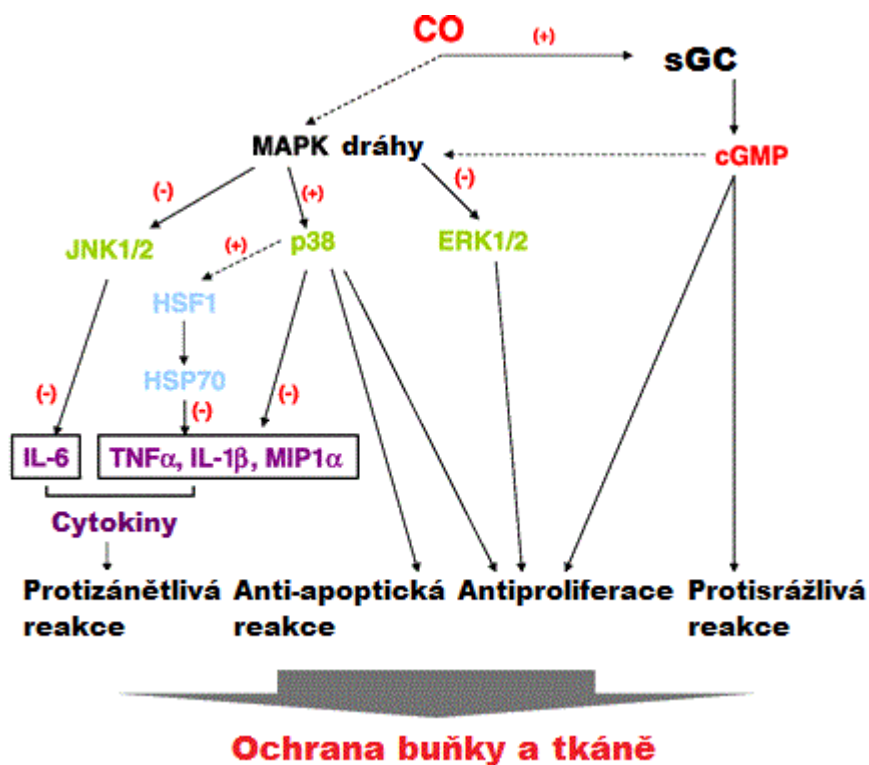
2.3.2 Funkce CO u živočichů

CO endogenně vzniká v nízkých koncentracích při odbourávání hemu a slouží jako signální molekula. Je významným modulátorem zánětlivých reakcí a základních procesů, jako jsou buněčná proliferace a produkce cytokinů a růstových faktorů. Jeho exogenní aplikace do organismu může napodobit účinky endogenního CO, ale dávky musí být

nízké. Aplikace vyšších dávek mívá nežádoucí toxické účinky a to i přes to, že CO plní v organismu důležité funkce (Ryter a Otterbein, 2004).

CO jako signální molekula je zapojena do mnoha obranných mechanismů buňky, které brání narušení buňky. I přes takto velké využití CO je známo poměrně málo mechanismů působení. Převládajícím mechanismem působení CO je vliv na aktivitu rozpustné guanylátcyklasy (sGC), která katalyzuje tvorbu druhého posla cGMP. Dalším mechanismem může být modulace aktivity různých mitogenem aktivovaných proteinkinás (MAPK), která může být vyvolaná buď přímo CO nebo produktem prvního mechanismu, tedy cGMP (Obr. 7) (Ryter a Otterbein, 2004).

Aktivace sGC pomocí CO vede k mnohonásobnému zvýšení produkce cGMP oproti aktivaci NO (Maines, 1997; Furchgott a Jothianandan, 1991). Aktivace CO je významná pro buňky a tkáně s nízkým obsahem endogenního NO. Přičemž při přítomnosti NO působí CO jako jeho antagonist a pro interakce s hemem sGC (Kajimura *et al.*, 2003). Interakce hemu sGC s CO a NO se liší tvorbou komplexu. Zatímco CO tvoří s hemem hexakoordinační komplex, tak NO tvoří pentakoordinační komplex (Furchgott a Jothianandan, 1991; Stone a Marletta, 1994). Při disociaci CO z hemu vzniká pentakoordinační meziproduct, velmi podobný komplexu tvořenému NO. Předpokládá se, že tento jev může za aktivaci sGC působením CO (Kharitonov *et al.*, 1995).



Obr. 7 Schéma působení signálních drah aktivovaných CO vedoucí k ochraně buněk a tkání. Aktivace sGC vede ke tvorbě cGMP, který je schopen vyvolat danou odpověď nebo aktivovat MAPK dráhu. MAPK dráhy mohou být různého druhu (JNK 1/2 , p38, ERK 1/2), některé vedou k obranné odpovědi, jiné vyvolávají tvorbu cytokinů, které jsou protizánětlivými faktory. U MAPK p38 dráhy se HSF1 (faktor tepelného šoku) a Hsp70 (protein tepelného šoku) považují za možné meziprodukty této dráhy (upraveno dle Ryter *et al.*, 2006).

CO hraje důležitou roli v mnoha fyziologických soustavách a orgánech. V oběhové soustavě plní CO roli v kontrakci cév a má vliv na srdeční funkci. Přítomnost CO vede k vazodilataci cév a zabraňuje vazokonstrikci, která může být vyvolána různými podněty. Bylo zjištěno, že přítomnost endogenního nebo exogenního CO vede ke zvýšené tvorbě cGMP v hladké svalovině cév (Christodoulides *et al.*, 1995; Morita *et al.*, 1995). Tento jev neplatí jen pro cévy, ale i pro hladké svalstvo dýchacích cest (Cardell *et al.*, 1998). Touto cestou CO chrání také buňky myokardu před poškozením vlivem infarktu a hypoxie (Wu a Wang, 2005).

Role CO v nervové soustavě je ještě významnější než v cévní soustavě. CO je důležitý neurotransmitter. Účastní se přenosů signálů v ose hypotalamus-hypofýza-nadledviny. Ta představuje významnou dráhu pro zachování vnitřní homeostázy organismu, která

pomáhá organismu se vyrovnat se stresovými faktory. Dále se CO účastní jako signální molekula procesů, kterými jsou čichová signální transdukce (Verma *et al.*, 1993) a dlouhodobá potenciace (LTP), která je buněčným mechanismem učení a paměti (Stevens a Wang, 1993; Zhuo *et al.*, 1993). Účast CO v neurotransmisi je spojena s aktivací sGC/cGMP v mozku. Přičemž jeho hlavním zdrojem v mozku je izoforma HO2 (Verma *et al.*, 1993).

CO je zapojen i do signalizace v dalších orgánových soustavách. Je významnou signální molekulou trávicí, vylučovací a reprodukční soustavy, kde se podílí na řadě pochodů (Wu a Wang, 2005).

Na základě těchto poznatků, kdy HO/CO systém se podílí na neurotransmisi vedoucí k mnoha užitečným aktivacím, byly vyvinuty chemické sloučeniny (CORM, Carbon Monoxide Releasing Compounds) pro cílenou distribuci a uvolňování CO v tkáních. Tyto sloučeniny jsou skvělou alternativou pro léčebné postupy, kde se využívá inhalace malých množství CO, případně mohou být využity v genové terapii pro pacienty závislé na nad-expresi genů HO1 a HO2. CORM jsou sloučeniny přechodných kovů s karbonyly, mající schopnost uvolnit CO. Existuje několik skupin sloučenin CORM, které jsou rozdílné v závislosti na způsobu uvolnění CO ze sloučeniny. Např. sloučenina ze skupiny CORM-1 uvolní CO vlivem fotoaktivace, zatímco sloučenina ze skupiny CORM-3 uvolní CO pouze ve vodném prostředí (Clark *et al.*, 2003; Foresti *et al.*, 2004; Motterlini *et al.*, 2005). Biologické účinky těchto sloučenin jsou ověřeny a využívají se jako léčiva. Mají širokou škálu využití od vazodilatace, až po ochranu při septickém stavu organismu.

CO se terapeuticky aplikuje např. při plicní fibróze, kde dochází k zeslabení apoptické smrti buněk, což vede ke zmírnění poškození tkáně plic (Tsuburai *et al.*, 2002). Zapojení CO do antiapoptických reakcí není ale pozorováno ve všech situacích. V malém množství byly pozorovány i proapoptické účinky CO v endotelových buňkách (Thom *et al.*, 2000). Navíc exogenní aplikace CO inhalací, vede ve větších dávkách k poškození mozku, kde dochází k odumírání buněk vlivem hypoxie (Piantadosi *et al.*, 1997).

CO je zapojen do protizánětlivého mechanismu. Mechanismus působení je velmi složitý, ale zjednodušeně se dá popsat tak, že přítomnost CO stimuluje tvorbu protizánětlivých faktorů, které vedou k regulaci zánětlivé reakce (Otterbein *et al.*, 2000).

Jednou z reakcí na zánět může být zabránění koagulace. Proto se léčba pomocí CORM, které jsou donorem CO, využívá při sepsi, což je vážný zdravotní stav, při kterém je organismus kriticky ohrožen. Bývá častou příčinou úmrtí u kriticky nemocných pacientů (Wenzel, 2002). Bylo prokázáno, že aplikace CO vede nejen k vazodilataci cév, což chrání buňky před hypoxií, ale navíc k větší permeabilitě tkáňového moku, který tak může více cirkulovat. Během cirkulace tkáňového moku se do něj uvolňují protizánětlivé faktory, jako jsou cytokiny nebo neutrofilů, což vede ke zlepšení stavu pacienta (Wyble *et al.*, 1996; Kuwabara *et al.*, 2000). Během sepse dochází ke zvýšenému působení koagulačního systému, vznikají sraženiny, které znemožňují průtok krve, čímž může dojít k poškození buněk (Esmon, 2005). Léčba pomocí CORM vede ke snížení koagulace, což chrání pacienta před selháním organismu a zlepšuje jeho celkový zdravotní stav. Systém působení CORM je založen na interakci mezi zánětlivou reakcí a koagulačním systémem. Vyvolání vyšší tvorby protizánětlivých látek vede k lepšímu potlačení zánětlivé reakce, což přispívá ke snížení koagulace (Sun a Chen, 2008).

Bylo zjištěno, že CO má antiproliferativní účinek v hypoxických buňkách hladkého svalstva cév (Morita *et al.*, 1995). V důsledku hypoxie produkují cévní buňky hladkého svalstva endogenní CO. To dále vede ke zvýšené tvorbě cGMP v endotelových buňkách cév (Morita a Kourembanas, 1995). Aplikace CORM léčiv vedla také k inhibici proliferace cévních buněk hladkého svalstva (Taille *et al.*, 2005). Předpokládá se, že proliferace buněk, by mohla hrát velkou roli při astmatu. Buňky hladkého svalstva jsou citlivé na přítomnost zánětlivých mediátorů, což by mohlo vést ke zvýšené proliferaci a spuštění zánětlivé reakce. CO je svoji přítomností nejen schopen regulovat dráhy vedoucí k potlačení zánětlivé reakce, ale umožňuje dosáhnout i inhibice proliferace buněk zasažených zánětem (Song *et al.*, 2002; Taille *et al.*, 2005). Tyto poznatky by mohly vést k dalšímu výzkumu léčby astmatu pomocí léčiv typu CORM.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a chemikálie

3.1.1 Rostlinný materiál

- Semena *Solanum lycopersicum* cv. Microtom

3.1.2 Použité chemikálie

- Akrylamid (Sigma-Aldrich, Německo)
- Bilirubin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Biliverdin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Citronan sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, USA)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dimethylsulfoxid 99,9% (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dithiothreitol (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dodecylsírán sodný (Sigma-Aldrich, Německo)
- EDTA (Sigma-Aldrich, Německo)
- Ethanol 96% (Lachema, Česká republika)
- Glukosa-6-fosfát (Sigma-Aldrich, Německo)
- Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (Sigma-Aldrich, Německo)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, Německo)
- Glycin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Hemin (Sigma-Aldrich, Německo)
- HEPES (Sigma-Aldrich, Německo)
- Hexahydrát chloridu draselného (Lach-Ner, Česká republika)
- Hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Hydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Hydroxid draselný (Lach-Ner, Česká republika)
- Hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- Chemiluminiscenční substrát: Luminata Classico Western HRP Substrate (EMD Millipore, USA)
- Chlorid draselný (Merck, Německo)

- Chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina chlorovodíková 35% (Lach-Ner, Česká republika)
- Manitol (Sigma-Aldrich, Německo)
- Methanol (Lach-Ner, Česká republika)
- NADPH (Sigma-Aldrich, Německo)
- N-N'-metylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, Německo)
- N, N, N', N'- tetramethylethyldiamin (Sigma-Aldrich, Německo)
- *n*-butanol (Lach-Ner, Česká republika)
- Persíran amonný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Polyvinylpyrrolidon (Sigma-Aldrich, Německo)
- Ponceau S (Merck, Německo)
- Primární protilátka: králičí polyklonální anti-HO (Agrisera, Švédsko)
- Proteinový standard Unstained Protein Standards (Bio-Rad, USA)
- Savo (Unilever, Česká republika)
- Sekundární protilátka: kozí proti králičím IgG značená křenovou peroxidasou (Sigma-Aldrich, USA)
- Sušené nízkotučné mléko (AppliChem, Německo)
- Triton X-100 (Acros Organics, USA)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (MP Biomedicals, Francie)
- Tween-20 (Sigma-Aldrich, Německo)

3.2 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy (Sartorius, Německo)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga CL31R (Thermo Jouan, Francie)
- Centrifuga Rotanta 460R (Schoeller)
- Centrifuga 6K15 (Sigma, Německo)
- Chemiluminiscenční scanner (LI-COR, USA)
- Digitální pH metr (InoLab pH level1, Německo)
- Digitální předvážky (KERN, Německo)
- Dokumentační zařízení Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, USA)

- Elektroforetický systém Mini PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, USA)
- Elektromagnetická míchačka (IKA, Německo)
- Míchačka magnetická (IKA, Německo)
- Mikrodestičkový spektrofotometr Synergy HT (BioTek Instruments, USA)
- Mikrodestičkový spektrofotometr Synergy H1 (BioTek Instruments, USA)
- Mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko)
- Nitrocelulosaová membrána 0,45 μm (Bio-Rad, USA)
- Váhy Denver Summit (Biolink)
- Vortex (Stuart, UK)
- Zdroj pro elektroforézu PowerPac 300 (Bio-Rad, USA)

3.3 Metody

3.3.1 Příprava pufrů a roztoků

3.3.1.1 Extrakční pufr

Na přípravu 0,5 l pufru bylo potřeba:

- 2,979 g HEPES (25 mM)
- 22,773 g manitol (250 mM)
- 0,186 g EDTA (1 mM)
- 0,005 g polyvinylpyrrolidon (1% w/v)
- 50 ml glycerol (10 % v/v)

Daná množství látek byla rozpuštěna v potřebném množství deionizované vody. Po rozpuštění a smíchání všech složek pufru bylo pH pufru upraveno na hodnotu 7,4 a poté byl objem doplněn deionizovanou vodou na 0,5 l. Před začátkem extrakce rostlinného materiálu byl k potřebnému množství extrakčního pufru přidán DTT v 1 mM koncentraci (na 50 ml bylo potřeba 0,0077 g DTT).

3.3.1.2 0,1 M draselno-fosfátový pufr s 2 mM MgCl_2 , pH 7,4

Na přípravu 1 l pufru bylo potřeba navážky:

- 5,4 g KH_2PO_4
- 10,4 g K_2HPO_4

- 0,4 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Navážky KH_2PO_4 a K_2HPO_4 byly rozpuštěny v deionizované vodě. Poté byla přidána a rozpuštěna navážka $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Bylo nutno upravit pH na 7,4 pomocí KOH. Na závěr byl deionizovanou vodou doplněn objem na 1 l.

3.3.1.3 20 mM draselno-fosfátový pufr s 0,1 M KCl, pH 7,4

Na přípravu 1 l bylo použito 200 ml 0,1 M draselno-fosfátového pufru, pH 7,4. K tomuto množství bylo přidáno 7,456 g KCl a roztok byl doplněn na objem 1 l deionizovanou vodou.

3.3.1.4 0,1 M sodno-citrátový pufr s 10% glycerolem, pH 5

Na přípravu 0,5 l pufru bylo potřeba navážky 14,705 g citronanu sodného, které bylo rozpuštěno v potřebném množství deionizované vody. Následně bylo přidáno 50 ml glycerolu a bylo upraveno pH pomocí HCl na pH 5. Na závěr byl doplněn objem deionizovanou vodou na 0,5 l.

3.3.1.5 Roztok 0,2 mM heminu

Na přípravu 10 ml roztoku bylo potřeba navážít a rozpustit v deionizované vodě 1,3 mg heminu.

3.3.1.6 Příprava substrátů pro měření aktivity enzymů

- 5 mM hemin – navážka 6,5 mg na 2 ml fosfátového pufru
- 200 mM glukosa-6-fosfát (G6P) – navážka 121 mg na 2 ml fosfátového pufru
- 100 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (G6PDH) – 100 U bylo rozpuštěno v 1 ml fosfátového pufru s 10% glycerolem
- 3 mM BSA – navážka 3,96 g na 20 ml fosfátového pufru

Zásobní roztoky heminu a G6P byly rozpipetovány na alikvoty po 100 μl , G6PDH po 50 μl a BSA po 1 ml a zamrazeny.

- 200 uM bilirubin v DMSO – navážka 2,92 mg na 10 ml DMSO
- 500 uM biliverdin v DMSO – navážka 1,55 mg na 5 ml DMSO

Zásobní roztoky bilirubinu a biliverdinu uchovávají v lednici.

- 10 mM NADPH – navážka 8,3 mg na 1 ml ddH₂O, připraven vždy čerstvý a byl uchovávan na ledu při 4°C

3.3.1.7 Reakční pufr pro stanovení aktivity hemoxygenasy

Na přípravu 5 ml:

- 4,8 ml fosfátového pufru
- 25 µl heminu (25 µM)
- 25 µl G6P (1 mM)
- 25 µl G6PDH (0,5 U/ml)
- 50 µl BSA (300 µM)

Připraven vždy čerstvý a byl uchovávan na ledu při 4°C.

3.3.1.8 Roztoky pro SDS-PAGE

- Elektrodotový pufr – 6,05 g Tris, 28,82 g glycin, 2 g SDS, pH 8,3, objem 2 l
- Akrylamid-N,N'-metylenbisakrylamid – 30 g akrylamid, 0,8 g N,N'-metylenbisakrylamid, objem 100 ml
- *n*-butanol – 5 ml vody, 50 ml *n*-butanolu
- Vzorovací pufr – 2,5 ml 0,5 M Tris/HCl, 4 ml 10% SDS, 2 ml glycerolu, 2 mg bromfenolové modři, 0,31 g dithiothreitolu, objem 10 ml
- 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 – 3 g Tris, pH 6,8, objem 50 ml
- 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 – 36,3 g Tris, pH 8,8, objem 200 ml
- 10% persíran amonný – 0,1 g v 1 ml vody
- 10% SDS – 10 g SDS v 100 ml vody

3.3.1.9 Roztoky pro Western blotting

- Ponceau S – 0,2 g Ponceau S, 10 ml kyseliny octové, 90 ml vody
- Blotovací pufr – 3,025 g Tris, 14,41 g glycinu, 200 ml methanolu, pH 8,3, objem 1 l

3.3.1.10 Roztoky pro imunochemickou detekci

- 1% sušené mléko – 1 g sušeného nízkotučného mléka v 100 ml TBS
- TBS – 4,84 g Tris, 58,44 g NaCl, pH 7,5, objem 2 l

- Tween v TBS – 0,5 ml Tween-20 v 1 l TBS

3.3.2 Kultivace semenáčků rajčat

Semínka rajčat *Solanum lycopersicum* cv. Microtom byla po dobu 10 minut sterilizována 5% roztokem Sava. Poté byla 10x propláchnuta deionizovanou vodou. Po promytí byla vyseta na Petriho misky na vlhkou vrstvu filtračního papíru pomocí pinzety. Na každé misce bylo v průměru 30 semínek. Po vysetí byly Petriho misky umístěny do fytostronu, ve kterém semínka klíčila 2 dny při teplotě 26°C. Poté byla naklíčená semínka opatrně přenesena na nové Petriho misky na vlhkou vrstvu filtračního papíru. Na každé misce bylo přibližně 10 semínek, které byly vyrovnány do jedné řady v horní části misky. K polovině z celkového množství nachystaných misek bylo přidáno 5 ml vody. Do druhé poloviny misek bylo přidáno 5 ml 0,2 mM roztoku heminu. Poté byly Petriho misky umístěny do fytostronu po dobu 3 - 7 dní při teplotě 23°C a 12-ti hodinové fotoperiodě světlo/tma. Po kultivaci byly semenáčky zváženy a zamrazeny k dalšímu použití.

3.3.3 Extrakce rostlinného materiálu

Celý proces extrakce probíhal za neustálého chlazení vzorků na ledu a s použitím chlazené centrifugy (4°C). Semenáčky rajčat byly homogenizovány v extrakčním pufru v poměru 1:5. Homogenát byl převeden do ependorfek a centrifugován v centrifuze při 200 xg po dobu 2 minut. Po centrifugaci byl odebrán supernatant do čistých ependorfek a znovu centrifugován při 1000 xg po dobu 7 minut. Po skončení druhé centrifugace byl opět supernatant odebrán a nachystán ke třetí centrifugaci. Pevná frakce obsahující chloroplasty byla ponechána. Třetí centrifugace probíhala 20 minut při 16000 xg. Po jejím skončení byl supernatant, obsahující cytoplazmatickou frakci, oddělen zvlášť od třetí pevné frakce obsahující mitochondrie. Všechny takto získané frakce byly zamrazeny pro měření aktivity hemoxygenasy.

3.3.4 Extrakce biliverdinreduktasy ze sleziny

Celý proces extrakce probíhal za neustálého chlazení vzorku na ledu a s použitím chlazené centrifugy (4°C). Vepřová slezina byla rozkrájena na menší kousky a homogenizována homogenizátorem v 0,1M citrátovém pufru o pH 5 s přídavkem 10% glycerolu. Získaný homogenát byl centrifugován při 8500 xg po dobu 15 minut. Po centrifugaci byl odebrán veškerý supernatant a změřen jeho celkový objem (1000 ml).

Z tabulky bylo zjištěno potřebné množství síranu amonného (176 g), pro 30% koncentraci roztoku této látky, který se využívá k precipitaci proteinů. Po přidání a důkladném rozpuštění veškerého množství síranu amonného byl vzorek centrifugován 30 minut při 8500 xg. Opět byl odebrán supernatant a změřen jeho objem (1050 ml). Z tabulky bylo zjištěno množství síranu amonného pro 70% koncentraci v daném objemu (287 g). Po důkladném rozpuštění tohoto množství síranu amonného byl vzorek centrifugován 30 min při 8500 xg. Po první a druhé centrifugaci byla vždy pevná frakce odstraněna a dále nebyla využívána, zatímco po třetí centrifugaci byl odstraněn supernatant a ponechána pevná frakce. Tato frakce byla rozpuštěna v minimálním potřebném množství 20 mM draselno-fosfátového (K-P_i) pufru. Poté byla provedena dialýza s tímto pufrům a byl získán koncentrovaný roztok proteinů ze sleziny obsahující biliverdinreduktasu.

3.3.5 Měření aktivity biliverdinreduktasy

Pro měření aktivity biliverdinreduktasy bylo do jamek destičky napipetováno 210 μ l 300 μ M pufru s BSA (na přípravu 1 mL: 900 μ l K-P_i pufru + 100 μ l 3 mM BSA), 5 μ l biliverdinu v DMSO a 30 μ l extraktu BVR. Takto připravená směs v jamkách destičky byla inkubována v readru při teplotě 37°C po dobu pěti minut. Po inkubaci byla nastartována reakce přidávkem 20 μ l čerstvě připraveného NADPH do každé jamky. Následně pomocí readru byly měřeny změny absorbance při 468 nm po dobu 30 minut každých 60 sekund.

3.3.6 Stanovení množství proteinů ve vzorku Bradfordovou metodou

Před měřením bylo vždy potřeba připravit si čerstvý roztok pracovního činidla Bradfordové. Připravoval se tak, že zvolené množství zásobního roztoku Coomassie Blue G250 bylo ředěno v poměru 1:4 deionizovanou vodou (na 10 ml pracovního roztoku 2 ml Coomassie Blue a 8 ml ddH₂O). Stanovení proteinů se provádělo na mikrodestičkách.

Do jamek destičky bylo pipetováno:

- 45 μ l deionizované vody
- 5 μ l vzorku
- 200 μ l pracovního roztoku Bradfordova činidla
- jemně protřepáno a 5 – 30 minut ponecháno vyvíjet zbarvení, poté byla pomocí readru změřena absorbance při 595 nm

- pro každý vzorek byla provedena tři opakování na destičce

3.3.7 Kalibrační křivka pro bilirubin

Před měřením byly připraveny roztoky bilirubinu (BR) o koncentraci 0-1 μM dle Tab. 2. Dané množství bilirubinu bylo rozpuštěno v odpovídajícím množství Mastermixu. Následně bylo do jamek destičky napipetováno 200 μl vzorku vždy ve třech opakováních pro každou koncentraci. Na readru byla měřena fluorescence – excitace 441 nm a emise 528 nm.

Tab. 2 Příprava standardů bilirubinu (objemy uvedeny v μl).

| Koncentrace BR μM | Zásobní BR μl | Reakční pufr μl |
|------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 0 | 0 | 1000 |
| 0,1 | 0,5 | 999,5 |
| 0,2 | 1,0 | 999,0 |
| 0,3 | 1,5 | 998,5 |
| 0,4 | 2,0 | 998,0 |
| 0,5 | 2,5 | 997,5 |
| 0,6 | 3,0 | 997,0 |
| 0,7 | 3,5 | 996,5 |
| 0,8 | 4,0 | 996,0 |
| 0,9 | 4,5 | 995,5 |
| 1,0 | 5,0 | 995,0 |

3.3.8 Stanovení aktivity hemoxygenasy

Před měřením byl připraven vždy čerstvý reakční pufr a roztok NADPH. Měření aktivity se provádělo na mikrodestičkách.

Do jamek destičky pipetováno:

- 200 μl reakčního pufru
- 30 μl extraktu BVR
- 20 μl vzorku (pro blank použít pufr)
- inkubace v readru při 37°C po dobu 5 minut
- start reakce přidavkem 20 μl NADPH do každé jamky
- měření změn fluorescence - excitace 441 nm, emise 528 nm, po dobu 30 minut každých 30 sekund.
- pro každý vzorek byla na destičce provedena dvě opakování

3.3.9 SDS-PAGE

Vhodně naředěné vzorky pro elektroforézu byly smíchány v poměru 1:1 se vzorkovacím pufrem. Po důkladném promíchání byly pět minut povařeny. Následovalo ochlazení v ledové lázni a na závěr byl vzorek centrifugován po dobu 5 minut při 6000g.

Gely pro elektroforézu byly připraveny dle Tab. 2. Objemy odpovídají přípravě 2 gelů pro skla o velikosti 10x10 cm se spacersy tloušťky 0,75 mm. Jako standard byl použit Unstained Protein Standards (Bio-Rad).

Tab. 3 Složení dělicího a zaostřovacího gelu. Objemy daných složek uvedeny v ml.

| Typ gelu | AA/BIS 30%/0,8% | Tris HCl 1,5M, pH 8,8 | Tris HCl 0,5M, pH 6,8 | H ₂ O | SDS | TEMED | Start APS |
|-------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------|-----|-------|--------------|
| Dělicí 10% | 3,4 | 2,5 | - | 3,8 | 0,1 | 0,01 | 0,07 |
| Zaostřovací 4% | 1,3 | - | 2,5 | 5,9 | 0,2 | 0,02 | 0,12 |

Start polymerace gelu byl proveden přidávkem persíranu amonného (APS) do směsi pro daný gel. Jako první byl připraven mezi skly dělicí gel. Pro rovnou plochu na něj byla nanášena vrstva *n*-butanolu. Po jeho zatuhnutí byl *n*-butanol vymyt a byl nanášen gel zaostřovací. Do zaostřovacího gelu byly připraveny jamky pomocí plastového hřebínku. Po důkladném zatuhnutí gelů, byla skla s gely umístěna do elektroforetické komůrky a prostor byl vyplněn elektrodoým pufrem tak, aby pufr přesahoval horní hranu skla. Poté byly do jamek nanášeny vzorky a markery molekulové hmotnosti. Gely byly takto připraveny ve dvojici. Uzavřená elektroforetická komůrka byla připojena ke zdroji, kde bylo nastaveno 100 V. Jakmile zóna bromfenolové modři (čelo dělicích se látek) doputovala na rozhraní zaostřovacího a dělicího gelu, bylo napětí zvýšeno na 200 V. Po doputování této zóny na úroveň dolního okraje skla, byla komůrka od zdroje odpojována.

Po oddělení gelu od skla, byl gel barven v komerčním roztoku Coomassie Blue BioSafe a poté opláchnut deionizovanou vodou a vyfocen v přístroji Gel Doc EZ Imager. Druhý gel s proteiny byl použit pro Western blotting.

3.3.10 Western blotting

Gel, který po elektroforéze nebyl barven roztokem Coomassie Blue, byl použit pro přenos proteinů z gelu na membránu. Použitá membrána byla nitrocelulózová. Ta byla společně s dalšími blotovacími potřebami (gel, filtrační papíry a porézní houbičky) namočena do blotovacího pufru na 15 minut. Po důkladném namočení v blotovacím pufru, byly vrstvy skládány na černou desku blotovací kazety v následujícím pořadí: porézní houbička, filtrační papír, gel, membrána, filtrační papír a porézní houbička. Kazeta byla uzavřena, vložena do blotovací komůrky, která byla naplněna blotovacím pufrem a uzavřena víkem. Takto připravená komůrka byla umístěna do ledničky a připojena ke zdroji proudu. Velikost proudu, který procházel komůrkou, byla spočítána na základě velikosti membrány (na 1 cm² připadá 0,8 mA). Blotování bylo ponecháno probíhat přes noc. Po jeho ukončení byla z blotovací kazety vyjmuta membrána. Pro detekci proteinů byla membrána barvena roztokem Ponceau S. Poté byla pro odbarvení promývána deionizovanou vodou.

3.3.11 Imunochemická detekce proteinů na membráně

Byl připraven 1% roztok sušeného mléka v TBS. Nejprve byla membrána obsahující proteiny inkubována hodinu v 50 ml roztoku 1% sušeného mléka. Následně byla dvakrát promyta 50 ml roztoku Tweenu v TBS po dobu 5 minut. Po promytí byla přes noc inkubována s 5 µl primární protilátky (králičí polyklonální anti-HO) v 5 ml 1% roztoku sušeného mléka (ředění 1:1000). Druhý den následovalo opět dvojité promytí v 50 ml roztoku Tweenu v TBS po dobu 5 minut. Poté byla membrána inkubována s 2,5 µl sekundární protilátky (kozí proti králičím IgG značená křenovou peroxidasou) ve 25 ml 1% roztoku sušeného mléka (ředění 1:10 000). Inkubace trvala dvě hodiny a po jejím skončení byla membrána dvakrát promyta v 50 ml roztoku Tweenu v TBS po dobu 5 minut. Poté byla membrána přenesena na podložku a byl na ni nanesen 1 ml roztoku chemiluminiscenčního substrátu Luminata Classico Western HRP Substrate. Nanesený substrát reagoval s křenovou peroxidasou sekundární protilátky. Tato reakce je doprovázena chemiluminiscencí, která byla zachycena chemiluminiscenčním scannerem.

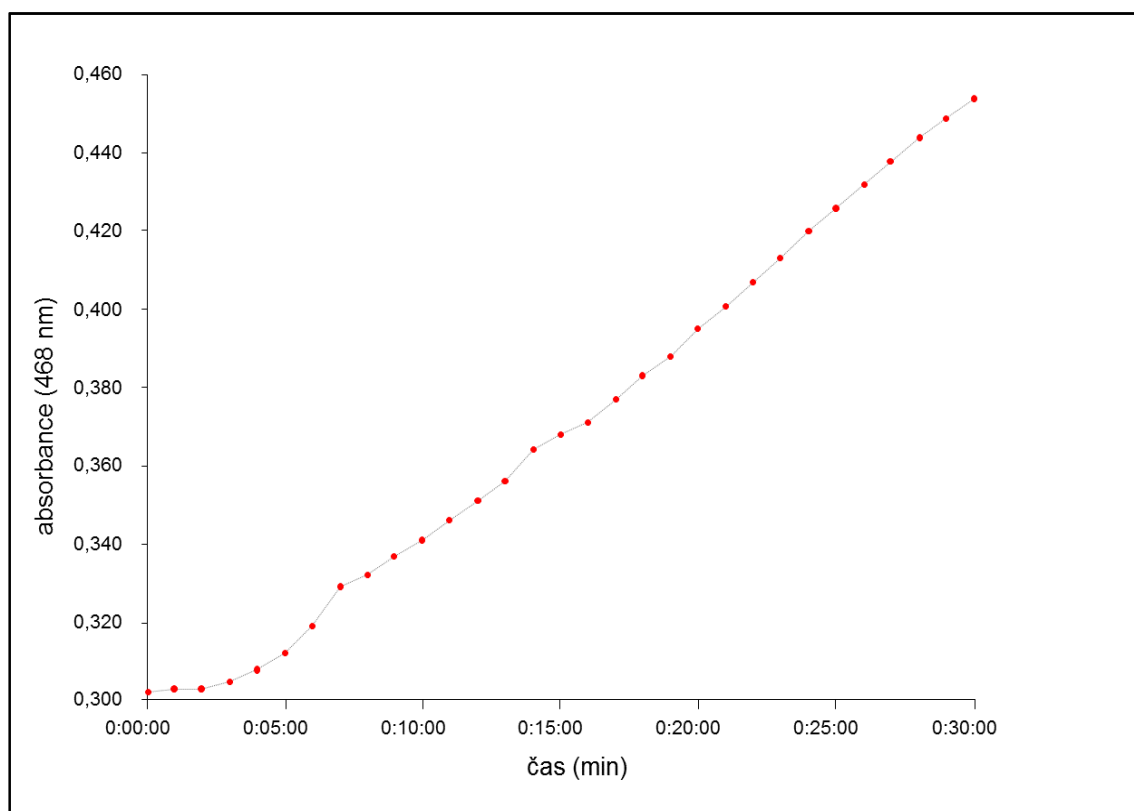
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Měření aktivity biliverdinreduktasy

Biliverdinreduktasa je enzym využívaný pro stanovení aktivity hemoxygenasy. Hemoxygenasa katalyzuje odbourávání hemu na biliverdin a biliverdinreduktasa biliverdinu na bilirubin. Ten je detekován měřením změn absorbance nebo fluorescence v časovém intervalu. Při tomto měření byla měřena absorbance, protože můžeme přímo vypočítat, na základě známé hodnoty molárního absorpčního koeficientu, koncentraci vzniklého bilirubinu.

Pro výpočet aktivity biliverdinreduktasy byly měřeny změny absorbance při 468 nm po dobu 30 minut každých 60 sekund.

Z grafu na Obr. 8 je patrné, že docházelo k nárůstu absorbance vzniklého bilirubinu v čase 30 minut. To znamená, že bilirubin byl pomocí BVR z biliverdinu tvořen stále a jeho koncentrace ve vzorku narůstala, což odpovídá čím dál vyšším hodnotám absorbance. Tyto výsledky ukazují, že připravený preparát ze sleziny obsahoval funkční BVR a mohl být využíván v dalších měřeních. Molární extinkční koeficient pro bilirubin je $60,7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Z Lambert-Beerova zákona ($A = \epsilon \cdot l \cdot c$) lze vypočítat koncentraci bilirubinu pro danou změnu absorbance která činila 0,155. V jamce mikrotitrační destičky se během 30 minut vytvořila 2,5 M koncentrace vzniklého bilirubinu. Vypočtená výsledná aktivita enzymu biliverdinreduktasy v preparátu je 12,3 $\mu\text{kat/ml}$.



Obr. 8 Stanovení aktivity BVR sledováním nárůstu absorbance bilirubinu s časem.

Z literatury bylo zjištěno, že aktivita čisté krysí rekombinantní biliverdinreduktasy je 3 μ kat/mg (Enzolifesciences). Aktivita extrahovaného preparátu obsahující BVR byla 12,3 μ kat/ml. Je nutno zdůraznit, že v našem případě se nejednalo o čistý preparát, ale směs proteinů.

Aktivita BVR v preparátu připraveném z vepřové sleziny byla měřena pomocí změn absorbance, zatímco měření aktivity hemoxygenasy v rostlinných vzorcích bylo provedeno měřením změn fluorescence. Důvodem je, že zaznamenávání změn fluorescence je daleko citlivější než zaznamenávání změn absorbance.

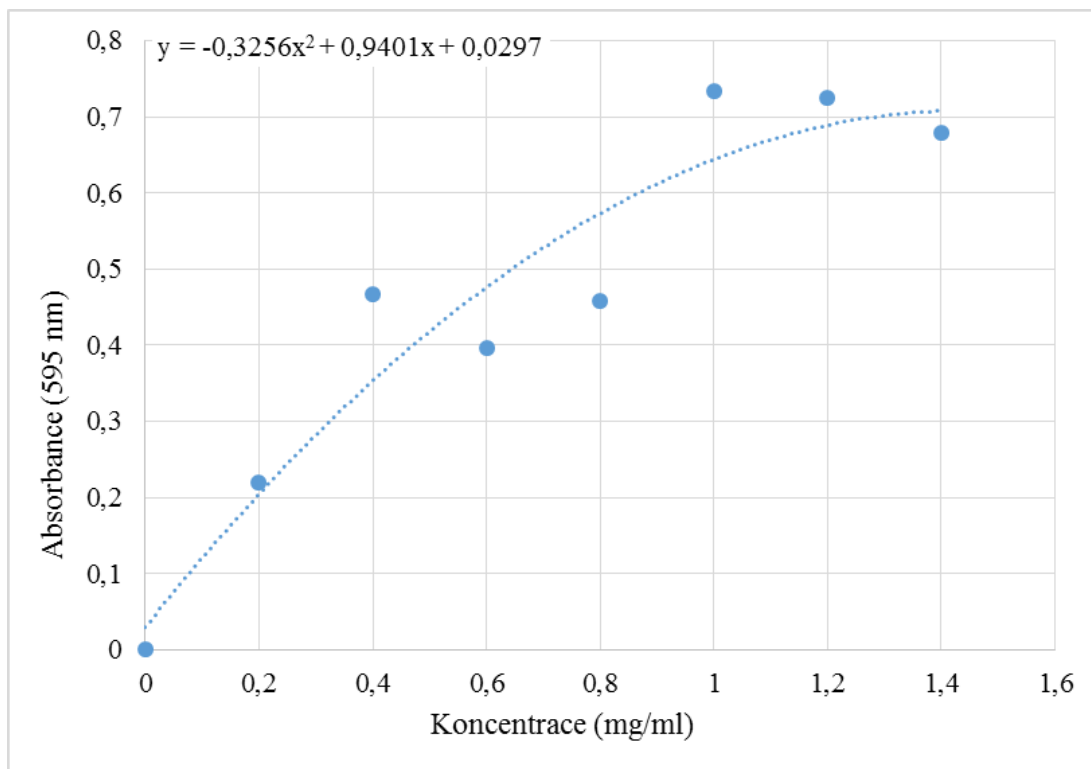
4.2 Stanovení množství proteinů ve vzorku Bradfordovou metodou

Před stanovením proteinů v rostlinných vzorcích byla nejprve sestavena kalibrační křivka pro hovězí sérový albumin (BSA).

Pro měření byly připraveny zásobní roztoky o koncentracích BSA 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 a 1,4 mg/ml. Ty byly do destičky pipetovány stejně jako vzorky.

Z kalibrační křivky na Obr. 9. Byla získána rovnice, která dále posloužila pro výpočet koncentrace proteinů v rostlinných vzorcích.

$$\text{Rovnice: } y = -0,3256x^2 + 0,9401x + 0,0297$$



Obr. 9 Kalibrační křivka Bradfordovy metody pro BSA.

4.2.1 Měření množství proteinů v rostlinných vzorcích

Množství proteinů bylo stanoveno ve frakcích získaných extrakcí semenáčků rajčat ošetřených zvlášť vodou (kontrola) a zvlášť heminem (vzorek). Jednalo se o frakce chloroplastovou, mitochondriální a cytoplazmatickou.

V Tab. 3 jsou zachyceny výsledné koncentrace v mg/mL v daných frakcích extraktu ze semenáčku po aplikaci heminu po dobu 3 – 7 dní. Z Tab. 3 je patrné, že ve všech případech vzorků ošetřených heminem byla sledována vyšší koncentrace proteinů ve frakci chloroplastové a mitochondriální, než v kontrolních frakcích. Množství proteinů v cytoplazmatické frakci bylo přibližně stejné. Tato frakce byla pro vyhodnocení nejméně důležitá, jelikož by v ní neměl být obsažen zkoumaný enzym hemoxygenasa. Při

správném provedení extrakce by hemoxygenasu měla obsahovat pouze frakce chloroplastová a mitochondriální.

Získané hodnoty množství proteinů dále posloužili k výpočtu specifické aktivity hemoxygenasy.

Dosažené výsledky mohou poukazovat na souvislost mezi aplikací heminu a vyšším obsahem proteinů v semenáčcích. Aplikace heminu vede ke zvýšené aktivaci mnoha signálních drah, jejichž důsledkem může být např. zvýšená tvorba kořenového systému rostlin. V semenáčcích rajčat kořenový systém představuje obsahově větší část celé rostlinky, což by mohlo být vysvětlením pro naměřený vyšší obsah proteinů u vzorků mitochondriální frakce ošetřených heminem. Dalším možným vysvětlením je, že aplikace heminu způsobila u semenáčků rajčat zvýšený obsah železa, který vyvolal nadměrný vývoj semenáčků. Pro měření obsahu proteinů v rostlinných vzorcích je důležitým faktorem i obsah vakuol, neboť ty neobsahují žádné proteiny. Vysoký obsah vakuol mají hlavně starší rostlinky. Pro tato tvrzení je ale potřeba dalšího výzkumu.

Tab. 4 Množství proteinů v mg/ml ve frakcích extraktu semenáčků rajčete po aplikaci heminu.

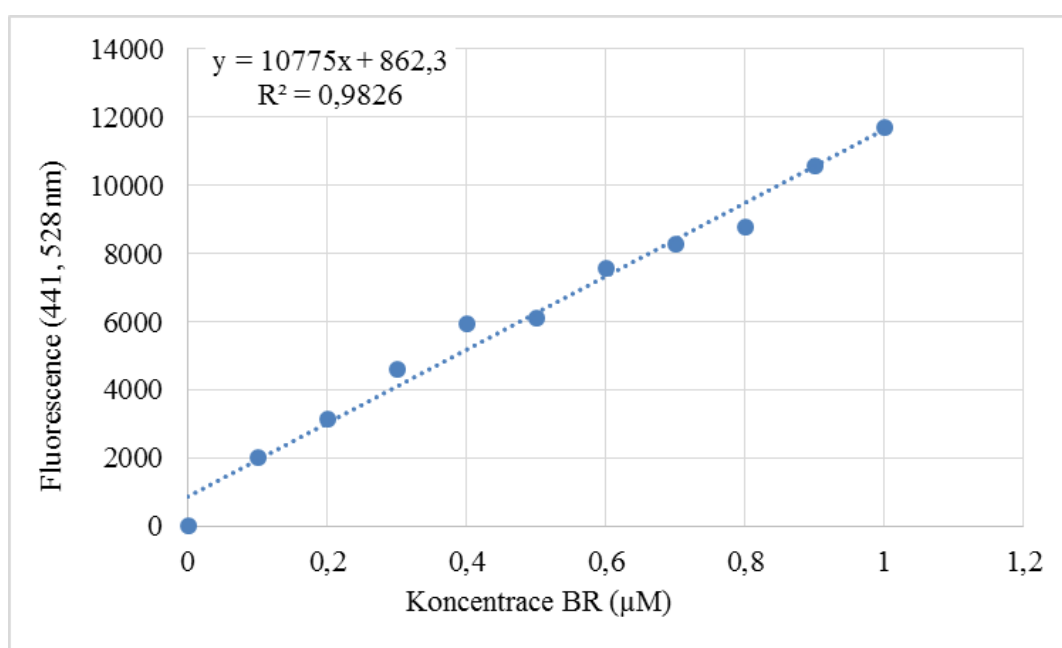
| mg/ml | | Chloroplastová frakce | Mitochondriální frakce | Cytoplazmatická frakce |
|-------|----------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| 3 dny | Hemin | 4,9 | 3,4 | 1,1 |
| | Kontrola | 3,4 | 2,2 | 1,1 |
| 5 dnů | Hemin | 5,4 | 4,2 | 1,7 |
| | Kontrola | 3,6 | 2,2 | 1,9 |
| 7 dnů | Hemin | 5,5 | 4,4 | 1,9 |
| | Kontrola | 4,1 | 3,1 | 2,0 |

4.3 Měření aktivity hemoxygenasy

4.3.1 Kalibrační křivka pro bilirubin

Pro ředění vzorků byl použit reakční pufr, jelikož je dále využíván ke stanovení aktivity hemoxygenasy, kde se měřila fluorescence vzniklého bilirubinu. Kalibrační křivka pro bilirubin byla sestavena proto, že z ní získaná rovnice sloužila ke stanovení aktivity výše zmíněného enzymu.

Na Obr. 10 je znázorněna kalibrační křivka pro bilirubin, z níž byla získána rovnice $y = 10775x + 862,3$.



Obr. 10 Kalibrační křivka pro bilirubin. Měřena závislost fluorescence na koncentraci bilirubinu.

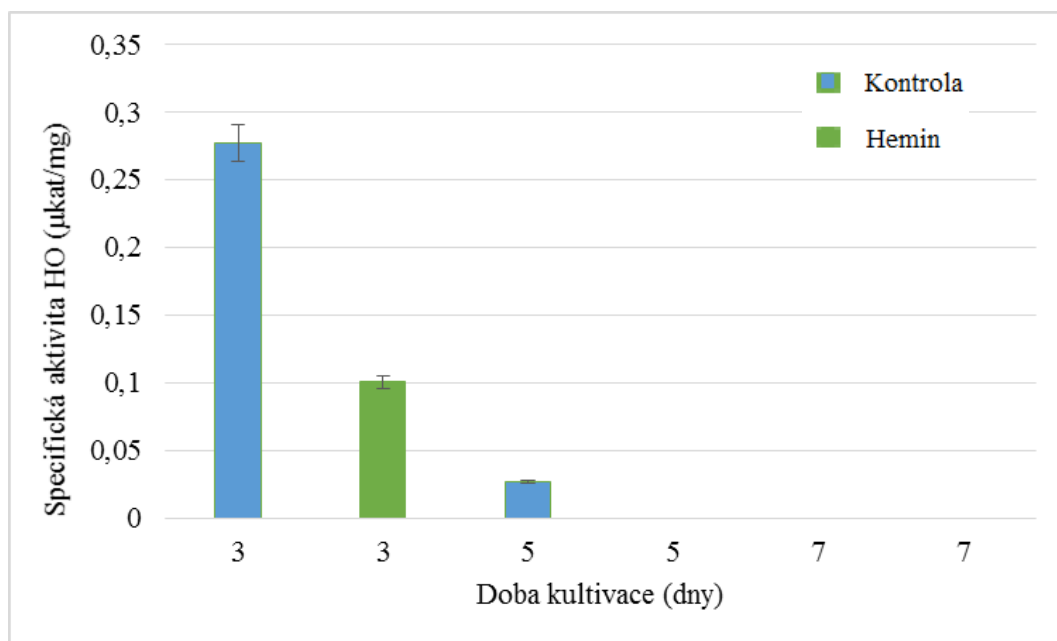
4.3.2 Stanovení aktivity hemoxygenasy v rostlinných vzorcích

Pro stanovení aktivity hemoxygenasy v rostlinných vzorcích byly využity frakce chloroplastová, mitochondriální a cytoplazmatická získané z extraktů semenáčků rajčat vystavených působení heminu a kontrolních semenáčků, ke kterým byla přidána voda.

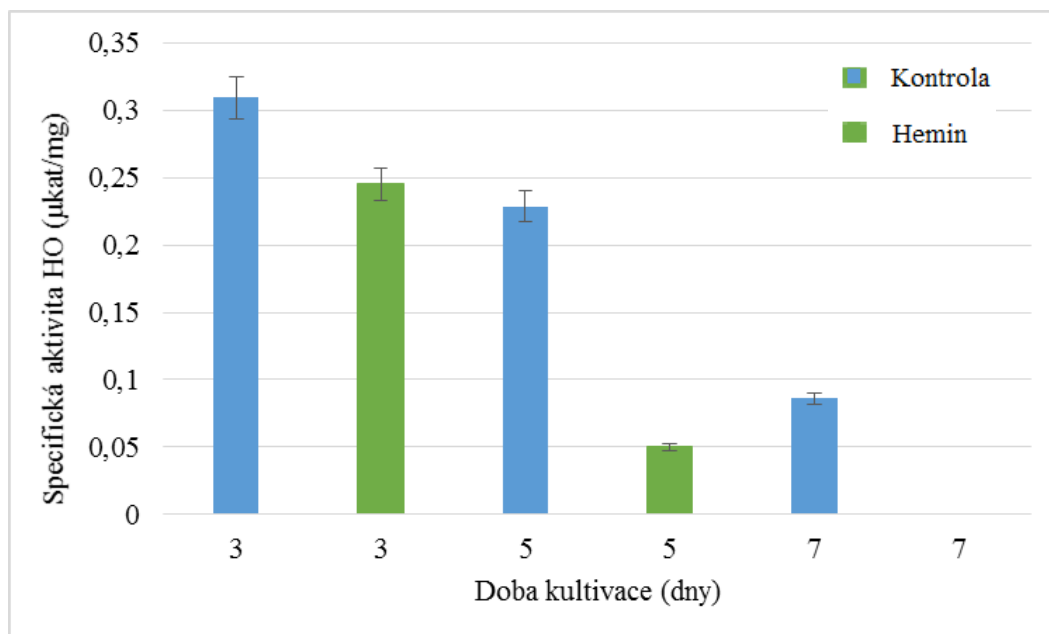
Na Obr. 11 je znázorněn sloupcový graf porovnávající aktivity HO v chloroplastové frakci z extraktu semenáčků rajčat kultivovaných po dobu 3 - 7 dnů. Z grafu je patrné, že aktivita HO ve vzorcích vystavených heminu je vždy nižší, než u kontrolních vzorků, což

je v rozporu s předpokladem, kde byla očekávána vyšší aktivita HO u vzorků ošetřených heminem. Dalším významným výsledkem je, že byl zaznamenán postupný pokles aktivity HO jak u kontrolních vzorků, tak i ve vzorcích vystavených heminu. Vzorky vystavené heminu měly již neměřitelnou aktivitu HO po 5-denní kultivaci s heminem, zatímco kontrolní vzorky až po 7-denní.

Na Obr. 12 je znázorněn sloupcový graf porovnávající aktivity HO v mitochondriální frakci z extraktu semenáčků rajčat kultivovaných po dobu 3 - 7 dnů. Opět byla pozorována vyšší aktivita HO v kontrolních vzorcích, než u vzorků po aplikaci heminu. Byl také zaznamenán postupný pokles aktivity HO během narůstající doby kultivace. V porovnání s grafem pro chloroplastovou frakci extraktu ze semenáčků rajčat na Obr. 11 je ale zřejmé, že v mitochondriální frakci extraktu ze semenáčků rajčat je aktivita HO vyšší a aktivity jsou měřitelné i po 5-denní a 7-denní kultivaci. Jediným vzorkem, kde nebyla aktivita v mitochondriální frakci extraktu ze semenáčků rajčat měřitelná, je vzorek kultivovaný 7 dní s heminem.



Obr. 11 Stanovení specifické aktivity HO v chloroplastové frakci u vzorků semenáčků po aplikaci heminu po dobu 3; 5 a 7 dnů.



Obr. 12 Stanovení specifické aktivity HO v mitochondriální frakci u vzorků semenáčků po aplikaci heminu po dobu 3; 5 a 7 dnů.

Cytoplazmatická frakce není znázorněna, protože aktivita HO byla ve všech případech neměřitelná, což znamená, že tato frakce enzym obsahovala ve velmi malém nebo žádném množství.

Dosažené výsledky týkající se vyšší aktivity HO v kontrolních vzorcích oproti vzorkům, kde byl aplikován hemin, jsou v porovnání v rozporu s literaturou, kde byla aktivita HO vyšší po aplikaci heminu/hematinu, než u kontrolních vzorků (Chen *et al.*, 2012; Xuan *et al.*, 2008a). V literatuře Chen *et al.*, 2012 byly jako rostlinný materiál použity rostlinky rýže, zatímco v literatuře Xuan *et al.*, 2008a byly použity semenáčky rajčat. Literatura Xuan *et al.*, 2008a dále uvádí specifickou aktivitu HO pro semenáčky inkubované s 10 µM hematinem. Specifická aktivita HO je po 1-denní inkubaci s touto látkou v rozmezí 13 - 15 nkat/mg (Xuan *et al.*, 2008b). Naše vzorky po 3-denní inkubaci s 0,2 mM heminem vykazovaly specifickou aktivitu HO 100 nkat/mg v chloroplastové frakci a 245 nkat/mg v mitochondriální frakci. Důvod vyšší aktivity našich vzorků po aplikaci heminu, může být ten, že byla použita 20krát vyšší koncentrace použitého roztoku heminu, což by znamenalo, že aktivita HO se ve vzorcích po aplikaci heminu ve srovnání s literaturou tolik nelišila. Důležité je ale zdůraznit, že v našich pokusech byla

aktivita HO měřena až po 3 a více dnech po aplikaci heminu. Provedené studie ale dokázaly, že aplikace heminu/hematinu vede ke zvýšení aktivity HO již několik hodin od aplikace (Xuan *et al.*, 2008a). Z těchto výsledků lze tedy usoudit, že kdyby byla aktivita HO v našich vzorcích měřena dříve jak po 3 dnech, bylo by možné naměřit vyšší hodnoty aktivity HO, jelikož po delší době od aplikace, již docházelo k vyčerpání a odbourávání aplikovaného heminu v semenáčcích rajčat.

Zajímavostí je, že v literatuře (Chen *et al.*, 2012; Xuan *et al.*, 2008a) se uvádí aktivita HO pro kontrolní vzorky 5 nkat/mg, zatímco v našem pokusu byly získány hodnoty HO pro kontrolní vzorky až 60krát vyšší.

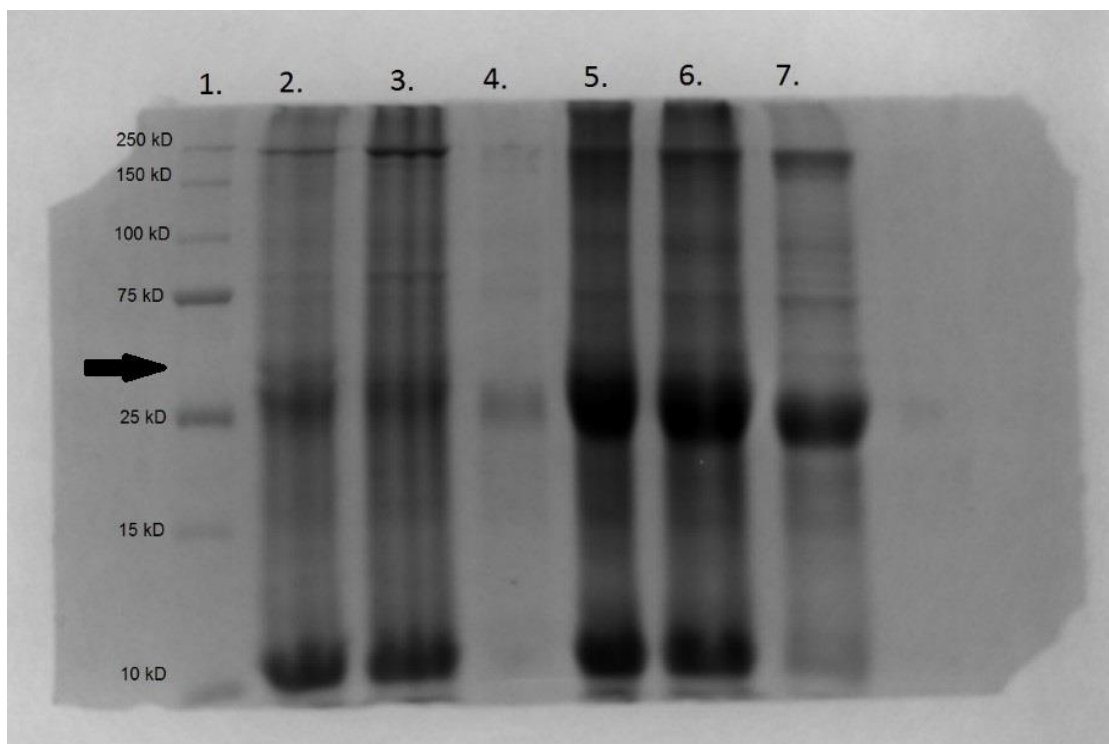
Získané výsledky potvrdily výskyt HO v chloroplastech a mitochondriích. Měření aktivity HO zvláště v chloroplastové a zvláště v mitochondriální frakci je přínosem do dalších studií pro provedení důkladnější měření. V citované literatuře probíhalo měření pouze v jednom rostlinném extraktu, což mohlo mít také vliv na měření aktivity HO.

4.4 Analýza rostlinných vzorků metodou SDS-PAGE

Gel s rozdělenými proteiny po provedené SDS-PAGE se dále využíval pro Western blotting, na který navazovala imunochemická detekce proteinů na membráně.

Pro elektroforézu byly použity rostlinné vzorky z *Arabidopsis thaliana* a okurky. Vzorky z okurky byly získány z listů rostliny a z *A. thaliany* z celé mladé rostlinky (stáří 10 dní). Vzorky byly extrahovány dle uvedeného návodu pro extrakci rostlinného materiálu. Jako vzorky byly použity chloroplastová, mitochondriální a cytoplazmatická frakce. Do jamek bylo nanášeno 20 μ l rostlinného vzorku a 5 μ l markeru molekulové hmotnosti.

Na Obr. 13 je snímek po provedení SDS-PAGE elektroforézy daných vzorků. Z literatury bylo zjištěno, že molekulová hmotnost izoformy HO1 je 32 kD (Barton *et al.*, 2003). Přibližné místo výskytu izoformy HO1 je na Obr. 13 naznačenou šipkou.

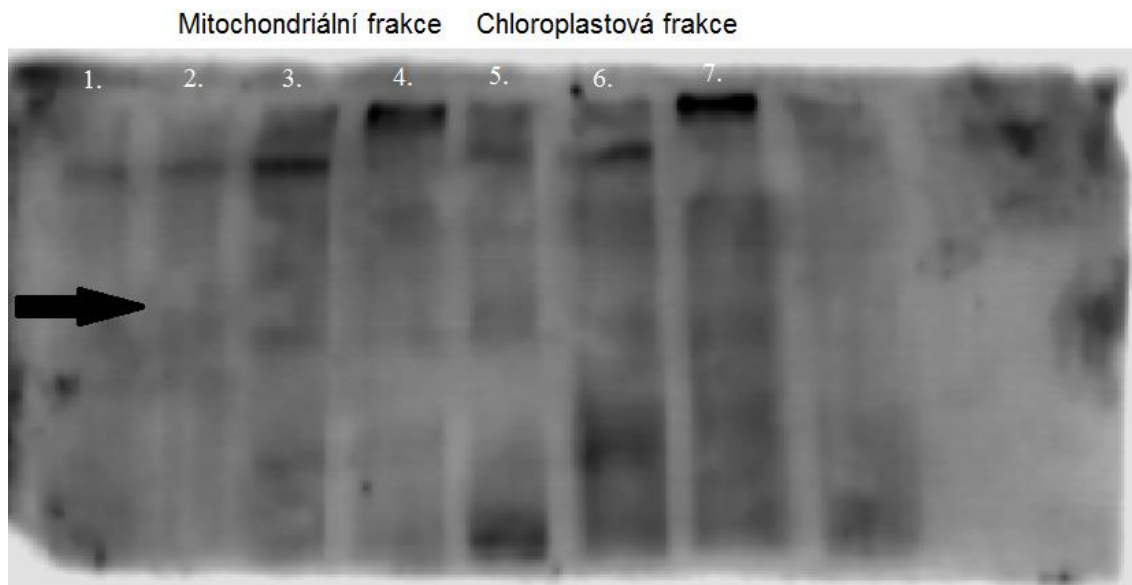


Obr. 13 Detekce proteinů ve vzorcích extraktů. Jamka 1 marker molekulové hmotnosti, jamka 2; 3 a 4 extrakt z *Arabidopsis thaliana*: 2 - chloroplastová frakce, 3 - mitochondriální frakce, 4 - cytoplazmatická frakce. Jamka 5; 6 a 7 extrakt z listů okurky: 5 - chloroplastová frakce, 6 - mitochondriální frakce, 7 - cytoplazmatická frakce. Gel po provedení SDS-PAGE barven Coomasie Blue.

4.5 Imunochemická detekce proteinů na membráně

Nejprve byla provedena SDS-PAGE elektroforéza rostlinných vzorků. Následně byl proveden přenos proteinů na membránu pomocí Western Blottingu.

Na Obr. 14 je snímek zachycující výsledek detekce HO na membráně. Výsledek ale neodpovídá předpokladům. Důvodem je použití zkušební vzorku komerční primární protilátky, která zřejmě interaguje s jinými proteiny, než je HO. Důvodem je zachycení luminiscence v horní části membrány, zatímco HO by měla poskytovat luminiscenční signál ve středové oblasti membrány. Tato oblast je na Obr. 14 vyznačena šipkou.



Obr. 14 Zachycení luminiscence rostlinných proteinů na membráně po imunochemické detekci. Jamka 1 marker molekulové hmotnosti, jamka 2; 3 a 4 mitochondriální frakce z: 2 - semenáček rajčete, 3 - listy rajčete, 4 - listy okurky. Jamka 5; 6 a 7 chloroplastová frakce z: 5 - semenáček rajčete, 6 - listy rajčete, 7 - listy okurky.

Dosažené výsledky byly konzultovány s literaturou, kde se detekce pro izoformu HO1 uvádí v páse 32 kD a pro izoformu HO2 v páse 36 kD (Barber *et al.*, 1999). Zkušební vzorek komerční primární anti-HO protilátky, použitý pro detekci HO v rostlinných vzorcích, ale interagoval s proteiny v oblasti 250 - 150 kD, tudíž se jednalo o zcela jiné proteiny. Tento fakt znemožnil další možné postupy po detekci, jako bylo např. stanovení množství proteinů v extraktech pomocí metody Western blotting.

5 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byla vypracována literární rešerše týkající se biologických funkcí hemoxygenasy (HO) se zaměřením na oxidativní stres živočichů a rostlin. Dále byla vypracována literární rešerše shrnující signální role oxidu uhelnatého (CO) u živočichů a rostlin.

Nejvýznamějšími výstupy praktické části bakalářské práce týkající se hemoxygenasy jsou:

- Provedení izolace biliverdinreduktasy (BVR) z vepřové sleziny s následným měřením aktivity.
- Pozorování vlivu aplikace roztoku heminu na aktivitu HO v *S. lycopersicum*.
- Porovnání dosažených výsledků s literaturou, čímž bylo zjištěno, že aplikace heminu způsobila zvýšení aktivity HO.
- Zavedení protokolu metod studia HO v rostlinách.
- Provedení imunochemické detekce HO na membráně pomocí zkušební vzorku komerční anti-HO protilátky, která se ukázala jako nevyužitelná pro další detekci.
- Zavedení kultivace semenáčků *S. lycopersicum* na filtračním papíře s aplikací roztoků.

V bakalářské práci byl ověřen vliv heminu na aktivitu HO v *S. lycopersicum*. Provedené metody lze označit jako součást protokolu metod studia HO v rostlinách. V budoucnu se nabízí detailnější prozkoumání vlivu aplikace heminu na aktivitu HO v kratších časových intervalech zavedenými experimentálními metodami.

6 LITERATURA

- Abraham N.G., Nelson J.C., Ahmed T., Konwalinka G., Levere R.D. (1989): Erythropoietin controls heme metabolic enzymes in normal human bone marrow culture. *Experimental Hematology* **17**: 908–913.
- Abraham N.G., Levere R.D., Lutton J.D. (1991): Eclectic mechanisms of heme regulation of hematopoiesis. *International Journal of Cell Cloning* **9**: 185–210.
- Allen E.R. (1977): Properties and reactions of carbon monoxide. In: *Carbon Monoxide (National Research Council—Subcommittee on Carbon Monoxide)*, National Academy of Sciences, 4-27.
- Archakov A.I., Karuzina I.I., Petushkova N.A., Lisitsa A.V., Zgoda V.G. (2002): Production of carbon monoxide by cytochrome P450 during iron-dependent lipid peroxidation. *Toxicology in Vitro* **16**: 1-10.
- Balestrasse K.B., Noriega G.O., Batlle A., Tomaro M.L. (2005): Involvement of heme oxygenase as antioxidant defense in Soybean nodules. *Free Radical Research* **39**: 145-151.
- Balestrasse K.B., Yannarelli G.G., Noriega G.O., Batlle A., Tomaro M.L. (2008): Heme oxygenase and catalase gene expression in nodules and roots of soybean plants subjected to cadmium stress. *Biometals* **21**: 433-441.
- Balla G., Jacob H.S., Balla J., Rosenberg M., Nath K., Apple F., Eaton J.W., Vercellotti G.M. (1992): Ferritin: a cytoprotective stratagem of endothelium. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 18148–18153.
- Balla J., Jacob H.S., Balla G., Nath K., Eaton J.W., Vercellotti G.M. (1993): Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *PNAS* **90**: 9285–9289.
- Barber A., Robson S. C., Lyall F. (1999): Hemoxygenase and nitric oxide synthase do not maintain human uterine quiescence during pregnancy. *The American Journal of Pathology* **155**: 831-840.
- Barton S.G.R.G., Rampton D.S., Winrow V.R., Domizio P., Feakins R.M. (2003): Expression of heat shock protein 32 (hemoxygenas-1) in the normal and inflamed human stomach and colon: an immunohistochemical study. *Cell Stress Chaperones* **8**: 329-334.
- Beligni M.V. a Lamattina L. (2000): Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyls elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* **210**: 215-221.
- Brown S.D. a Piantadosi C.A. (1989): Reversal of carbon monoxide-cytochrome *c* oxidase binding by hyperbaric oxygen in vivo. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **248**: 747–754.
- Cao Z.-Y., Xuan W., Liu Z.-Y., Li X.-N., Zhao N., Xu P., Wang Z., Guan R.-Z., Shen W.-B. (2007a): Carbon monoxide promotes lateral root formation in rapeseed. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**: 1007-1016.
- Cao Z.-Y., Huang B.-K., Wang Q.-Y., Xuan W., Ling T.-F., Zhang B., Chen X., Nie L., Shen W.-B. (2007b): Involvement of carbon monoxide produced by heme oxygenase in ABA-induced stomatal closure in *Vicia faba* and its proposed signal transduction pathway. *Chinese Science Bulletin* **52**: 2365-2373.
- Cardell L.O., Ueki I.F., Stjarne P., Agusti C., Takeyama K., Linden A., Nadel J.A. (1998): Bronchodilatation in vivo by carbon monoxide, a cyclic GMP related messenger. *British Journal of Pharmacology* **124**: 1065–1068.
- Chen M., Shen W.-B., Ruan H.-H., Xu L.-L. (2004): Effects of nitric oxide on root growth and its oxidative damage in wheat seedling under salt stress. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* **30**: 569-576.
- Chen Y.-H., Chao Y.-Y., Hsu Y.Y., Hong C.-Y., Kao C.H. (2012): Heme oxygenase is involved in nitric oxide- and auxin-induced lateral root formation in rice. *Plant Cell Reports* **31**: 1085-1091.

- Christodoulides N., Durante W., Kroll M.H., and Schafer A.I. (1995): Vascular smooth muscle cell heme oxygenase generate guanyl cyclase-stimulatory carbon monoxide. *Circulation* **91**: 2306-2309.
- Clark J.E., Naughton P., Shurey S., Green C.J., Johnson T.R., Mann B.E., Foresti R., Motterlini R. (2003): Cardioprotective actions by a water-soluble carbon monoxide releasing molecule. *Circulation Research* **93**: E2-E8.
- Crawford N.M. (2006): Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**: 471-478.
- Davis S., Bhoo S.H., Durski A.M., Walker J.M., Vierstra R.D. (2001): The heme oxygenase family required for phytochrome chromophore biosynthesis is necessary for proper photomorphogenesis in higher plants. *Plant Physiology* **126**: 656-669.
- Dekker J. a Hargrove M. (2002): Weedy adaptation in *Setaria* spp. V. Effects of gaseous environment on giant foxtail (*Setaria faberii*) (Poaceae) seed germination. *American Journal of Botany* **89**: 410-416.
- Delledonne M. (2005): NO news is good news for plant. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 390-396.
- Donnelly L.E. a Barnes P.J. (2001): Expression of heme oxygenase in human airway epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **24**: 295-303.
- Duckers H.J., Boehm M., True A.L., Yet S.F., San H., Park J.L., Clinton Webb R., Lee M.E., Nabel G.J., and Nabel E.G. (2001): Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. *Nature Medicine* **7**: 693-698.
- Dulak J.J. a Józkwicz A. (2003): Carbon monoxide-a „new“ gaseous modulator of gene expression. *Acta Biochimica Polonica* **50**: 31-47.
- Elich T.D., McDonagh A.F., Palma L.A., Lagarias J.C. (1989): Phytochrome chromophore biosynthesis. Treatment of tetrapyrroled deficient Avena explants with natural and non natural bilatrienes leads to formation of spectrally active holoproteins. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 183-189.
- Emborg T.J., Walker J.M., Noh B., Vierstra R.D. (2006): Multiple heme oxygenase family members contribute to the biosynthesis of the phytochrome chromophore in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **140**: 856-868.
- Enzolifesciences:
<http://www.enzolifesciences.com/ADI-OSP-450/biliverdin-reductase-rat-recombinant/>
 (30.4.2016)
- Esmon, C. T. (2005): The interactions between inflammation and coagulation. *British Journal of Haematology* **131**, 417-430.
- Estabrook R.W., Franklin M.R., Hildebrandt A.G. (1970): Factors influencing the inhibitory effect of carbon monoxide on cytochrome *p*-450-catalyzed mixed function oxidation reactions. *Annals of the New York Academy of Sciences* **174**: 218-232.
- Fang T., Li J., Cao Z., Chen M., Shen W., Huang L. (2014): Heme oxygenase-1- is involved in sodium hydrosulfide-induced lateral root formation in tomato seedlings. *Plant Cell Reports* **33**: 969-978.
- Ferris C.D., Jaffrey S.R., Sawa A., Takahashi M., Brady S.D., Barrow R.K., Tysoe S.A., Wolosker H., Baranano D.E., Dore S., Poss K.D., Snyder S.H. (1999): Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nature Cell Biology* **1**: 152-157.
- Foresti R., Hammad J., Clark J.E., Johnson T.R., Mann B.E., Friebe A., Green C.J., Motterlini R. (2004): Vasoactive properties of CORM-3, a novel water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *British Journal of Pharmacology* **142**: 453-460.
- Furchgott R.F. a Jothianandan D. (1991): Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels* **28**: 52-61.

- Gohya T., Zhang X., Yoshida T., Migita C.T. (2006): Spectroscopic characterization of a higher plant heme oxygenase isoform-1 from *Glycine max* (soybean): coordination structure of the heme complex and catabolism of heme. *FEBS journal* **273**: 5384-5399.
- Gorman D., Drewry A., Huang Y.L., Sames C. (2003): The clinical toxicology of carbon monoxide. *Toxicology* **187**: 25-38.
- Greene B.T., Thorburn J., Willingham M.C., Thorburn A., Planalp R.P., Brechbiel M.W., Jennings-Gee J., Wilkinson J., Torti F.M., Torti S.V. (2002): Activation of caspase pathways during iron chelator-mediated apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 25568-25575.
- Guengerich F.P. a Shimada T. (1991): Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chemical Research in Toxicology* **4**: 391-407.
- Halliwell B. a Gutteridge J.M.C. (1999): *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed., Oxford Univ. Press, Oxford, UK.
- Hartsfield C.L. (2002): Cross talk between carbon monoxide and nitric oxide. *Antioxidants & Redox Signaling* **4**: 301-307.
- Horvath I., Donnelly L.E., Kiss A., Paredi P., Kharitonov S.A., Barnes P.J. (1998): Raised levels of exhaled carbon monoxide are associated with an increased expression of heme oxygenase-1 in airway macrophages in asthma: a new marker of oxidative stress. *Thorax* **53**: 668-672.
- Ishikawa K., Sato M., Yoshida T. (1991): Expression of rat heme oxygenase in *Escherichia coli* as a catalytically active, full length form that binds to bacterial membranes. *European Journal of Biochemistry* **202**: 161-165.
- Jiang X.P., Wang F., Yang D.C., Elliott R.L., Head J.F. (2002): Induction of apoptosis by iron depletion in the human breast cancer MCF-7 cell line and the 13762NF rat mammary adenocarcinoma in vivo. *Anticancer Research* **22**: 2685-2692.
- Kajimura M., Shimoyama M., Tsuyama S., Suzuki T., Kozaki S., Takenaka S., Tsubota K., Oguchi Y., Suematsu M. (2003): Visualization of gaseous monoxide reception by soluble guanylate cyclase in the rat retina. *FASEB Journal* **17**: 506-508.
- Kappas A. (2004): A method for interdicting the development of severe jaundice in newborns by inhibiting the production of bilirubin. *Pediatrics* **113**: 119-123.
- Kaur H., Hughes M.N., Green C.J., Naughton P., Foresti R., Motterlini R. (2003): Interaction of bilirubin and biliverdin with reactive nitrogen species. *FEBS Letters* **543**: 113-119.
- Keyse S.M. a Tyrrell R.M. (1989): Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *PNAS* **86**: 99-103.
- Kharitonov V.G., Sharma V.S., Pilz R.B., Magde D., Koesling D. (1995): Basis of guanylate cyclase activation by carbon monoxide. *PNAS* **92**: 2568-2571.
- Kim B.S., Yoon K.H., Oh H.M., Choi E.Y., Kim S.W., Han W.C., Kim E.A., Choi S.C., Kim T.H., Yun K.J., Kim E.C., Lyou J.H., Nah Y.H., Chung H.T., Cha Y.N., Jun C.D. (2002): Involvement of p38 MAP kinase during iron chelator-mediated apoptotic cell death. *Cellular Immunology* **220**: 96-106.
- Kim H.P., Wang X., Galbiati F., Ryter S.W., Choi A.M.K. (2004): Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB Journal* **18**: 1080-1089.
- Kohchi T., Mukougawa K., Frankenberg N., Masuda M., Yokota A., Lagarias J.C. (2001): The *Arabidopsis* HY2 gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin dependent biliverdin reductase. *The Plant Cell* **13**: 425-436.
- Kolla V.A. a Raghavendra A.S. (2007): Nitric oxide is a signaling intermediate during bicarbonate-induced stomatal closure in *Pisum sativum*. *Physiologia Plantarum* **130**: 91-98.
- Kovar J., Stunz L.L., Stewart B.C., Kriegerbeckova K., Ashman R.F., Kemp J.D. (1997): Direct evidence that iron deprivation induces apoptosis in murine lymphoma 38C13. *Pathobiology* **65**: 61-68.

- Kuwabara, Y., Kato, T., Sato, A., Fujii, Y. (2000): Prolonged Effect of Leukocytosis on Reperfusion Injury of Rat Intestine: Real-Time ATP Change Studied Using ^{31}P MRS. *Journal of Surgical Research* **89**, 38–42.
- Lin F. a Girotti A.W. (1998): Hemin-enhanced resistance of human leukemia cells to oxidative killing: antisense determination of ferritin involvement. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **352**: 51–58.
- Liu K.-L., Xu S., Xuan W., Ling T.-F., Cao Z.-Y., Huang B.-K., Sun Y.-G., Fang L., Liu Z.-Y., Zhao N., Shen W.-B. (2007): Carbon monoxide counteracts the inhibition of seed germination and alleviates oxidative damage caused by salt stress in *Oryza sativa*. *Plant science* **172**: 544-555.
- Longo M., Jain V., Vedernikov Y.P., Saade G.R., Goodroom L., Facchinetti F., Garfield R.E. (1999): Effect of nitric oxide and carbon monoxide on uterine contractility during human and rat pregnancy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* **181**: 981–988.
- Maestrelli P., El Messlemani A.H., De Fina O., Nowicki Y., Saetta M., Mapp C., Fabbri L.M.(2001): Increased expression of heme oxygenase (HO)-1 in alveolar spaces and HO-2 in alveolar walls of smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **164**: 1508–1513.
- Maines M.D. a Kappas A. (1976): Studies on the mechanism of induction of heme oxygenase by cobalt and other metal ion. *Biochemistry Journal* **154**: 125-131.
- Maines M.D. (1988): Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB Journal* **2**: 2557–2568.
- Maines M.D., Eke B.C., Zhao X. (1996): Corticosterone promotes increased heme oxygenase-2 protein and transcript expression in the newborn rat brain. *Brain Research* **722**: 83–94.
- Maines M.D. (1997): The heme oxygenase system: A regulator of second messenger genes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **37**: 517-554.
- Mancuso C., Bonsignore A., Di Stasio E., Mordente A., Motterlini R. (2003): Bilirubin and S-nitrosothiols interaction: evidence for a possible role of bilirubin as a scavenger of nitric oxide. *Biochemical Pharmacology* **66**: 2355–2363.
- Morita T. a Kourembanas S. (1995): Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. *Journal of Clinical Investigation* **96**: 2676-2682.
- Morita T., Perrella M.A., Lee M.E., Kourembanas S. (1995): Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *PNAS* **92**: 1475–1479.
- Motterlini R., Sawle P., Hammad J., Bains S., Alberto R., Foresti R, Green C.J. (2005): CORM-A1: a new pharmacologically active carbon monoxide-releasing molecule. *FASEB Journal* **19**: 284-286.
- Muramoto T., Kohchi T., Yokota A., Hwang I., Goodman H.M. (1999): The Arabidopsis photomorphogenic mutant *hyl* is deficient in phytochrome chromophore biosynthesis as a result of a mutation in a plastid heme oxygenase. *The Plant Cell* **11**: 335–348.
- Muramoto T., Tsurui N., Terry M.J., Yokota A., Kochi T. (2002): Expression and biochemical properties of a ferredoxin-dependent heme oxygenase required to phytochrome chromophore synthesis. *Plant Physiology* **130**: 1958-1966.
- Mustafa M.G. a King T.E. (1970): Binding of bilirubin with lipid: a possible mechanism of its toxic interactions in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* **245**: 1084–1089.
- Nagaoka S. a Cowger M.L. (1978): Interaction of bilirubin with lipids studied by fluorescence-quenching method. *Journal of Biological Chemistry* **253**: 2005–2011.
- Neuzil J. a Stocker R. (1993): Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Letters* **331**: 281–284.
- Noriega G.O., Balestrasse K.B., Batlle A., Tomaro M.L. (2004): Heme oxygenase exerts a protective role against oxidative stress in soybean leaves. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **232**: 1003-1008.

- Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hancock J.T. (2002): Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiology* **128**: 13–16.
- Oh S.J., Kim S.K., Kim Y.C. (2002): Role of glutathione in metabolic degradation of dichloromethane in rats. *Toxicology Letters* **129**: 107–114.
- Ostrow J.D., Jandl J.H., Schmid R. (1962): The formation of bilirubin from hemoglobin in vivo. *Journal of Clinical Investigation* **41**: 1628–1637.
- Otterbein L.E., Bach F.H., Alam J., Soares M., Tao Lu H., Wysk M., Davis R.J., Flavell R.A., Choi A.M.K. (2000): Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nature Medicine* **6**: 422–428.
- Otterbein L.E. a Choi A.M.K. (2000): Heme oxygenase: colors of defense againts cellular stress. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* **279**: 10299–1037.
- Pagnussat G.C., Simontacchi M., Puntarulo S., Lamattina L. (2002): Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiology* **129**: 954–956.
- Pagnussat G.C., Lanteri M.L., Lamattina L. (2003): Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting proces. *Plant Physiology* **132**: 1241–1248.
- Pagnussat G.C., Lanteri M.L., Lombardo M.C., Lamattina L. (2004): Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiology* **135**: 279–286.
- Piantadosi C.A., Zhang J., Levin E.D., Folz R.J., Schmechel D.E. (1997): Apoptosis and delayed neuronal damage after carbon monoxide poisoning in the rat. *Experimental Neurology* **147**: 103–114.
- Pimstone N.R., Engel P., Tenhunen R., Seitz P.T., Marver H.S., Schmid R. (1971): Inducible heme oxygenase in the kidney: a model for the homeostatic control of hemoglobin catabolism. *Journal of Clinical Investigation* **50**: 2042–2050.
- Raju V.S., McCoubrey W.K., Maines M.D. (1997): Regulation of heme oxygenase-2 by glucocorticoids in neonatal rat brain: characterization of a functional glucocorticoid response element. *Biochimica et Biophysica Acta* **1351**: 89–104.
- Roy-Chowdhury J. (1996): Bilirubin metabolism and its disorders. In: *Hepatology. A Textbook of Liver Disease*. vol. 1, 3rd ed., (Zakim D. a Boyer T.D.), Saunders, Philadelphia, 323–361.
- Ruan H.-H., Shen W.-B., Ye M.-B., Xu L.-L. (2002): Protective effects of nitric oxide on salt stress-induced oxidative damage to wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Chinese Science Bulletin* **47**: 677–681.
- Rudhe C., Clifton R., Chew O., Zemam K., Richter S., Lamppa G., Whelan J., Glaser E. (2004): Processing of the dual targeted precursor protein of glutathione reductase in mitochondria and chloroplasts. *Journal of Molecular Biology* **343**: 639–647.
- Ryter S., Kvam E., Tyrrell R.M. (2002): Heme oxygenase activity: current methods and applications. *Methods in Molecular Biology* **99**: 369–391.
- Ryter S.W. a Choi A.M.K. (2002): Heme oxygenase-1: molecular mechanisms of gene expression in oxygen-related stress. *Antioxidants & Redox Signaling* **4**: 625–632.
- Ryter S. a Otterbein L. (2004): Carbon monoxide in biology and medicine. *Bioessays* **26**: 270–280.
- Ryter S.W., Alam J., Choi A.M.K. (2006): Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiological Reviews* **86**: 583–650.
- Sa Z.-S., Huang L.-Q., Wu G.-L., Ding J.-P., Chen X.-Y., Yu T., Shi C., Shen W.-B. (2007): Carbon monoxide: a novel antioxidant against oxidative stress in wheat seedling leaves. *Jouranal of Integrative Plant Biology* **49**: 638–645.
- Sharma S.S. a Dietz K.-J. (2008): The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science* **14**: 1360–1385.
- She X.P. a Huang A.X. (2004): Change of nitric oxide and NADPH-diaphorase during the generation and the development of adventitious roots in mung bean hypocotyl cuttings. *Acta Botanica Sinica* **46**: 1049–1055.

- She X.P. a Song X.G. (2006): Cytokinin- and auxin-induced stomatal opening is related to the change of nitric oxide levels in guard cells in broad bean. *Physiologia Plantarum* **128**: 569-579.
- Shekhawat G.S. a Verma K. (2010): Haem oxygenase (HO): an overlooked enzyme of plant metabolism and defence. *Journal of Experimental Botany* **61**: 2255-2270.
- Shekhawat G.S., Dixit S., Verma K., Nasybullina E.I., Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. (2011): Heme oxygenase: enzyme with functional diversity. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry* **7**: 88-94.
- Shibahara S., Muller R.M., Taguchi H., Yoshida T. (1985): Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase. *PNAS* **82**: 7865-7869.
- Silva-Filho M.C. (2003): One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 589-595.
- Simonart T., Boelaert J.R., Mosselmans R., Andrei G., Noel J.C., De Clercq E., Snoeck R. (2002): Antiproliferative and apoptotic effects of iron chelators on human cervical carcinoma cells. *Gynecologic Oncology* **85**: 95-102.
- Slebos D.J., Ryter S.W., Choi A.M.K. (2003): Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in pulmonary medicine. *Respiratory Research* **4**: 7.
- Smith R.P. (1986): Toxic responses of the blood. In: *Casarett and Doull's Toxicology, the Basic Science of Poisons*. 3rd ed., (Klaassen C.D., Amdur M.O., Doull J.), MacMillan, New York, 223-244.
- Song R., Mahidhara R.S., Liu F., Ning W., Otterbein L.E., Choi A.M.K. (2002): Carbon monoxide inhibits human airway smooth muscle cell proliferation via mitogen-activated protein kinase pathway. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **27**: 603-610.
- Song X.G., She X.P., Zhang B. (2008): Carbon monoxide-induced stomatal closure in *Vicia faba* is dependent on nitric oxide synthesis. *Physiologia plantarum* **132**: 514-525.
- Stevens B. a Small R.D. (1976): The photoperoxidation of unsaturated organic molecules-XV. $O_2^1\Delta_g$ quenching by bilirubin and biliverdin. *Photochemistry and Photobiology* **23**: 33-36.
- Stevens C.F. a Wang Y. (1993): Reversal of long term potentiation by inhibitors of heme oxygenase. *Nature* **364**: 147-149.
- Stewart R.D., Fisher T.N., Hosko M.J., Peterson J.E., Baretta E.D., Dodd H.C. (1972): Carboxyhemoglobin elevation after exposure to dichloromethane. *Science* **176**: 295-296.
- Stocker R., Yamamoto Y., Mc Donagh A.F., Glazer A.N., Ames B.N. (1987): Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* **235**: 1043-1046.
- Stocker R. (1990): Induction of haem oxygenase as a defence against oxidative stress. *Free Radical Research Communications* **9**: 101-112.
- Stone J.R. a Marletta M.A. (1994): Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* **33**: 5636-5640.
- Sun B.W. a Chen X. (2008): Carbon monoxide releasing molecule: New insights for anticoagulation strategy in sepsis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**: 365-369.
- Synder X.H. a Baranano D.E. (2001): Heme oxygenase: a font of multiple messengers. *Neuropsychopharmacology* **25**: 294-298.
- Taille C., El-Benna J., Iannone S., Boczkowski J., Motterlini R. (2005): Mitochondrial respiratory chain and NAD(P)H oxidase are targets for the antiproliferative effect of carbon monoxide in human airway smooth muscle. *Journal of Biological Chemistry* **27**: 25350-25360.
- Tenhunen R., Marver H., Schmid R. (1968): The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *PNAS* **61**: 748-755.
- Tenhunen R., Marver H., Schmid R. (1969): Microsomal heme oxygenase, characterization of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **244**: 6388-6394.

- Tenhunen R., Marver H., Schmid R. (1970): The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **75**: 410–421.
- Terry M.J., Linley P.J., Kohchi T. (2002): Making light of it: the role of plant haem oxygenases in phytochrome chromophore synthesis. *Biochemical Society Transactions* **30**: 604–609.
- Thom S.R., Fischer D., Xu Y.A., Notarfrancesco K., Ishiropoulos H. (2000): Adaptive responses and apoptosis in endothelial cells exposed to carbon monoxide. *PNAS* **97**: 1305–1310.
- Tomaro M.L., Frydman J., Frydman R.B. (1991): Heme oxygenase induction by CoCl_2 , Co-protoporphyrin IX, phenylhydrazine, and diamide: evidence for oxidative stress involvement. *Arch Biochemical and Biophysical Research* **286**: 610–617.
- Troxler R.F., Brown A.S., Brown S.B. (1979): Bile pigment synthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry* **254**: 3411–3418.
- Tsuburai T., Suzuki M., Nagashima Y., Suzuki S., Inoue S., Hasiba T., Ueda A., Ikehara K., Matsuse T., Ishigatsubo Y. (2002): Adenovirus-mediated transfer and overexpression of heme oxygenase 1 cDNA in lung prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis via a Fas-Fas ligand-independent pathway. *Human Gene Therapy* **13**: 1945–1960.
- Verma A., Hirsch D.J., Glatt C.E., Ronnett G.V., Snyder S.H. (1993): Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* **259**: 381–384.
- Verma K., Shekhawat G.S., Sharma A., Mehta S.K., Sharma V. (2008): Cadmium induced oxidative stress and changes in soluble and ionically bound cell wall peroxidase activities in seedling and 3–4 leaf stage plants of *Brassica juncea* (L.) Czern. *Plant Cell Reports* **27**: 1261–1269.
- Vile G.F., Basu-Modak S., Waltner C., Tyrrell R.M. (1994): Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *PNAS* **91**: 2607–2610.
- Vítek L., Sedláčková L., Branny P., Ruml T. (2003): Metabolismus bilirubinu a způsob eliminace jeho toxicity. *Chemické listy* **97**: 24–28.
- Von Berg R. (1999): Toxicology update. Carbon monoxide. *Journal of Applied Toxicology* **19**: 379–386.
- Vreman H.J., Wong R.J., Sanesi C.A., Dennery P.A., Stevenson D.K. (1998): Simultaneous production of carbon monoxide and thiobarbituric acid reactive substances in rat tissue preparations by an iron-ascorbate system. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **76**: 1057–1065.
- Vreman H.J., Wong R.J., Stevenson D.K. (2000): Carbon monoxide in breath, blood, and other tissues. In: *Carbon Monoxide Toxicity*, (Penney D.G.), CRC, Boca Raton, Florida, 19–60.
- Watts R.N., Ponka P., Richardson D.R. (2003): Effects of nitrogen monoxide and carbon monoxide on molecular and cellular iron metabolism: mirror-image effector molecules that target iron. *Biochemical Journal* **369**: 429–440.
- Weaver L.K. (1999): Carbon monoxide poisoning. *Critical Care Clinics* **15**: 297–317.
- Wendehenne D., Durner J., Klessig D.F. (2004): Nitric oxide: a new player in plant signaling and defence responses. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 449–455.
- Wikiskripta:
[http://www.wikiskripta.eu/index.php/Hemoglobin_a_jeho_deriv%C3%A1ty_\(LF_MU\)](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Hemoglobin_a_jeho_deriv%C3%A1ty_(LF_MU))
 (9.3.2016)
- Wu L. a Wang R. (2005): Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions and pharmacological applications. *Pharmacological Reviews* **57**: 585–630.
- Wyble, C. W., Desai, T. R., Clark, E. T., Hynes, K. L., Gewertz, B. L. (1996): Physiologic concentrations of TNF α and IL-1 β released from reperfused human intestine upregulate E-Selectin and ICAM-1. *Journal of Surgical Research* **63**, 333–338.
- Xu J., Xuan W., Huang B.-K., Zhou Y.-H., Ling T.-F., Xu S., Shen W.-B. (2006a): Carbon monoxide-induced adventitious rooting of hypocotyls cutting from mung bean seedling. *Chinese Science Bulletin* **51**: 668–674.

- Xu S., Sa Z.-S., Cao Z.-Y., Xuan W., Huang B.-K., Ling T.-F., Hu Q.-Y., Shen W.-B. (2006b): Carbon monoxide alleviates wheat seed germination inhibition and counteracts lipid peroxidation mediated by salinity. *Journal of Integrative Plant Biology* **48**: 1168-1176.
- Xuan W., Zhu F.-H., Xu S., Huang B.-K., Ling T.-F., Qi J.-Y., Ye M.-B., Shen W.-B. (2008a): The heme oxygenase/carbon monoxide system is involved in the auxin-induced cucumber adventitious rooting process. *Plant Physiology* **148**: 881-893.
- Xuan W., Xu S., Yuan X.-X., Shen W.-B. (2008b): Carbon monoxide: A novel and pivotal signal molecule in plants?. *Plant Signaling & Behavior* **3**: 381-382.
- Yannarelli G., Noriega G.O., Battle A., Tomaro M.L. (2006): Heme oxygenase up-regulation in ultraviolet_B irradiated soybean plants involves reactive oxygen species. *Planta* **224**: 1154-1162.
- Yasuda H., Yamaya M., Yanai M., Ohnishi T., Sasaki H. (2002): Increased blood carboxyhaemoglobin concentrations in inflammatory pulmonary diseases. *Thorax* **57**: 779-783.
- Yu C.Z., Benkai H., Ya W.Q., Wei X., Fang L.T., Bo Z., Xi C., Li N., WenBiao S. (2007): Involvement of carbon monoxide produced by heme oxygenase in ABA induced stomatal closure in *Vicia faba* and its proposed signal transduction pathway. *Chinese Science Bulletin* **52**: 2365-2373.
- Zhuo M., Small S.A., Kandel E.R., Hawkins R.D. (1993): Nitric oxide and carbon monoxide produce activity dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. *Science* **260**: 1946-1950.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- AA/BIS - akrylamid-N,N'-methylenbisakrylamid
- APS - persíran amonný
- BSA - hovězí sérový albumin
- cGMP - cyklický guanosinmonofosfát
- cPTIO - 2,4-karboxyfenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazol-1-oxyl-3-oxid
- DMSO - dimethylsulfoxid
- DTT - dithiotreitol
- EDTA - kyselina ethylendiaminotetraoctová
- GC - guanylátcyklasa
- GTP - guanosin trifosfát
- IAA - kyselina indol-3-octová
- MAPK - mitogenem aktivovaná proteinkinasa
- NADPH - redukovaný nikotinamidadeninukleotid fosfát
- ROS - Volné kyslíkové radikály
- SDS - dodecylsíran sodný
- SDS-PAGE - elektroforéza v polyakrilamidovém gelu za přídavku dodecylsíranu sodného
- sGC - rozpustná guanylátcyklasa
- SNP - nitroprussid sodný
- TEMED - N, N, N', N'- tetramethylethylendiamin
- ZnPPIX - protoporfyrin zinku