

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra Experimentální biologie



**Tvorba malondialdehydu v důsledku mechanického
poškození listů**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Simona Gáborová

Studijní program: B0511A030017 Experimentální biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: Mgr. Marek Rác, Ph.D.

Rok: 2024

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením a dohledem Mgr. Marka Ráce, Ph.D. a veškeré použité literatury jsou uvedeny v závěru práce.

V Olomouce dne: 22. 5. 2024

Simona Gáborová
.....

Poděkování

Obrovské dík patří vedoucímu mé bakalářské práce, Mgr. Marku Rácovi, Ph.D., za odborné a velice poučné vedení práce, za rady a za pomoc při psaní bakalářské práce spolu s poskytnutím literatury, a hlavně za jeho přátelský a profesionální přístup.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Simona Gáborová

Název práce: Tvorba malondialdehydu v důsledku mechanického poškození listů

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra biofyziky

Vedoucí práce: Mgr. Marek Rác, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2024

Abstrakt: Oxidativní stres je kaskáda reakcí probíhající v rostlinách za vzniku reaktivních forem kyslíku, které jsou pro rostlinu nebezpečné. Tyto formy zároveň vzbuzují reakci lipidové peroxidace, což je řetězová reakce, během které se tvoří mnoho meziproductů, jeden z těchto produktů je malondialdehyd. Tato bakalářská práce se zabývá stanovením množství vznikajícího malondialdehydu během lipidové peroxidace v reakci na oxidativní poškození pomocí HPLC analýzy. Zároveň si pokládá otázku, zda-li je malondialdehyd vhodný marker pro budoucí experiment. Oxidativní poškození bylo vyvoláno způsobením mechanickým poškozením. Bylo prokázáno, že malondialdehyd nevykazuje požadované vlastnosti jako marker lipidové peroxidace při mechanickém poškození rostlin.

Klíčová slova: Lipidová peroxidace, reaktivní formy kyslíku, oxidativní poškození, malondialdehyd, HPLC

Počet stran: 53

Počet příloh: 0

Jazyk: český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Simona Gáborová

Title of thesis: The formation of malondialdehyde in leaves due to mechanical injury

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of biophysics

Supervisor: Mgr. Marek Rac, Ph.D.

The year of defence: 2024

Abstract: Oxidative stress is a cascade of reactions taking place in plants that can produce reactive oxygen species that are dangerous for the plant. At the same time, these products induce a lipid peroxidation reaction, which is a chain reaction during which many intermediate products are formed, malondialdehyde being one of these products. This bachelor's thesis deals with the determination of the amount of malondialdehyde formed during lipid peroxidation as a reaction to oxidative damage using HPLC analysis. At the same time, he questions whether malondialdehyde is a suitable marker for a future experiment. Oxidative damage was induced by mechanical damage. It has been shown that malondialdehyde does not exhibit the desired properties as a marker for lipid peroxidation during mechanical damage of plants.

Key words: Lipid peroxidation, reactive oxygen species, oxidative stress, malondialdehyde, HPLC

Number of pages: 53

Number of attachments: 0

Language: czech

Seznam zkratek

ROS	reaktivní formy kyslíku
$^1\text{O}_2$	singletní kyslík
H_2O_2	peroxid vodíku
$\text{O}_2\text{H}\cdot$	hydroperoxylový radikál
$\text{O}_2^{\cdot-}$	superoxidový aniontový radikál
$\text{RO}\cdot$	alkoxylový radikál
$\text{OH}\cdot$	hydroxylový radikál
OH	hydroxid
$\text{L}\cdot$	alkylový radikál
$\text{LOO}\cdot$	peroxylový radikál
LOOH	lipidový hydroperoxid
4-HNE	4-hydroxynonenal
MDA	malondialdehyd
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
WT	wild type
Ilox 2	mutant
Fe^{2+}	železnatý kation
Fe^{3+}	železitý kation
SOD	superoxid dismutáza
CAT	kataláza
ASC	askorbát
GHS	glutathion
$\text{CH}_2(\text{CHO})_2$	malondialdehyd

PUFA-AA	nenasycená dvojná masná kyselina
PPG ₂	prostaglandin
PHG ₂	adhezní kináza
MAPK	mitogen aktivované proteinové kinázy
DAMP	danger associated molecular patterns
eDNA	environmentální DNA
HOTE	9-hydroxyoktadekadienové kyseliny

Obsah

2. TEORETICKÁ ČÁST	11
2. 1. Co to je stres?.....	11
2. 2 Metabolické procesy při stresu	12
3. Mechanické poškození	13
4. Oxidativní stres a vznikající molekuly	16
4. 1 Reaktivní formy kyslíku	17
4. 1. 1 Fentonova reakce.....	20
4. 1. 2 Haber-Weissova reakce.....	21
4. 2 Antioxidační systémy.....	23
4. 2. 1 Superoxid dismutáza.....	23
4. 2. 2 Katalázy	23
4. 2. 3 Kyselina askorbová neboli askorbát.....	24
4. 2. 4 Glutathion	24
4. 2. 5 Fenolické látky.....	25
5 Lipidy a lipidová peroxidace	27
5. 1. 1 Produkty lipidové peroxidace: Malondialdehyd	30
5. 1. 2 Produkty peroxidace: 4-hydroxynonenal.....	33
CÍL PRÁCE	34
5 METODY A MATERIÁLY	35
5. 1 Přístrojové vybavení	35
5.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> – Wild type plus mutant	35
5. 3 Příprava vzorků izolací malondialdehydu na HPLC a jeho měření	36
5. 4 Příprava vzorků na pozorování konfokálním mikroskopem	36
5. 5 Konfokální mikroskop	36
6 VÝSLEDKY.....	37
6.1 Tvorba ROS při mechanickém poškození.....	37
6. 2 Studium vlivu stáří rostliny na tvorbu MDA.....	38
6. 3 Rozdíly vzniku MDA mezi WT a ILox 2 mutanty.....	39
6.4 Rozdíly mezi tvorbou MDA u listů na rostlině a z rostliny odstraněných.....	40
6. 5 Tvorba MDA v závislosti na času od poškození.....	41
DISKUZE.....	46
ZÁVĚR.....	49
SEZNAM LITERATURY.....	50

1. ÚVOD

Poškození je denní součástí života rostlin. Jde o jakékoliv zranění vyvolané ději jako je zašlápnutí rostliny člověkem či jiným zvířetem, pokousání listů rostliny herbivorem, napadení patogenem či vlivem nevhodného prostředí. Toto poškození vyvolává odchýlení od očekávaných fyziologických podmínek života rostlin. Pro toto odchýlení si rostliny vyvinuly odpověď, kterou obecně nazýváme stres. Stres je kaskáda reakcí sloužící jako obranný mechanismus k zajištění návratu zpět do normálního stavu. Mezi pár druhů poškození řadíme například mechanické či oxidativní poškození. Oxidativní stres je soubor poškození způsobených reaktivními formami kyslíku (ROS) a může vést až ke smrti buňky/části pletiv, kde se vyskytl. Mechanické poškození je zobecnění termínu zahrnující poškození rostlin způsobené počasím nebo živočichy/stroji, což ponechává rostlinu otevřenou k napadení patogenem.

Reaktivní formy kyslíku jsou molekuly obsahující atom kyslíku a jsou zodpovědné za oxidativní poškození buněk. ROS se dělí na radikály a neradikály. Mezi radikály patří: hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$), superoxidový aniontový radikál ($\text{O}_2^{\cdot-}$) a další. Nejznámější neradikálové ROS jsou peroxid vodíku (H_2O_2) a singletní kyslík ($^1\text{O}_2$). V buňce se ROS podílí na lipidové peroxidaci, což je kaskáda reakcí vedoucí ke trvalému poškození membrány a může vést až ke smrti buňky. Během lipidové peroxidace dochází k oxidaci nenasycených mastných kyselin v membránách – a jejich rozkladu na meziprodukty.

Rostliny mohou odbourávat ROS dvěma hlavními cestami, a to buď enzymaticky nebo neenzymaticky. Pod enzymatickou dráhu spadají enzymy jako superoxid dismutáza (SOD), kataláza (CAT), askorbát peroxidáza (APX), glutathion reduktáza (GR), a mnoha dalších. Mezi neenzymatickou cestu patří glutathion, fenolické látky, alkaloidy a další. Tyto cesty zároveň slouží jako kontrola úrovně ROS v rostlině a v případných navýšených hodnotách ROS se rostlina dokáže s těmito nebezpečnými molekulami zbavit stejnými cestami při jejich vzniku.

Tyto antioxidanty vyhledávají ROS v metabolismu a inhibují jejich funkce a případné reakce.

Jedním z produktů lipidové peroxidace je malondialdehyd (MDA), což je hojně studovaná molekula využívána jako marker oxidativního poškození. Je to mutagenní molekula, která způsobuje poškození DNA/RNA a proteinů.

V této bakalářské práci byl studován malondialdehyd, jeho vznik při mechanickém poškození a korelace mezi koncentrací a časovou závislostí od poškození. Cílem této práce bylo položit a následně odpovědět na otázku, zdali je malondialdehyd vhodný marker lipidové peroxidace během mechanického poškození.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2. 1. Co to je stres?

Rostliny jsou sedimentární organismy, které jsou plně závislé na svém prostředí, aby obdržely všechny potřebné živiny k životu. Buď rostliny tyto živiny přímo přijímají v původní formě anebo jsou schopny si je přeměnit. Ať už se jedná o vodu, různé minerály anebo světlo, rostliny nedokáží přežít v nevhodném prostředí s nedostatkem živin. V přírodě pravidelně dochází ke změnám podmínek a rostlina často postrádá některou živinu. Proto došlo k tvorbě ochranných mechanismů u rostlin. Rostliny nečelí jenom nedostatku nutných živin a molekul k jejich životu, čelí zároveň i vlivu rostlin, nejobvykleji ve formě parazitů, a i vlivu živočichů. Ať už jde o různé býložravce nebo člověka anebo počasí, poškození a z toho plynoucí stres je normální součástí života rostlin. Takové odchylky od očekávaných fyziologických podmínek rostlin vyvolávají u rostlin metabolické reakce. Tyto reakce a následná celková odpověď u rostlin se nazývá stres rostlin. Podmínky vyvolávající stres jsou nazývány stresory. A tyto stresory můžeme obecně označovat jako biotické a abiotické.

Biotické stresory, jak bylo naznačeno, jsou ty stresory biologického původu jako jsou býložravci, různí parazité, ale i jiné rostliny. Stresory abiotického původu jsou naopak ty, které vznikly mechanickými nebo chemickými vlivy. Od poškození rostliny zašlápnutím člověkem či jiným živým tvorem, po nedostatek nutných živin a minerálů nebo naopak nadbytek některých látek. Zde můžeme zařadit i vlivy počasí jako sucho, mráz či záplavy.

„Mnoho autorů využívá termín „stres rostlin“ ve velmi úzkém smyslu, protože si představujeme definici jako ustanovení jednoho konceptu. Ve skutečnosti je rostlinný stres mnohem složitější než si myslíme. Existuje veliké množství stresorů s různými modely funkce a původu, které kromě velice specifických efektů, podobné anebo stejné odpovědi rostliny.“ (Lichtenthaler H. K., 1998).

2. 2 Metabolické procesy při stresu

Odpověď na stres je složitá reakce o několik kroků od rozpoznání stresoru po jeho eliminaci a následné regeneraci rostliny. Odpověď můžeme rozdělit na počáteční fázi, kdy v rostlině dochází ke zpomalení metabolických procesů jako je regenerace rostlinných pletiv, fotosyntéza a mnoha další procesů vyžadující energii. Po zpomalení metabolismu se rostlina pomalu adaptuje a zahajuje samotnou reakci na stresor. Tento typ reakce je závislý na typu stresoru, který reakci vyvolal. Počátečním krokem adaptační fáze je tedy rozpoznání stresoru, který na rostlinu působí. V rostlině začíná tvorba reaktantů, oxidantů a ostatních pomocných molekul, které plní řadu funkcí. Od produkce molekul, které předávají signál o poškození rostliny po molekuly, které se mají zdroje stresu zbavit. Jednou z těchto molekul jsou takzvané antioxidanty, jejichž hlavním cílem je zbavit se pro rostlinu toxických a nebezpečných látek. Za předpokladu, že rostlina se dokáže vypořádat se stresem, rostlina obnovuje svoji regenerační schopnost a obnovují se původní funkce. „Měli bychom si pamatovat, že vystavení stresu není vzácné, právě naopak. Rostliny se se stresem vyrovnávají denně kvůli širokému spektru stresorů. Tedy, stres a různé zátěže jsou denní události v životě rostliny. A právě kvůli těmto faktorům musíme předpokládat, že rostlina se se stresem naučila žít.“ (Lichtenthaler H. K., 1998).

3. Mechanické poškození

Mechanické poškození je dalším z mnoha faktorů ovlivňující, případně až ohrožující rostliny. Rostliny si tedy musely taktéž vyvinout mechanismus odpovědi na tento typ stresu. Pod tímto pojmem si můžeme představit jakékoliv zranění, které bylo způsobeno prýtu rostliny. Přesná definice mechanického poškození se během několik desetiletí studia rostlin několikrát vyvinula. V minulém století existovala představa, že mechanické poškození je škoda způsobena semenům rostlin buď během růstu nebo při zacházení s nimi, v dnešní době je už všeobecně uznávána rozšířenější definice. Do této nové definice již řadíme poškození vyvolané ztrátou integrity orgánu rostliny. Pod tímto si můžeme představit napadení rostliny patogenem, hmyzem či herbivorem. Zároveň zde i řadíme škodu způsobenou živly či nedostatkem živin. Při

vzniku takového poškození se rostlina snaží integritu znova obnovit, a to z toho důvodu, že takové rány ji ponechávají náchylnou možným infekcím či dalším ranám. Rostlina se brání dvěma hlavními cestami: fyzickou a chemickou. Fyzická cesta zahrnuje tvorbu metabolitů, které slouží jako ochranná vrstva v takovýchto případech poškození. Pod těmito metabolity si můžeme představit vosky či chemické molekuly chránící před infekcí jako jsou fytoalexiny. Rostlinné vosky tvoří tenkou vrstvu na povrchu rostlin a chrání před dalším poškození anebo infekcemi/patogeny. Hlavní složky rostlinných vosků jsou tvořeny procesem kondenzace a následným prodlužováním. Při tomto procesu primer této reakce dosedá na dlouhé acylové řetězce a přidává reakční skupiny od acetyl-CoA s jednotkami od malonyl-CoA. Vznikající řetězce dosahují až třiceti uhlíků. Takto vznikající vosky jsou tvořeny z mastných kyselin, aldehydů, alkanů, alkoholů či ketonů.

Chemická cesta zahrnuje reakci na mechanické poškození přes mnohé signální dráhy. Mohou reagovat přes různé molekuly jako hormony nebo ionty, kdy hlavními signálními ionty jsou Ca^{2+} a H^+ (Savatin D. V., *et al.*, 2014; Nurnberger T., *et al.*, 2004; Mithofer A., *et al.*, 2005). Mezi signální hormony můžeme zařadit kyselinu abscisovou nebo jasmínovou či rostlinné estrogyeny. Dále mohou rostliny reagovat i přes jiné cesty, a to buď elektrickými signály anebo mitogen aktivované proteinové kinázami, tak zvané MAPK. MAPK spouští kaskádu reakcí několika dalších MAPK, které se postupně aktivují přes receptory a elektrické signály vzbuzují vzruch v rostlině. U rostlin je elektrická signalizace poškození ještě stále zkoumána (Savatin D. V., *et al.*, 2014). Známé způsoby signalizace přes elektrické signály jsou ionty, protonové pumpy, NADPH

oxidázy či exprese specifických genů. Mezi takové geny řadíme geny kódující glutamátové receptory. „K identifikaci dalších genů, které jsou základem elektrických aktivit v rostlinách, je zapotřebí značného pokroku ve výzkumu. Ten dosud nebyl přímočarý. Některé geny zapojené do dálkové elektrické signalizace mohou být nezbytné pro funkci floému nebo xylému: jejich role může být třeba studovat u hypomorfních mutantů. Molekulární mechanismy, které převádějí změny membránového potenciálu reakce na ránu do modulace koncentrací hormonů, nejsou známy a tyto chybějící články je třeba identifikovat.“ (Farmer E. E. *et al.*, 2020).

Chemické odpovědi rostliny můžeme dále rozdělit dle toho, jestli jsou tyto signály v blízkém prostředí poškození nebo se nesou dále od místa poškození.

Za prvotní rozpoznání poškození slouží buď již zmiňované elektrické signály (Savatin D. V., *et al.*, 2014) anebo molekuly nazývané DAMPs, danger associated molecular patterns. Tyto různorodé molekuly obstarávají důležitou roli nejen v signalizaci, ale taktéž v následných opravách během této reakce. Pod tímto pojmem si můžeme představit molekuly jako ATP, MAPK, peptidy, eDNA, NAD⁺ a mnoho dalších. DAMP působí tak, že dosednou na příhodné receptory a tím, tak způsobí kaskádu reakcí, která vede k signalizaci poškození a rostlina tak může vhodně odpovědět syntézou nebo přemístěním vhodných molekul na místě vzniklého poškození.

Obě tyto cesty, jak fyzická či chemická, způsobují aktivaci genové exprese. Tuto genovou expresi, a náležící geny, studoval Reymond a jeho tým ve snaze se lépe porozumět genové expresi poškození, jaké geny se zapojují a jestli je rozdíl exprese mezi mechanickým poškozením a tím vytvořeného hmyzem na rostlině *A. thaliana*. Jenom pár genů, které pozorovali byly touch geny, mitogen aktivované geny, LOX, COI a AOS. Jejich první experiment spočíval v pozorování genové exprese genů v různých časových úsecích, kdy napozorovali, že rozdíly v časové expresi studovaných genů byly minimální. Došli k závěru, že expresované geny musí patřit do stejné rodiny (Reymond *et al.*, 2000). Reymond *et al.* zároveň poznamenali, že průměr mezi AOS a LOX naznačoval aktivaci genu JR3 a syntézu jeho produktů jako kyselina jasmonová. K prověření této myšlenky využili mutantní postrádající gen JR3 a znova provedli časové měření po provedení poškození. Během měření zjistili patrný rozdíl v genové expresi mezi mutanty a WT a prohlásili rozdělení dvou základních tříd genů odpovídající na mechanické poškození. A

to skupina COI1 závislých genů a druhá skupina genů závislých na signalizaci kyseliny jasmonové.

4. Oxidativní stres a vznikající molekuly

Oxidativní stres je jeden z mnoha stresů, kterým si rostlina prochází. Z chemického pohledu jde o nerovnováhu mezi antioxidanty a ROS v metabolismu rostliny. Je zároveň definovaný tvorbou speciálních molekul na odpověď. Dvě z mnoha z těchto odpovídajících molekul jsou již zmíněné antioxidanty a ROS.

Radikály jsou molekuly, které obsahují aspoň jeden nespárovaný valenční elektron ve svém obale. Tyto valenční elektrony mohou reagovat s molekulou, se kterou došly do kontaktu. Z tohoto důvodu velice rychle reagují s těmi molekulami za vzniku nových látek. Radikály jsou proto velice reaktivní molekuly. Samotné radikály vznikají rozkladem větších molekul za rozpadu existujících kovalentních vazeb. Vznikající molekuly z tohoto rozpadu mají volné valenční elektrony a velice jednoduše se z nich stávají radikály. Další metoda vzniku radikálů je redukce molekul s jedním elektronem ve valenční vrstvě za předpokladu, že se v blízkosti reakčního místa již nachází radikál.

Radikály ROS vznikají přes dvou typů reakcí, kdy jedna reakce je přenos elektronu mezi molekulou anebo reakcí, kde dochází k přenosu excitační reakce. ROS mohou způsobit poškození v buňce anebo mohou naopak pomoci. Jedna z nejznámějších reakcí ROS z pohledu oxidativního poškození a stresu je reakce lipidové peroxidace, dále v kapitole 4.

Antioxidanty jsou hlavní obranné molekuly v případě zvýšení koncentrace volných radikálů a následně i vznikající oxidaci. V buňce se vyskytují ve formě substrátu a působí tak, že zachycují volné radikály vznikající jako meziprodukty oxidačních řetězců a metabolismu, a tak zpomalují oxidační reakce. Dále působí jako redukční činidla. Antioxidanty jsou důležitou součástí rostlinného metabolismu a jsou všudypřítomné. V rostlině se vyskytují v mnoha formách, od enzymů jako jsou superoxido dismutázy či po volné chemické molekuly jako jsou ROS. Mají totiž i jiné funkce než čistě antioxidační.

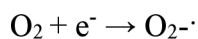
4. 1 Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku jsou vysoce toxické, nebezpečné a nevyhnutelné meziprodukty vznikající v rostlinách během různých oxidativních metabolických drah jako je buněčné dýchání, oxidativní vzplanutí, fotosyntéza a mnoha dalších drah. Jsou zároveň ale i tvořeny při oxidativním stresu rostlin, kdy jejich množství může překročit bezpečnou hranici a mohou způsobit poškození buňky a následně dané rostlině. ROS jsou molekuly vznikající v buňkách v místě vysokého výskytu kyslíku. Mezi základní kameny vzniku těchto molekul můžeme přiřadit vodu, kyslík a H_2O_2 (Choudhury F. K., *et al.*, 2016). Od těchto molekul se odráží kaskáda reakcí vedoucí ke vzniku dalších ROS. I přesto, že ROS jsou pro buňku nebezpečné, pak se ukázalo, že mají i jiné funkce (Choudhury F. K., *et al.*, 2016).

„ROS hrají klíčovou roli v rostlinné obraně proti patogenům. Během této metabolické odpovědi, ROS jsou produkovány rostlinnými buňky za pomoci urychlené enzymatické aktivity plazmaticky navázaných NADPH-oxidás, stěnou navázaných peroxidáz a amino oxidáz v apoplastu. Za ideálních podmínek může být tvořeno až μM H_2O_2 buď přímo nebo enzymatickou aktivitou...Na rozdíl od superoxidového aniontového radikálu, peroxid vodíků může vstoupit do buňky a aktivovat mnoho obran, jako je například apoptóza.“ (Apel K., Hirt H., 2004).

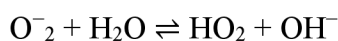
Pár z často zmiňovaných dráh vzniku ROS jsou například oxidativní vzplanutí a lipidová peroxidace a mnoho dalších dráh. Lipidová peroxidace je dále probrána v kapitole 5.

ROS jsou tvořeny různými mechanismy. Jedním z prvních je redukce vzdušného kyslíku což vede ke vzniku $O_2^{\cdot-}$;



Za správných podmínek takto tvořený radikál odevzdává získaný elektron druhé molekule $O_2^{\cdot-}$ a následně z toho radikálu, který odevzdal elektron, vzniká H_2O_2 . Superoxidové aniontové radikály jsou neustále produkovány během fotosyntézy a bývají první druh ROS, který vzniká během oxidativního stresu.

Hydroperoxylový radikál se v buňce vyskytuje ve stejném poměru s $O_2^{\cdot-}$ pokud vyskytující se pH je kyselé, pak probíhající formace a reakce vypadá nějak následovně:

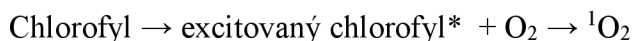


Hydroxylový radikál vzniká excitací OH iontů nebo vody, kdy OH odevzdávají elektron a pozůstává radikál.

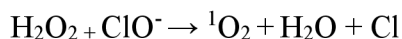
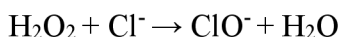


RO \cdot je formován zlomem vazby mezi dvěma uhlíky. H₂O₂ vzniká několika způsoby. Může to být prací enzymů či jako produkt elektronového transportu probíhajícího v mitochondriích a chloroplastech.

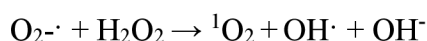
O₂ \cdot^- a ¹O₂ jsou jediné ROS nevznikající elektronovým transportem. Naopak vznikají během fotosyntézy. Vznik ¹O₂ nastává, když je přechod chlorofylu do tripletního stavu doprovázen přebytkem energie. Tento chlorofyl reaguje s volným kyslíkem za vzniku ¹O₂;



O₂ \cdot^- avšak nevzniká jenom přes excitovaný chlorofyl. Může vzniknout i přes reakci tvorby peroxidu vodíku za aktivity myeloperoxidázy:



Další způsob vzniku je přes Haber-Weissovou reakci za využití O₂ \cdot^- . Haber-Weissova reakce je dále probraná v kapitole 4. 1. 2;



Peroxid vodíku je nejdéle žijící ROS s největším poločasem eliminace a je tvořen v mitochondriích. „Peroxid vodíku hraje dvojí roli v rostlinné buňce. V nižších koncentracích funguje jako signální molekula zahrnutá v zahájení signalizace odpovědi na různé biotické a abiotické stresy. Naopak za vyšších koncentrací peroxid vodíků vede k apoptóze buňce. Dále se ukázalo, že peroxid vodíku je klíčovým regulátorem mnoha metabolických procesů jako jsou senescence, fotorespirace, fotosyntéza a buněčný cyklus (Gill S. S., Tuteja N., 2010).

Organely, kde se ROS nejčastěji nachází jsou ty, kde dochází k elektronovému transportu anebo fotosyntéze. Tyto organely jsou tedy chloroplasty, mitochondrie a

peroxisomy. Tyto metabolické dráhy, oxidativní a elektronové transporty, jsou velice účinné díky výskytu vzdušného kyslíku, který sice sám o sobě není reaktivní, ale velice dobře funguje jako akceptor elektronu, který může vést ke vzniku ROS. Mitochondrie nejsou jenom tvůrcem ROS, je zároveň i cílovou destinací těchto ROS. Předpokládá se, že tato tendence shromažďovat ROS pochází z toho, že mitochondrie dokáží manipulovat s buněčnou energií a díky této vlastnosti dokáží mitochondrie ROS degradovat a udržovat na stálé a bezpečné úrovni. Chloroplasty a peroxisomy jsou místa produkce $^1\text{O}_2$.

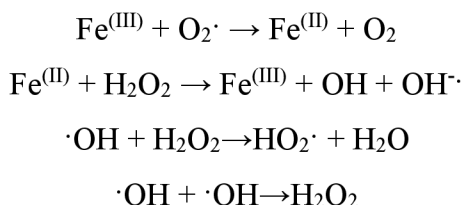
Společná vlastnost všech ROS je způsobení oxidativního poškození proteinů, lipidů, sacharidů a samotné DNA/RNA, což může vést k oxidativnímu poškození rostliny a následně až ke smrti buňky. ROS útočí hlavně na nenasycené mastné kyseliny s dvojnou vazbou mezi uhlíky. Toto vede k lipidové peroxidaci, která je více popsána v kapitole 5. Tohle má za následek rozpad napadané nenasycené mastné kyseliny s poškozením buněčných membrán. Zároveň musí být zmíněna i jejich schopnost působit jako signální molekula.

„Zatímco některé rostliny mají mechanismy, jak se zvýšenými úrovněmi ROS bojovat během abiotického stresu, v jiných případech to vypadá, že rostliny schválně generují ROS jako signální molekuly pro kontrolu mnoha metabolických dráh jako obrana proti patogenům, apoptóza a mnoha další.“ (Apel K., Hirt H., 2004). Přesná funkce ROS není známá na sto procent, i když máme vcelku jasnou představu ohledně jejich působení v rostlinné buňce, tak se dodnes provádí experimenty, jestli by ROS nemohli být použiti jako signální molekuly pro studium stresu.

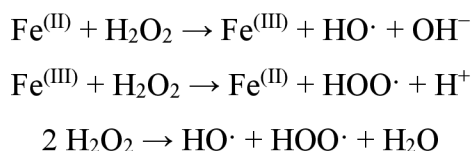
4. 1. 1 Fentonova reakce

Fentonova reakce je jedna z možných reakcí vzniků ROS. Obecně řečeno, je to redukce peroxidu vodíku v přítomnosti přechodných kovových iontů za vzniku $\text{OH}\cdot$ a OH iontu. Přechodné kovy jsou všudypřítomné v buňce, kde obstarávají transport elektronů mezi buněčnými organely/ostatními buňky. Jejich koncentrace je hlídána tak zvanými metalloenzymy, které případné volné kovové ionty zachycují. V případě, že tyto enzymy nejsou schopné zachytit kovový iont, pak může dojít k Fentově reakci.

Mechanismů Fentovy reakce je několik, ale v nejjednodušší a nezákladnější formě jde o reakci radikálů s přechodnými kovy. Jenom pár možných průběhů této reakce jsou následovné;



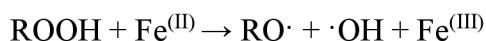
Jeden ze způsobů průběhu Fentovy reakce je ten, kdy H_2O_2 oxiduje ionty kovu, tyto kationty kovů jsou následně zpět redukovány pomocí další molekuly peroxidu vodíku za vzniku $\text{LOO}\cdot$ a volného protonu (Ayala A., *et al.*, 2014). Dvě molekuly peroxidu vodíku, které se zapojily do předchozích kroků reakce, poté tvoří $\text{OH}\cdot$ a $\text{LOO}\cdot$;



Hydroxylové radikály jsou vysoce reaktivní formy ROS, které vznikají právě během Fentonovy reakce. Buňku ohrožují svojí reaktivitou a tendencí interagovat s DNA, RNA a lipidy. V případě nukleových kyselin, ROS způsobují zlom ve fosfo-cukrátové páteři tím, že způsobují rozklad vazeb. ROS podobně rozkládají vazby i v lipidech, hlavně těch nenasyčených.

Další možné průběhy Fentovy reakce jsou s ligandy, kde reaguje volný přechodný kov s peroxidem vodíku za vzniku oxidovaného stavu kovu s pořádkem navázaným ligandem spolu s $\text{OH}\cdot$ a volným OH , která ihned reaguje.

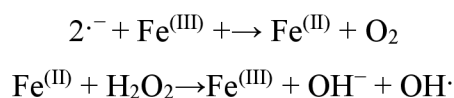
V lipidovém prostředí dochází u Fentově reakce s reakcí kovů s lipidovými peroxidy, kde je tvořen RO· s hydroxylovou skupinou a kov v oxidovaném stavu;



4. 1. 2 Haber-Weissova reakce

Haber-Weissova reakce je reakce spojená s Fentovou reakcí, kdy obě dvě probíhají v přítomnosti přechodných kovových iontů. Tam, kde Fentonova reakce vyobrazuje reakce přechodných kovových iontů s peroxidem vodíku, tak Haber-Weissova reakce popisuje reakci $\text{O}_2^{\cdot-}$ s H_2O_2 . První zmínky o Haber-Weissovy reakce pochází z roku 1934, kdy dva němečtí vědci – Fritz Haber a Joseph Joshua Weiss – popsali vznikající $\text{OH}\cdot$ po reakci peroxidu vodíku s $\text{O}_2^{\cdot-}$.

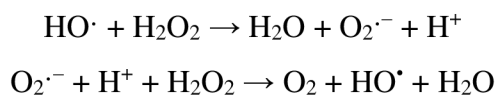
První krok Haber-Weissovy reakce je reakce $\text{O}_2^{\cdot-}$ s přechodným kovovým iontem, kdy je kovový iont redukován na stabilní stav a ze $\text{O}_2^{\cdot-}$ se stává stabilní molekula kyslíku (Ayala A., *et al.*, 2014)..



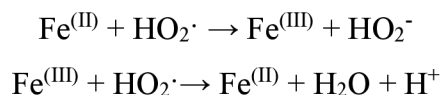
Následuje samotná Fentova reakce;



V druhém kroku této kaskády vznikající kovový iont reaguje s přítomným peroxidem vodíku za oxidace kovového iontu, který se navrácuje do původního stavu před zahájením Haber-Weissové reakce. Zároveň vzniká $\text{OH}\cdot$ a volný OH^- . Hydroxylový radikál je slabší kyselina, která může ztratit svůj proton za vzniku $\text{O}_2^{\cdot-}$ a uvolnění vodíku;



Samotná reakce je ukončena reakcí železitého iontu s $\text{OH}\cdot$;



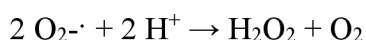
V případě vhodných podmínek, jako je dostatek kovových iontů a substrátů, pak Haber-Weissova reakce – společně s Fentovou reakcí – mohou probíhat tak dlouho, dokud nejsou volné substráty využity. Jelikož konečným produktem reakce jsou ROS, které mohou být velice nebezpečné pro buňku v případě vyšších koncentrací, je nutné tuto reakci kompletně zastaven či omezit její průběh na velice malé množství. Buňka kontroluje průběh Haber-Weissovy reakce stejně jako průběh samotné Fentovy reakce, a to přes metalloenzymy, jak bylo naznačeno v kapitole 3. 1. 1.

4. 2 Antioxidační systémy

4. 2. 1 Superoxid dismutáza

Superoxid dismutázy, SOD, jsou rodina metalloenzymů, které katalyzují reakci přeměny $O_2^{\cdot-}$ a přeměňují je na H_2O_2 (Gill S., *et al.*, 2010). H_2O_2 je pro buňku nebezpečný ve větším množství, a proto SOD často spolupracují v kombinaci s jinými enzymy jako katalázy nebo peroxidázy (Stephenie S. *et al.*, 2020).

Při další reakci $O_2^{\cdot-}$ je jeden O_2 oxidován zpět na obyčejnou molekulu kyslíku a druhý O_2 je redukován na H_2O_2 . Tento H_2O_2 je přemístěn do peroxizomu, kde se ho buňka zbavuje (Gill S., *et al.*, 2010).

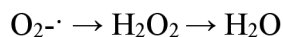


SOD jsou považovány za jednu z nejlepších obran rostlin proti ROS z několika důvodů. První důvod je jejich schopnost rychlé reakce, kdy patří za jednu z prvních aktivních obranných látek ve stresové reakci (Gill S., *et al.*, 2010).

Další důvod, proč jsou SOD tak účinný obranný mechanismus je ten, že se vyskytují nejen ve třech známých formách, dělené podle typu kofaktoru, ale i ten fakt, že současně se vyskytují v těch buněčných organelách, kde je největší pravděpodobnost výskytu ROS a oxidativního stresu jako jsou cytoplazma, prostor mitochondrií a extracelulární prostor (Stephenie S. *et al.*, 2020). Jsou tedy všudypřítomné a v případě stresu mohou ihned reagovat.

4. 2. 2 Katalázy

Katalázy, CAT, jsou enzymy nacházející se v peroxizomech rostlinných buněk, kde katalyzují degradaci H_2O_2 na vodu a kyslík. $O_2^{\cdot-}$ je za SOD přeměněn na H_2O_2 , který je následně odchycen a v peroxizomě degradován na vodu a kyslík (Gill S., *et al.*, 2010).;



Peroxid vodíku je běžný meziprodukt mnoha metabolických drah. Peroxizomy jsou orgány, kde probíhá fotorespirace a fixace dusíku (Gill S., *et al.*, 2010). Zároveň zde probíhají i jiné metabolické dráhy, kde H_2O_2 je meziprodukt, a proto je nutné se s ním spolehlivě vypořádat a případně nutnosti i rychle eliminovat.

4. 2. 3 Kyselina askorbová neboli askorbát

Kyselina askorbová je multifunkční antioxidant nacházející se v největším zastoupení v chloroplastech, dále v buněčné membráně a jiných organelách buňky. Zároveň působí jako kofaktor různých enzymů. Hraje roli v reakci na oxidativní stres a současně taktéž ovlivňuje růstový cyklus a reguluje fotosyntézu (Gill S., *et al.*, 2010).

Ve své molekule obsahuje dvě hydroxylové skupiny. Za ideálních podmínek – což znamená v redukované formě – se nejčastěji vyskytuje ve formě AscH⁻, která nejčastěji funguje jako elektron donorový antioxidant tvořící stabilní askorbový radikál, kterého je rostlina se schopna bezpečně zbavit. Kyselina askorbová degraduje OH[·], O₂^{·-} a ¹O₂ (Gill S., *et al.*, 2010). Její hlavní funkce v obranné reakci náleží v obraně membrán před oxidací. Buněčné membrány chrání během fotosyntézy, kdy reaguje s askorbát peroxidázou k regulaci a případně redukci oxidačního stavu elektronových transportéru (Smirnov N., *et al.*, 2000). Tímto redukuje excitační stavy a brání tvorbě O₂^{·-}.

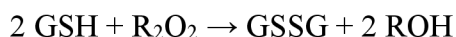
Askorbát je jedna z dalších forem kyseliny askorbové nacházející se ve vyšších rostlinách a řasách, pracujících ve dvou stupňových reakcí. Využívá H₂O₂ nacházejícího se ve vodních metabolických drahách rostlin. Taktéž zároveň využívá koenzymu A jako substrátu pro cyklus koenzymu A/glutathionu, kdy koenzym A působí jako elektronový donor během fotosyntézy (Noctor G., *et al.*, 1998). Vyskytuje se ve stromatu chloroplastů a buněčném cytosolu. Jeho afinita k H₂O₂ je ještě vyšší než u kataláz.

Askorbát je zapojen do reakcí všech druhů stresů, ale je nejvíce pozorovaný u sucha a převodnění rostliny. „U rostlin se askorbát dokáže akumulovat do koncentrací do hodnot mM u obou fotosyntetizujících a nesyntetizujících tkání. Takto přesahuje koncentraci ostatních antioxidantů. Listy takto často obsahují více askorbátu než chlorofylu, když askorbát zastupuje až 10 % všech vyskytujících se karbohydrátů... Je jasné, že askorbát je hlavní antioxidant reagující přímo s hydroxylovými radikály, superoxidy a singletním kyslíkem.“ (Foyer, G.; 1998).

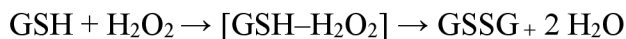
4. 2. 4 Glutathion

Glutathion, GSH, je hlavní tripeptidický antioxidant thiolů. Nachází se v cytosolu a chloroplastech, kde bývá současně i tvořen, a v jádře a mitochondrii, do kterých je transportován. Hlavní funkce GSH je působit jako kofaktor dalších enzymů a zajištění jejich funkce (Gill S., *et al.*, 2010). Reakcí, do kterých takto vstupuje, je široká řada. Jen

mezi pár vybraných patří glutathion oxidáza, glutathion peroxidáza, glutathion transferáza.

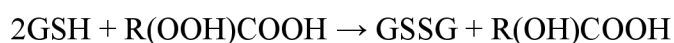


GSH detoxikuje H_2O_2 a lipidový peroxid. Dále přímo reaguje s OH^\cdot a $^1\text{O}_2$.



Současně ovlivňuje a současně i zvyšuje hladinu kyseliny askorbové a vitamínu E. Bylo pozorováno, že GSH oddaluje apoptózu buněk a jeho nízké hladiny vedou k zastavení proliferaci buněk.

Glutathion reductáza je důležitý enzym kvůli jeho katalyzaci reakci převodu glutathion disulfid na glutathion za využití FAD^+ a NADPH jako donor vodíku (Gill S., *et al.*, 2010). Byla nalezen v obou prokaryotických a eukaryotických buněk. Působí jako dodavatel redukované formy glutathionu. Pouze v jeho redukované formě působí jako antioxidant.



4. 2. 5 Fenolické látky

Fenolické molekuly jsou velice důležité metabolické molekuly pro rostlinu, které obstarávají správnou funkci metabolických procesů jako je buněčné dělení, fotosyntéza, regulace hormonů a enzymů a mnohá další. Z chemického pohledu se jedná o molekuly obsahující aromatický kruh – nejčastěji benzen – s hydroxylovou skupinou.

Pokud se rostlina vyskytuje ve stresové situaci, pak začíná zvyšovat produkci fenolických látek. Během stresu fenoly přebírají funkci antioxidantů. Rostlina produkuje fenolické látky přes metabolizaci fosfát pentósy a kyseliny šikimikové. „Nedávno, fenolické látky byly označeny jako mocné antioxidanty *in vitro* a prokázaly se být silnější než vitamíny C a E nebo karotenoidy.... Bylo pozorováno, že antioxidační schopnosti fenolických látek mohou být kontrolovány pomocí následných tří mechanismů: Prvním mechanismem je vyhledávání radikálních molekul vznikajících ROS, za druhé dochází k umlčování ROS formace přes zastavení zapojených enzymů, 3. ochrany antioxidantů...“ (Dai J., *et al.*, 2010).

V metabolismu buňky fenolické látky působí jako akceptoři radikálních molekul. Jejich hlavní význam ale spočívá je v jejich schopnosti rozbít vazby. Vazby dokáží rozbít tím, že dodávají vodík do molekuly látky, se kterou reagují (Dai J., *et al.*, 2010). Takto vznikající fenolické meziprodukty jsou velice stabilní a málo reakční. Reakční vodíkový atom pochází z fenolické hydroxylové skupiny. Aromatická skupina fenolických látky zaručuje jejich stabilitu i po odevzdání vodíku.

5 Lipidy a lipidová peroxidace

Lipidy jsou důležitou a stálou součástí všech buněk, ve kterých zastávají řadu významných funkcí. Jedná z těchto funkcí je stavba buněčné membrány, kde působí jako stavební kámen. Další funkce lipidů v buňkách je skladování energie, transportní funkce a buněčná signalizace.

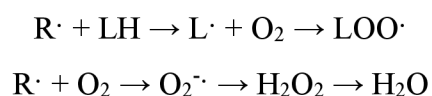
Je všeobecně přijímáno, že větší koncentrace ROS, a zároveň i jejich delší expozice v buňce, způsobuje poškození buněčným organelám a může vést až ke smrti samotné buňce a případně celé rostliny. Jeden z mnoha způsobů, jak oxidativní poškození vede ke smrti je oxidace lipidů, což spouští kaskádu reakcí, kde v závěru dochází k poškození lipidových vazeb tvořící buněčnou membránu, rozkladu napadané membrány a následné smrti buňky (Ayala A., *et al.*, 2014). Jednou z takových reakcí je proces takzvané lipidové peroxidace.

Lipidová peroxidace je zjednodušeně řečeno proces, kde volně nacházející se radikály v rostlinné buňce nebo navezené na jiné molekuly, poškozují lipidy nebo molekuly obsahující lipidy. Je to kaskáda reakcí, která vede k tvorbě lipidových peroxidů, což jsou molekuly obohacené o kyslíkové vazby. Hlavním substrátem lipidové peroxidace jsou lipidy obsahující dvojnou uhlíkovou vazbu, převážně nenasycené mastné kyseliny. Pár příkladů zasažených nenasycených kyselin je kyselina arachidonová, kyselina dokosaheptaenová a eikosa-pentaeonová. Toto jsou lipidy vyskytující se v membránách rostlinné buňky a jsou zodpovědné za jejich permeabilitu a stabilitu. Lipidová peroxidace nezasahuje nejen jen nenasycené lipidy membrán, ale zasahuje taktéž i fosfolipidy, glykolipidy, ale i steroidy. Nejčastější molekuly, které způsobují lipidovou peroxidaci a její poškození jsou ROS, jmenovitě hlavně $^1\text{O}_2$ a OH^\cdot (Ayala A., *et al.*, 2014).

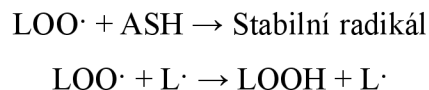
Naznačené nenasycené mastné kyseliny s dvěma a více dvojnásobnými vazbami působící jako substráty můžeme dále řadit podle způsobu, jak jsou dále redukovány (Ayala A., *et al.*, 2014). Můžou být redukovány enzymaticky, kdy hlavní rodina enzymů řídící tuto reakci jsou oxygenázy. Takto vznikající produkty jsou různé deriváty cytochromu P. Druhým způsobem, kterým mohou být degradovány je neenzymatická cesta. Neenzymatická dráha vede naopak ke vzniku aldehydických produktů, jako je například malondialdehyd a 4-hydroxynonenal. Neenzymatická cesta vede ke vzniku

toxičtějších a nebezpečnějších molekul, je proto nutné její konstantní kontroly přes antioxidační systémy.

Lipidová peroxidace probíhá ve třech fázích (Ayala A., *et al.*, 2014). V první fázi dochází k reakci volných radikálů s lipidem, LH, v membráně za vznikem lipidového radikálu L[·]. ROS působí jako redukční činidlo a odebírají volný elektron z lipidu. Tento radikál dále reaguje s volným kyslíkem za vzniku lipidovéhohydroxylového radikálu LOO[·] (Ayala A., *et al.*, 2014). Jiný způsob průběhu reakce je reakce radikálu s volným kyslíkem za vzniku O₂^{-·}. Vznikající O₂^{-·} je přeměňován na H₂O₂ za využití SOD. GSH peroxidáza následně tento H₂O₂ degraduje.



LOO[·] následně přitahuje vodíky z jiných lipidů a tvoří lipidový hydroperoxid LOOH a zároveň je tvořen i nový lipidový radikál L[·]. Tento nový radikál může znova reagovat s OH[·] nebo terminačními molekuly jako jsou antioxidanty. LOOH dále reaguje s molekulami vyskytující se v membránách buňky jako jsou lipidové radikály, aldehydy a mnoha další (Ayala A., *et al.*, 2014).. Tato reakční cesta vede k poškození membrán.



Pokud dojde k reakci s antioxidantem, pak je lipidová peroxidace zastavena a rostlina zahajuje antioxidační metabolismy a metabolismy degradace vzniklých produktů. Antioxidant může do reakce vstoupit v jakékoliv fázi a ukončit celou kaskádu. Mezi možné antioxidanty ukončující tuto kaskádu patří enzymy jako GSH, CAT, ASH (Ayala A., *et al.*, 2014)..

Problémem lipidové peroxidace, a proč je tak devastující pro buněčné membrány, je ten, že pokud není lipidová peroxidace regulována tak velice jednoduše dochází k nekontrolovatelnému průběhu, kdy – pokud nezasáhne antioxidant – může pokračovat, dokud existují vhodné substráty, na které se mohou radikály navázat. Dalším problematickým faktorem je ten, že radikály způsobující lipidovou peroxidaci působí po celé buněčné membráně, nikoliv jenom na jednom místě.

Lipidová peroxidace končí tvorbou řady produktů, jenom pár z nejvíce vznikajících produktů jsou lipidové peroxidy, které jsou sami o sobě relativně stabilní, ale mohou dále v metabolismu buňky reagovat. Příkladem takovou reakcí je Fentonova reakce, která byla probrána v kapitole 3. 1. 1. Lipidové peroxidy jsou první vznikající produkty lipidové peroxidace, vznikají totiž už v první reakci této kaskády. „Pozorovali jsme, že lipidové peroxidy mohou být užitečné v pozorování oxidativního stresu v tkáních, kdy se úroveň oxidativního stresu spolu s lipidovou peroxidací, během dne zvýšila. Jakmile jsou stvořeny, podléhají různým redukčním reakcím vedoucí k peroxidativnímu poškození nebo naopak jeho inhibici,“ (Ayala A., *et al.*, 2014)..

Lipidové peroxidy mohou být dále rozkládány za předejití oxidativního poškození anebo naopak mohou z nich, přes reakce s jinými radikály, vznikat kyslíkaté radikály a mohou znova poškodit buňku. Inhibice poškození lipidovými peroxidy je kontrolována *in vivo* přes dvojí reakcí elektronové redukce. Za tuto reakci zodpovídají enzymy glutathion peroxidázy spolu s proteiny, které mají selenové jádro, kdy glutathion peroxidázy redukují peroxidy na vodu a kyslík. Funkce druhých enzymů není stoprocentně jistá, ale předpokládá se, že urychlují reakci redukce díky jejich schopnost vázat jak peroxidy, tak i glutathion.

Další z mnoho produktů jsou různé aldehydy. Mezi nejvýznamnější aldehydy řadíme malondialdehyd, MDA, a 4-hydroxynonenal, HNE. Řada těchto produktů elektrofilní, kdy reaguje s DNA/RNA a jsou mutagenní, a proto nebezpečné. MDA je probráno v následující kapitole 5. 1. 2.

Vyšší úrovně radikálů nejsou tvořeny pouze metabolismy kyslíku v rostlinné buňce. V poslední době se ukazuje, že i jiné exogenní podněty způsobují vznik ROS v rostlinné buňce. Mezi takové podněty patří ionizační záření, ultrafialové světlo, patogenní infekce, přírodní toxiny, ale také herbicidy a insekticidy.

5. 1. 1 Produkty lipidové peroxidace: Malondialdehyd

Malondialdehyd je pravděpodobně jeden z nejvíce zkoumaných produktů lipidové peroxidace. Je to malá nestabilní molekula se třemi uhlíky a dvěma aldehydovými skupinami na pozici prvního a třetího uhlíku o sumárním vzorečku $C_3H_4O_2$. Mezi těmito uhlíky se nachází methylenová skupina, která je velice citlivá na oxidaci. Toto místo slouží jako základ k tvorbě radikálů, kdy methylenová skupina odevzdává vodík do vznikajících radikálů. Malondialdehyd se dle pH vyskytuje v buňkách v několika konformacích. Nad pH 4,5 se malondialdehyd vyskytuje jako enolový aniont, pod pH 4,5 se ale vyskytuje v přiměřené bilanci enolové a jeho dialdehydové formy. Tak či tak, je jeho enol forma $HOCH=CH-CHO$ preferovaná (Morales M., *et al.*, 2019). Oba dva tyto tautomery jsou reaktivní a velice jednoduše dále reagují.

Pro výzkum a pozorování malondialdehydu se vyvinulo několik metod, jmenovitě kapalná a plynovitá chromatografie, hmotnostní spektrometrie a assay metoda s kyselinou thiobarbiturovou. Studium malondialdehydu ale sahá už dlouho do minulosti, kdy je Heath R. L, Packer L. před 50 lety popsali vznik malondialdehydu při peroxidaci chloroplastů a jejich metodu pozorování jeho vzniku založenou na elektrofilních schopnostech malondialdehydu, kdy se za nízké pH hladiny váže na přidanou thiobarbiturovou kyselinu za tvorby červeného komplexu, který lze pozorovat spektrofotometricky při maximu 532 nm (Heath R. L., 1968). Tato metoda, v době svého vzniku, byla velice populární a používaná. Bylo však zjištěno, že je velice citlivá k interferenci látek, které se přirozeně vyskytují v rostlinných buňkách.

Kyselina thiobarbiturová je stále využívaná reakční látka při studiu malondialdehydu, kdy obě látky ochotně vstupují do reakce za vzniku komplexu, který lze spektrofotometricky pozorovat či měřit hmotnostní spektrometrií (Morales M., Munné-Boch S., 2019)

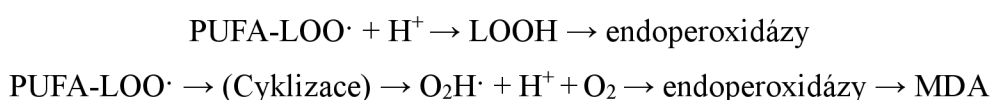
Tuto metodu měření malondialdehydu za využití kyseliny thiobarbiturové rozvinuli Hodges et al. v roce 1999 rozdělením spektrometrických vzorků na vzorky obsahující thiobarbiturovou kyselinu a vzorky ji neobsahující (Hodges et al., 1999). Spolehlivost a účinnost této spektrofotometrické metody byla hodnocena změnou relativních poměrů přídavek exogenního MDA a/nebo extraktů z listů červeného zelí (*Brassica oleracea L.*) obsahujících interferující sloučeniny a poté měřením výtěžnosti MDA. „Spolehlivost byla také ověřena pomocí technik vysokoúčinné kapalinové chromatografie a vysokoúčinné kapalinové chromatografie-hmotnostní spektrometrie.

Výsledky ukázaly, že přes 90 % exogenně přidaného MDA mohlo být získáno prostřednictvím vylepšeného protokolu. Pokud nebyly provedeny žádné korekce pro interferující sloučeniny, byly ekvivalenty MDA nadhodnoceny až o 96,5 %. Rušivé sloučeniny nebyly zjištěny...“ (Hodges *et al.*, 1999).

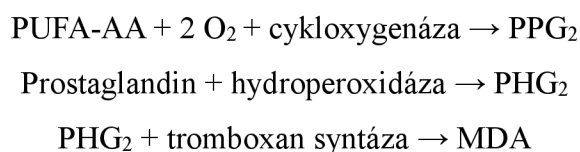
MDA je produkována peroxidací mastných kyselin s dvěma a více dvojnými vazbami jako jsou arachidonové, dokosahecanové, eikosatetranové kyseliny. Toto je neenzymatický způsob tvorby MDA vyvolaný ROS. Během kaskády těchto reakcí lipidové peroxidace vzniká velké množství radikálů (Cordiano R., *et al.*, 2023, Ayala A., *et al.*, 2014). Jeden z prvních takto vznikajících radikálů je LOO·, který může projít dvěma různými reakcemi.



V membránách způsobuje vitamín E či další mastná kyselina redukci LOO· radikálu. Redukcí vznikají endoperoxidázy, které přechází na MDA;



Enzymatická cesta syntézy MDA nastává, pokud PUFA-AA reagují s volnými molekuly kyslíku. Je to, stejně jako neenzymatická cesta, kaskáda reakcí o několika kroků a produktů (Cordiano R., *et al.*, 2023). Enzymatickou cestu obstarávají enzymy cyklooxygenázy, hydroperoxidázy a tromboxan syntáza;



V enolové formě je MDA mutagenní molekula. V rostlinných buňkách způsobuje inzerci, delecii a substituci uhlikatých bázi. Zároveň může reaguje s dusíkem a tvoří adukty. Tento typ aduktů jsou nejpočetnější druh tvořených aduktů. Ostatní adukty, jako ty tvořené s reakcí karbonylových nebo aldehydových skupin s lipidy, jsou méně časté.

Za ideálních podmínek MDA reaguje s ε-amino skupinou proteinů, což způsobuje změnu konformace a vzájemnou interakci tam, kde by neměla probíhat (Janero D. R., 1990). Takto způsobuje různé mutace proteinů, které mohou vést až k jejich degradaci.

MDA reaguje s thiobarbiturovou kyselinu za tvorby dobře pozorovatelného růžového chromogenu v píku 532-535 nm pozorovatelného světla, který může být měřen pomocí HPLC.

MDA, jako nestabilní molekula, podléhá aldehyd dehydrogenázám, které ho přeměňují na acetaldehyd, který může být zpětně oxidován na acetát. Samotný MDA může podléhat kondenzaci a následnému rozpadu za vzniku několika dalších škodlivých produktů jako jsou oligomery, methanoly a acetaldehydy. Tyto produkty, stejně jako samotné MDA, se mohou vázat na DNA/RNA.

5. 1. 2 Produkty peroxidace: 4-hydroxynonenal

HNE, $C_9H_{16}O_2$, je produkt peroxidace větších mastných kyselin jako je kyselina dokosahexanová nebo arachidonová. Je to velice reaktivní molekula s dvojnou uhlíkovou vazbou, thiolovou skupinou, karbonylovou a hydroxylovou skupinu. Všechny tyto funkční skupiny jsou cílem mnoha dalších reakcí jako je tvorba Schiffovy báze, různé alkoholové metabolické reakce a další jiné redukční či oxidační reakce. HNE je tvořen dvěma cestami: jedna cesta je reakce lipooxygenás s kyselinou linolovou či linolenovou za vzniku HNE (Ayala A., *et al.*, 2014).

Druhá cesta je rozvinutější, kdy dochází reakcí radikálů za tvorby několika HNE. Způsoby, jak může vzniknout HNE přes radikály, je několik (Ayala A., *et al.*, 2014). Tyto cesty často zahrnují přidávání a reakce s kyslíkem či vodíkem a následnou fragmentací či cyklizací. Kyselina se rozkládá na lipidový radikál, který po reakci s kyslíkem přechází na $LOO\cdot$. Ten může volně přejít na $RO\cdot$ a ten cyklizací přechází na HNE. Peroxylový radikál může reagovat s volným vodíkem, kdy tvoří hydroperoxylový radikál, který může volně přejít na nový $RO\cdot$. Hydroperoxylový radikál může dále reagovat s kyslíkem a po následné fragmentaci je z něho tvořen HNE.

Další osud HNE v buňce záleží na typu buňky, kde byl HNE vytvořen, a dle typu probíhajícího metabolismu (Ayala A., *et al.*, 2014). Pokud vznikajícího HNE je málo, buňka je schopná se s ním vypořádat. „HNE o střední koncentraci může aktivovat organelové a proteinové poškození, což může vést až k fagocytóze, senescenci či zastavení buněčného cyklu. Buňka může tuto koncentraci ještě přežít. Pokud se ale HNE nachází ve velké koncentraci, pak dochází k apoptóze či nekróze a buňky odumírají. Tyto procesy v závěru vedou k různým úrovním patologického poškození buněk. Vysoké úrovně HNE mohou dále reagovat s DNA a nebo/s proteiny za tvorby aduktů vedoucí k různým cytotoxickým a genotoxickým následkům.“ (Ayala A., *et al.*, 2014).

CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je vypracování literární rešerše na téma tvorby malondialdehydu při mechanickém poškození listů se zaměřením na mechanické a oxidativní poškození rostlin, antioxidační systémy v rostlinách, reaktivní formy kyslíku, lipidovou peroxidaci a malondialdehyd. V praktické části je cílem měření tvorby malondialdehydu po mechanickém poškození rostlin a stanovení případného trendu jeho vzniku. Dalším cílem bylo studovat vznikající malondialdehyd v různě zvolených časových úsecích a zmapovat jeho množství v čase. Dalším cílem bylo stanovit, zda-li existuje rozdíl mezi vznikem malondialdehydu wild typu a mutantem. Cílem práce bylo položení a zodpovězení otázky, zda malondialdehyd je adekvátní marker oxidativního stresu rostlin.

5 METODY A MATERIÁLY

5.1 Přístrojové vybavení

Stolní centrifuga Centrifuge 5430 R (Eppendorf AG, Hamburg, Německo), stolní Termoblock (Waters Corporation, Vídeň, Rakousko), chromatograf Alliance HPLC System (Waters Corporation, Vídeň, Rakousko), detektor Photodiode Array Detector (Waters Corporation, Vídeň, Rakousko), chromatografická kolona Astra C18-HL, 150 x 4,6 mm s velikostí částic 3 μm (Waters Corporation, Vídeň, Rakousko).

5.2 *Arabidopsis thaliana* – Wild type plus mutant

V této práci jsme využili *A. thaliana* rolního typu wild type ColO, a jeho mutantu ILox 2. ILox 2 je mutantní kmen *A. thaliana*, který byl zbaven enzymu lipoxygenázy. Lipoxygenáza katalyzuje oxidaci nenasycených mastných kyselin lipidů s jednou nebo více dvojnásobnými vazbami za vzniku signálních molekul.



Obrázek č. 1: Obrázek připraveného *A. thaliana*, kdy na pravé straně rostliny jsou poškozené listy a na levé jsou nepoškozené.

5. 3 Příprava vzorků izolací malondialdehydu na HPLC a jeho měření

Izolace malondialdehydu z rostlinného materiálu probíhala v několika krocích. Prvním krokem byla homogenizace poškozených listů v třecí misce. Homogenizovaná směs byla přesunuta do mikrozkuvek a následně centrifugována (4°C, 6000 g, 10 min). Následně bylo odebráno 100 µl supernatantu do nové mikrozkuvky, do které současně s supernatantem bylo přidáno 20 µl 6M hydroxidu sodného. Po smíchání proběhla tepelná inkubace na Termoblocku (60 °C, 30 minut). Po tepelné inkubaci bylo přidáno do roztoku supernatantu 60 µl kyseliny chloristé a proběhla další centrifugace (4 °C, 16 000 g, 10 min). Po proběhlé centrifugaci bylo odebráno 100 µl supernatantu do nové mikrozkuvky, do které bylo současně přidán 1 µl 50 mM 2,4-dinitrofenylhydrazinu. Proběhla inkubace ve tmě po minimální dobu 30 minut a vzorek mohl být měřen pomocí HPLC. Složení mobilní fáze (50:50) voda:acetonitrile, průtok 1,5 ml/min, kolona C18-HL, temperována na 37°C, absorbance měřena při 310 nm.

5. 4 Příprava vzorků na pozorování konfokálním mikroskopem

List byl z rostliny odebrán, tak aby zůstala jenom čepel, která byla následně rozstříhána vertikálně, tak aby námi použitá polovina neobsahovala řapík. Následně byl list mechanicky poškozen postříháním nůžkami, tak ale aby tvar byl zachován. Poté byl takto poškozený list tlakově zpracován v injekční stříkačce za využití barviva 2,7-dichlorofluoresceinu dioctanu ve finální koncentraci 5 µM. Tento postup byl opakován zhruba 5 minut nebo dokud do té doby, než byl list průhledný a sytě světlezelený. Na to byl list opatrně odebrán ze stříkačky a přemístěn do mikrozkuvky naplněné stejným barvivem. Takto byl inkubován ve tmě minimálně třicet minut. Poté byl vzorek připraven na pozorování.

Následná příprava na pozorování byla jednoduchá, kdy byl list vyndán z mikrozkuvky a byl z něho připraven jednoduchý preparát, který byl následně vložen do benchtop konfokálního mikroskopu.

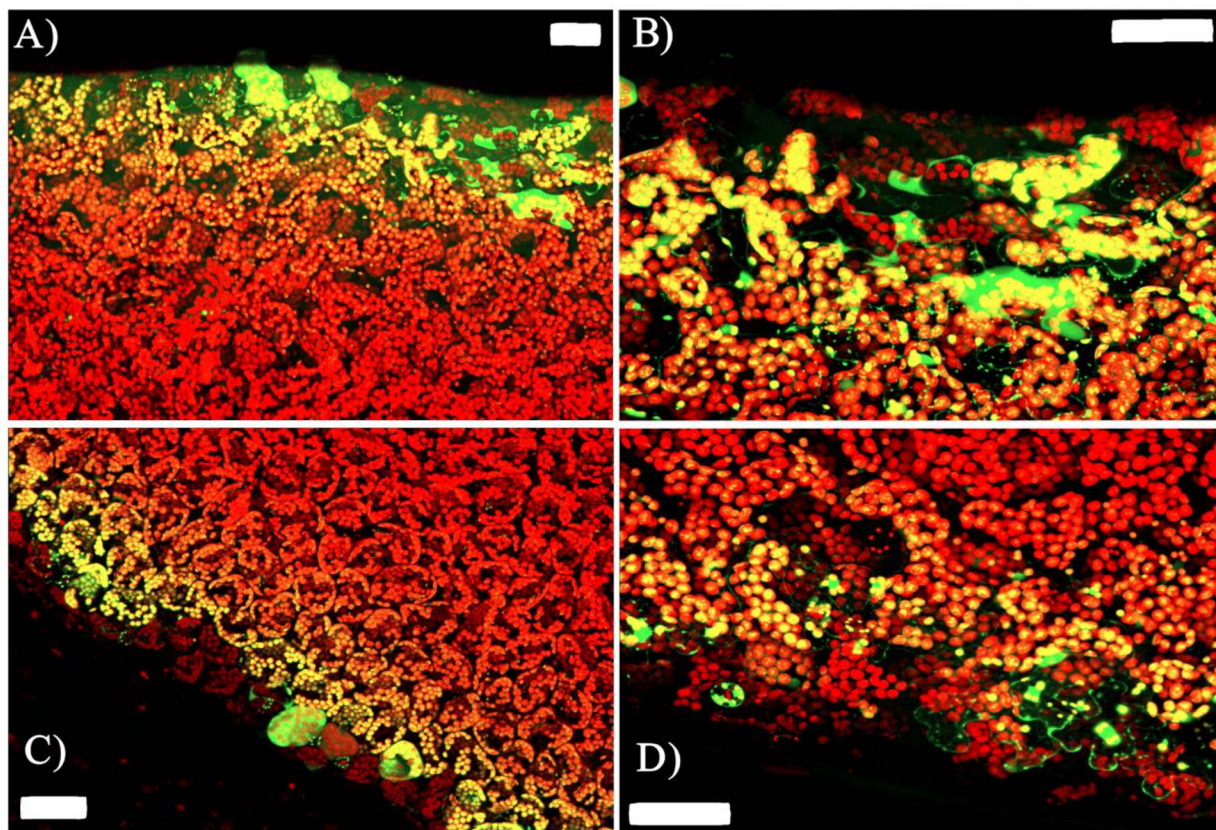
5. 5 Konfokální mikroskop

Pozorování proběhla na benchtop konfokálním mikroskopu (Andor, Belfast, Severní Irsko) s dodaným softwarem Fusion. Pozorování proběhlo ve formě 2,5D projekce s maximální intenzitou a dvě dvou sadách zvětšení, 40x a 20x, a ve dvou vlnových délkách, červené a zelené. Pro pozorování v řadě zvětšení 20x byly intenzity nastaveny v rozmezí pro červenou část spektra od 1000 až po 20 000 a pro zelenou část od 1000 po

10 00. Naopak, pro zvětšení 40x byla intenzita červená části spektra 1000 až 5000 a pro zelenou část taktéž od 1000 po 5000.

6 VÝSLEDKY

6.1 Tvorba ROS při mechanickém poškození

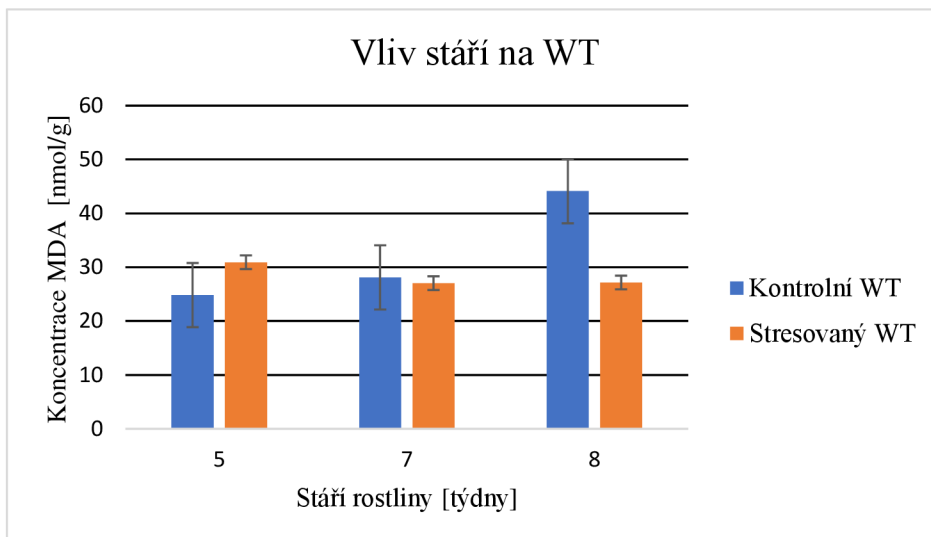


Obrázek č. 2: Koláž námi provedených měření provedených konfokálním mikroskopem. Obrázky A) a B) jsou obrázky ColO, kdy obrázek A) je zvětšení 20x a B) je zvětšení 40x. Obrázky C), zvětšení 20x, a D), zvětšení 40x, jsou obrázky ILox 2 mutanta. Měřítko představuje 50 μm .

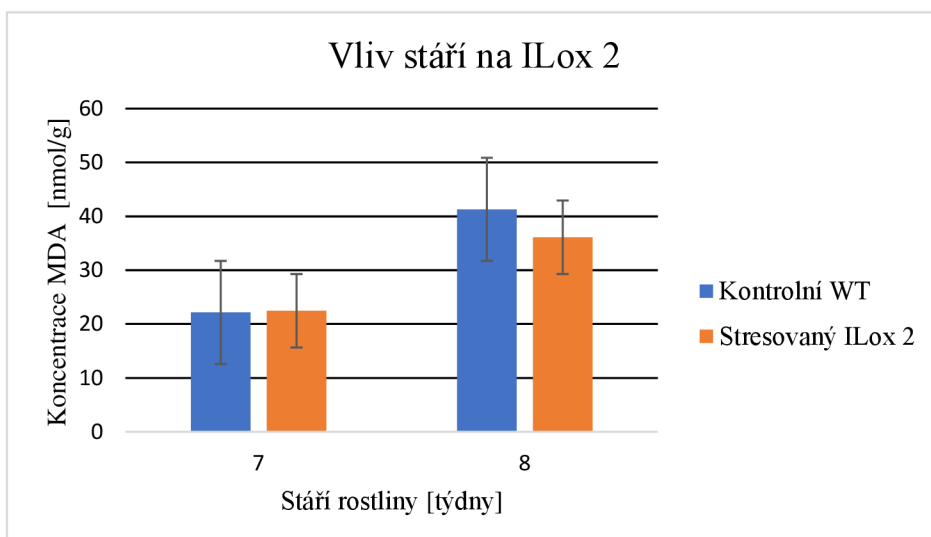
V obrázku č. 2 si lze všimnout červené a zelené fluorescence měřené v blízkosti poškození. Červená barva znázorňuje fluorescenci chloroplastů a zelená barva znázorňuje fluorescenci samotných ROS. Rozšíření zelené barvy od poškození naznačuje, že ROS jsou tvořeny buňkami dále od samotného místa poškození. Zároveň lze pozorovat, že ROS jsou tvořeny jak u ColO, pak i ILox 2.

6. 2 Studium vlivu stáří rostliny na tvorbu MDA

Byl zkoumán vliv stáří rostliny na tvorbu MDA pomocí HPLC-PDA metodiky. Námi zvolený úsek věku rostliny byl od 5 týdnů až po 8 týdnů. Námi připravené vzorky na následně měření byly odebrány od rostlin o různých věkú a následně měřeny na HPLC-PDA. Následně byly výsledky, ve formě průměrných hodnot, vneseny do tabulky pro přehlednost a studium časového vlivu (Graf č. 1 a 2 a tabulky 1 a 2).



Graf č. 1: Graf porovnávací vliv stáří na tvorbu MDA mezi WT kontrolních a stresovaných rostlin *A. thaliana*, hodnoty představují průměr a směrodatnou odchylku; $n = 3$.



Graf č. 2: Graf porovnávací vliv stáří rostlin na tvorbu MDA mezi ILox kontrolních a stresovaných rostlin *A. thaliana*, hodnoty představují průměr a směrodatnou odchylku; $n = 3$.

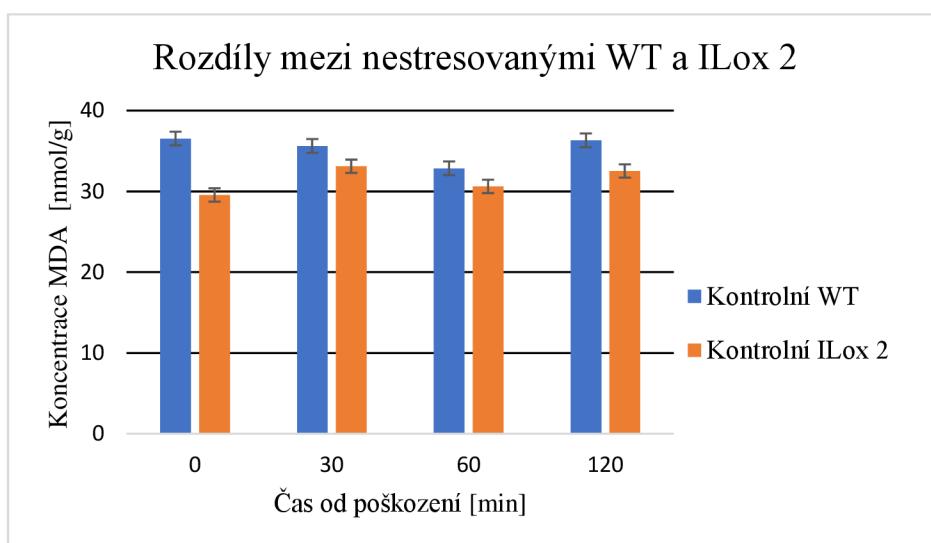
Z tabulky č. 1 plyne, že mladší rostliny tvořily průměrně vyšší množství MDA. S rostoucím věkem rostliny naopak množství tvořeného MDA klesalo.

Z grafů č. 1 a 2 si lze všimnout, že vliv stáří na koncentraci MDA je náhodný a bez jasného průběhu.

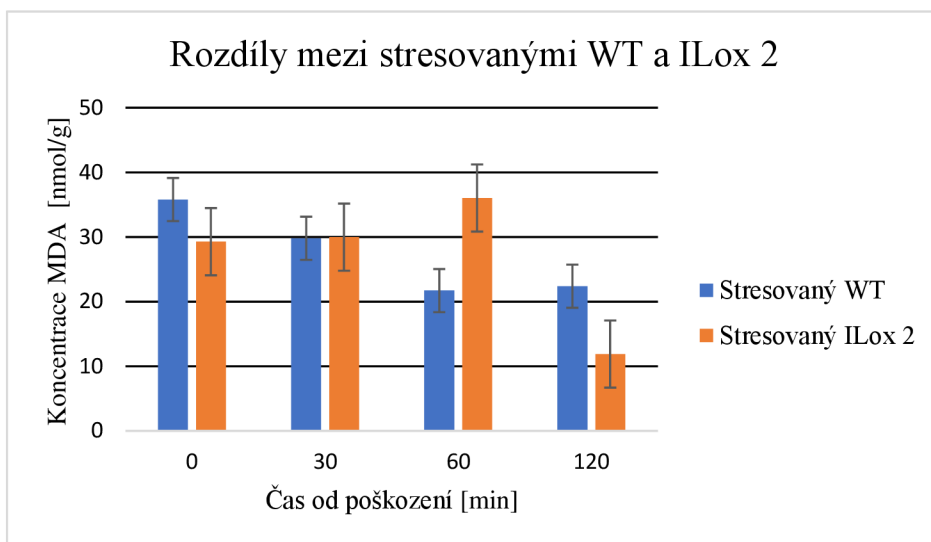
6.3 Rozdíly vzniku MDA mezi WT a ILox 2 mutanty

Zajímalo nás, jestli je rozdíl ve vzniku MDA mezi WT a námi zvoleným ILox 2 mutantem. Tento faktor byl zkouman jak pro WT tak i ILox 2.

Všechny naměřené hodnoty byly zároveň dány do společných tabulek (tabulky 1 a 2).



Graf č. 3: Graf porovnávající rozdíly vzniku MDA mezi nestresovanými WT a ILox 2 mutantem, hodnoty představují průměr a směrodatnou odchylku; $n = 3$.

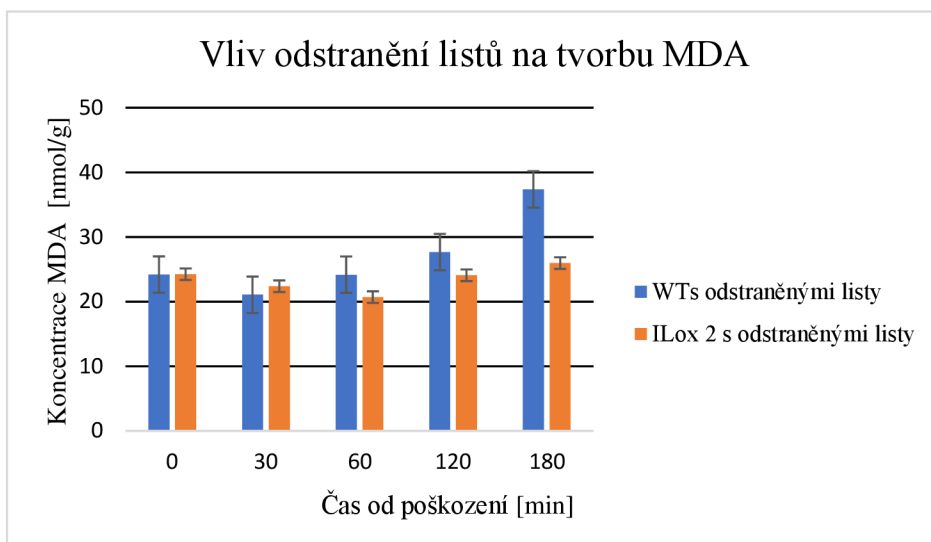


Graf č. 4: Graf porovnávací rozdíly vzniku MDA mezi stresovanými WT a ILox 2 mutantem, hodnoty představují průměr a směrodatnou odchylku; $n = 3$.

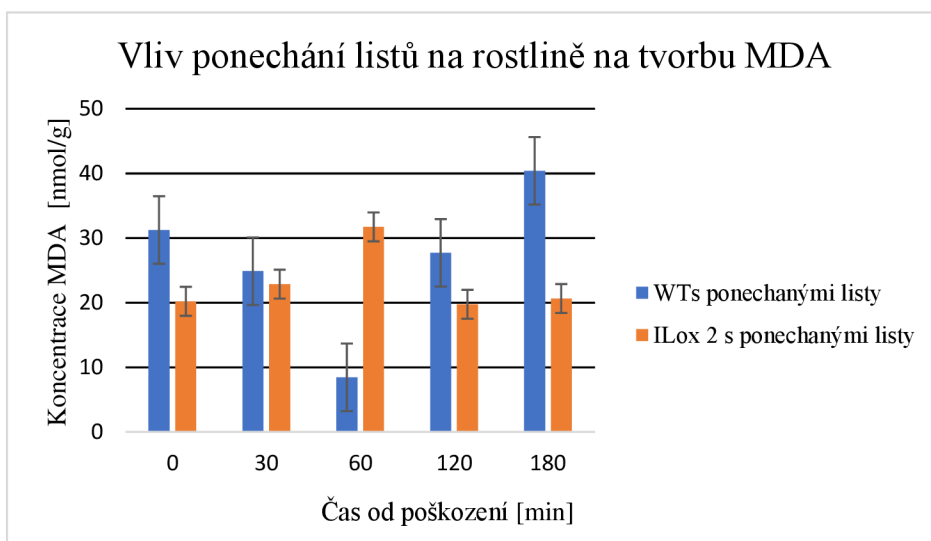
Z grafů č. 3 a 4 lze vidět, že rozdíly mezi WT a ILox 2 mutantem jsou převážně náhodné. Jediný pozorovatelný trend je nárůst koncentrace MDA v šedesáté a devadesáté minutě a rychlý pokles ve stovčacáté minutě.

6.4 Rozdíly mezi tvorbou MDA u listů na rostlině a z rostliny odstraněných

Jeden z faktorů, který byl brán v potaz byl ten, zdali je rozdíl ve vzniku MDA mezi listy, které byly ponechány na rostlině oproti listům, které byly odstraněny z rostliny. Pro zachování podmínek co nejvíce podobných pro všechny intervaly a zároveň co nejbližší k nativním podmínkám byly odebrané listy ponechány v mikrokumavkách naplněných vodou pro největší zachování vodního režimu a minimalizace dehydratace listu.



Graf č. 5: Graf porovnávající rozdíly vzniku MDA mezi WT a ILox 2 listy které byly odebrány z rostliny, hodnoty představují průměr a směrodatnou odchylku; $n = 3$.



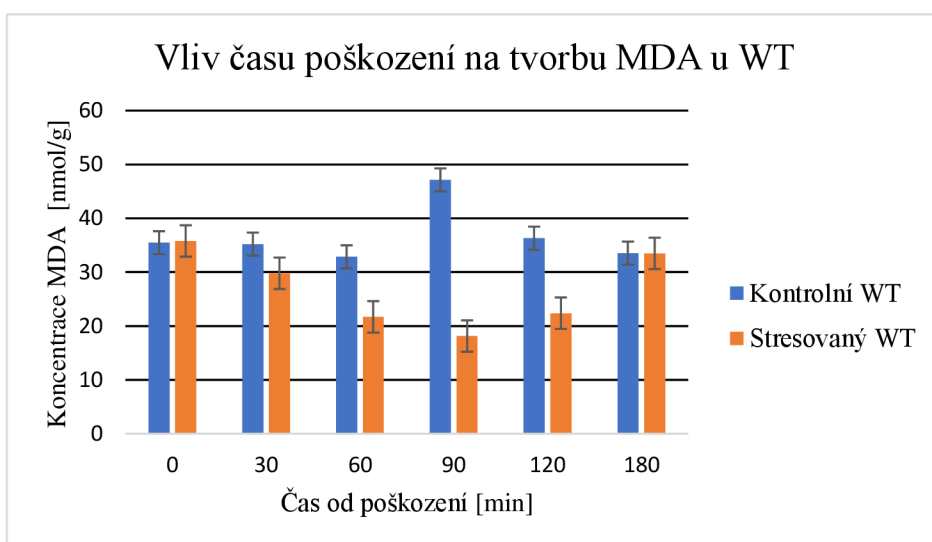
Graf č. 6: Graf porovnávající rozdíly vzniku MDA mezi WT a ILox 2 listy, které byly ponechány na rostlině, hodnoty představují průměr a směrodatnou odchylku; $n = 3$.

Z grafů č. 5 a 6 lze vidět, že rozdíly mezi WT a ILox 2 mutantem jsou hlavně náhodné. Jediný trend, který je společný v obou grafech, je ten ve 180. minutě, kde koncentrace MDA je mnohonásobně vyšší u WT. Tento násobný nárůst by mohl být přiřazen k úmrtí odebraných listů, ale z grafu č. 8 si jde všimnout, že toto není pravda, kdy rostlina s odebranými listy měla větší koncentraci MDA.

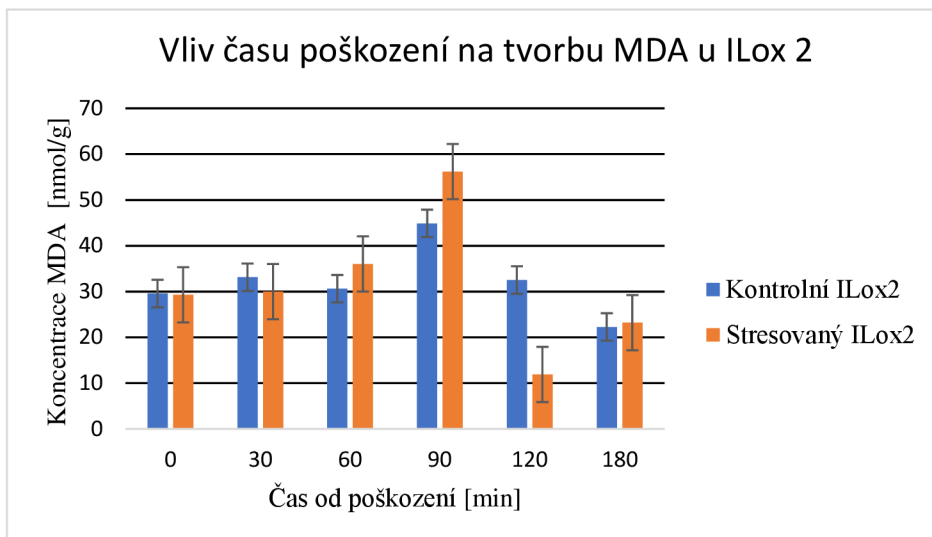
6. 5 Tvorba MDA v závislosti na času od poškození

Jeden z mnoha zkoumaných faktorů byl faktor tvorby MDA a jeho množství v různých časových intervalech po vzniku poškození, rychlost jeho vzrůstu a jak dlouho trvá

rostlině, než je se ho schopna zbavit, či jak dlouho trvá, než se úroveň MDA vrátí do původní hodnoty. K tomu byly použity listy, které byly zmrazeny v různých časových intervalech od vzniku poškození. Listy byly po vzniku poškození ponechány na rostlině. Mezi tyto časové intervaly poškození byly vybrány okamžité zmražení od vzniku poškození pro pozorování prvotních zvýšených MDA. Intervaly byly dále od sebe děleny 30 minutami, kdy se ukázalo, že tento časový rozdíl poskytuje dostatečně velký rozdíl mezi jednotlivými měření pro jednodušší pozorování vzniku MDA.



Graf č. 7: Graf porovnávající vliv trvání poškození na tvorbu MDA mezi WT kontrolních a stresovaných rostlin *A. thaliana*, hodnoty představují průměr a směrodatnou odchylku; $n = 3$.



*Graf č. 8: Graf porovnávací vliv trvání poškození na tvorbu MDA mezi ILox 2 mutantů kontrolních a stresovaných rostlin *A. thaliana*, hodnoty představují průměr a směrodatnou odchylku; $n = 3$.*

Pokud porovnáme časové intervaly a množství MDA v grafech č. 7 a 8 pak si lze všimnout, že růst MDA v těchto intervalech probíhá bez jasného trendu. Někdy nejvyšší hodnota množství MDA nastává 30 minut po vzniku poškození a následně klesá. Byl vyzkoušen i delší časový úsek pro tvorbu MDA, kdy se, avšak ukázalo, že množství MDA náhodně skáče, a proto byl pro další pokusy vybrán celkový interval od 0 po 120 minut, s měřením dalšího vzorku po 30 minutách. Jedinou výjimkou tohoto trendu je v 90. minutě, kde množství mnohokrát narostlo u stresované rostliny WT a naopak u nestresované rostliny u ILox 2.

Tabulka č. 1: Tabulka vyjadřující průměrné hodnoty MDA v nmol/g u WT.

	WILD TYPE											
	Kontrolní rostliny						Stresované rostliny					
	Čas [min]						Čas poranění [min]					
Věk rostliny [týdny]	Okamžité	30	60	90	120	180	Okamžité	30	60	90	120	180
5							25,02	44,15	47,31	44,72	41,72	
5	21,33	20,38	32,77				24,41	25,03	43,33			
7	27,21	27,42	34,022		25,80	24,66	29,73	29,15	31,75		23,98	29,63
7	32,45	35,02	12,29		25,87	38,49	30,23	14,70	14,32		29,52	37,32
8	41,24	39,25	46,19	47,14	46,91		41,61	37,69	20,39	18,15	18,02	

Tabulka č. 2: Tabulka vyjadřující průměrné hodnoty MDA v nmol/g v ILox 2 mutantu.

	Ilox mutant											
	Kontrolní rostliny						Stresované rostliny					
	Čas [min]						Čas poranění [min]					
Věk rostliny [týdny]	Okamžité	30	60	90	120	180	Okamžité	30	60	90	120	180
7	23,17	21,84	22,01		20,43	24,17	25,30	22,94	19,45		27,74	27,56
7	16,30	22,51	26,73		26,73	20,35	17,20	23,21	36,71		13,22	20,91
8	39,39	44,05	7,66	44,88	41,70		37,31	36,89	46,83	56,20	3,31	

DISKUZE

Vyhledání „Malondialdehyde“ na Scopus databázi podává 89 000 výsledků (Scopus databáze, 2024) a jeho vyhledávání na Web of Science podává 59 000 výsledků (Web of Science databáze, 2024). Pár důvodů, proč je dodnes malondialdehyd tak často zkoumaná molekula je ten, že mechanismus jeho tvorby je sice prozkoumaný, ale pořád se nabízí další a další otázky ohledně jeho funkčnosti. Zároveň se nabízí jako možný marker při výzkumech oxidativního poškození a odrazný bod pro další výzkum. Další důvod, proč je tak zkoumaný je jeho toxicita jak u savčích tkání, tak i u rostlin. Jeho tvorba a biologické interakce jsou dodnes zkoumané a dokumentovaná témata.

Prvotně jsme ověřili tvorbu ROS v poškozených listů za využití konfokálního mikroskopu. Studované vzorky listů jsme poškodili a inkubovali v barvivu 2,7-dichlorofluoresceinu dioctanu. Takto inkubované vzorky byly pozorovány, kde jsme mohli nejen pozorovat vznikající ROS, mohli jsme i vidět, jak zároveň ROS vznikají i několik buněk od poškozeného místa. Takto jsme si potvrdili tvorbu ROS. Tento trend jsme pozorovali jak u WT, tak i ILox 2 mutanta, který byl vybrán jako poměrový rozdíl v našem experimentu.

Po potvrzení tvorby ROS jsme přešli na měření a zkoumání vlivů ovlivňující tvorbu MDA. První zkoumaný faktor byl vliv stáří rostliny na vznik MDA, kde jsme použili rostliny ve věku 5 až 8 týdnů. Avšak literatury k tomuto tématu je velice malé množství. Po provedení měření jsme pozorovali, že WT *A. thaliana* produkuje průměrně větší množství MDA (Graf 1 a 2). Zároveň jsme pozorovali to, že u osmi týdenních rostlin, jak WT tak i ILox 2, se zvětšila naměřená koncentrace MDA. Zaměřili jsme se tedy dále na rozdíly mezi WT a ILox 2 mutantem a vliv lipoxygenázy jako peroxidačního enzymu.

Lox 2 jako enzym se podílí na tvorbě MDA při mechanickém poškození. Jelikož ILox 2 je mutant, který je o tento enzym chudší, očekávali jsme pokles MDA. Raymond *et al.* a jeho tým provedli experiment, kdy pozorovali expresi genů během mechanického poškození vyvolané kleštičkami, poškození během dehydratace a poškození způsobené larvou hmyzu. Taktéž zjistili zvýšenou aktivitu Lox enzymu, a jeho kódujících genů, během mechanického poškození a poškození vyvolané kleštičkami (Raymond *et al.*, 2000). V našem experimentu se nám podařilo naměřit jasný rozdíl mezi WT a ILox 2, kdy jsme u kontrolních rostlin pozorovali menší hodnoty MDA u ILox 2 rostlin. Podobný

trend jsme pozorovali i u stresovaných rostlin, kdy v okamžitém způsobení poškození i po půl hodinové odlevě, a dokonce i dvouhodinové odlevě, jsme pozorovali větší hodnoty MDA u WT. Jediný rozdíl, kdy větší množství MDA bylo pozorované u ILox 2 mutanta, bylo po jedné hodině vyvolání poškození (Grafy č. 3 a 4). V tomhle měření, jako celku, se naše hodnoty neshodují s Reymond *et al.*, ale s jistotou nemůžeme říct proč. Tyto výsledky spíše poukazují na to, že není korelace mezi aktivitou LOX a koncentrací MDA. Jedno z možných vysvětlení tohoto trendu je ten, že kromě aktivity LOX je zvýšená i aktivita antioxidantních enzymů, které následně detoxifikují MDA.

Jelikož odstranění listu je samotné mechanické poškození rostliny, a Reymond *et al.* prokázali, že při mechanickém poškození vede k zvýšené aktivitě LOX, prozkoumali jsme efekt oddělení listu na koncentraci MDA. J. S. Boyer provedl experiment měření vodního potenciálu a hladiny fotosyntézy po vodním deficitu listu. Z jeho experimentu vychází, že vodní potenciál klesá postupně v rámci dnů s počátkem pár hodin po vyvolání deficitu. Zároveň ale stanovuje graf opravy vodního potenciálu, kdy list, pokud jsou vhodné podmínky potkány, je schopen vodní potenciál během pár hodin napravit na tolerované hodnoty (Boyer J. S., 1971). J. S. Boyer navrhuje vložení místa, ze kterého byl list odebrán, do oblasti s čistou vodou a nechat list na osvětleném místě za stálé teploty. Pro zachování podmínek co nejbližší podobných nativním podmínkám a snížení vlivu odstranění listu z rostliny tak jsme učinili to, co J. S. Boyer doporučuje k zachování/navrácení vodního potenciálu do normálních hodnot a pokračovali s našim měřením. Takto jsme uskutečnili dvoje sady měření a porovnali výsledky mezi jednotlivými sety. Tyto sety byly rozděleny do rostlin, ze kterých byly odebrány listy, následně poškozeny a poté inkubovány v mikrozkuhavce s vodou. Toto bylo provedeno jak u WT, tak i ILox 2 a výsledky byly následně porovnány. Tyto výsledky můžeme vidět u grafů č. 5 a 6, ze kterých si můžeme všimnout až náhodného trendu tvorby MDA, kdy v určitých časových úsecích od poškození bylo naměřeno větší množství MDA u WT a někdy u ILox 2. U rostlin s odebranými listy, jak WT i ILox 2, si můžeme všimnout stabilnějšího průběhu, kdy poměry a rozdíly mezi jednotlivými rostlinami skáčou mnohem méně než u rostlin s ponechanými listy. Odhadujeme tedy, že tento trend závisí na antioxidantních schopnost rostliny, a všechny zapojené antioxidanty, které se na rostlině s ponechanými listy nachází oproti rostlinám s odebranými listy.

Měřili jsme tvorbu MDA v závislosti na čase od poškození. Kdy námi očekávané výsledky měly průběh žádného až menšího nárůst MDA od okamžitého poškození, následně nárůst koncentrace MDA po celou dobu průběhu lipidové peroxidace. Podobný trend jsme očekávali i u ILox 2 mutanta, ale s menšími hodnoty a následnými poměry. Toto nám ale nevyšlo, kdy jsme spíše naměřili až náhodně poměry a průběhy. Z literatury se o této problematice nejde moc dočíst, kdy větší číslo osob studující koncentraci MDA v čase není. Reymond *et al.* (Reymond *et al.*, 2000) studovali aktivitu antioxidantních enzymů a enzymů spojenými s mechanickým poškozením, kdy jsme ve vlastním měření pozorovali rozdíly mezi WT a mutantem odebraného o ILox enzym.

Jedna ze studií koncentrace MDA pochází od Weber H. *et al.*, kdy on a jeho tým provedli několik experimentů s koncentrací MDA, kdy zkoumali vliv inhibitorů, růstových podmínek (jako tma), genovou expresi a dalších faktorů na tvorbu MDA. Pro nás nejzajímavější výsledky, které prezentovali ale, bylo měření množství MDA v čase a následně po umělém přidání MDA do listu. Poté, co byla MDA uměle přidána do listů *A. thaliana*, pak množství mnohonásobně vyrostlo a následně, v průběhu času, zase rychle klesalo (Weber H. *et al.*, 2004). Tyto výsledky nám poukazují na schopnost *A. thaliana* se rychle a efektivně vypořádat s MDA. Tento fakt nám může pomoc vysvětlit, proč námi měřená koncentrace MDA nekoreluje s dobou, po kterou běžela lipidová peroxidace a nabádá k závěru, že MDA není vhodný marker pro lipidovou peroxidaci při mechanickém poškození. Pokud se rostlina dokáže s MDA velice jednoduše vypořádat, pak nemůžeme MDA doporučit jako marker při mechanickém poškození a následném oxidativním stresu.

Havaux M. *et al.* své studii zvýšené senzitivě vitamín B deficitních rostlin ke světlu a oxidativnímu stresu použil jako marker lipidové peroxidace HOTE, což jsou 9-hydroxyoktadekadienové kyseliny, které vznikají oxidací kyseliny linolenové. Doporučujeme prozkoumat vhodnost HOTE jako markru pro lipidovou peroxidaci vyvolanou mechanickým poškozením listů

ZÁVĚR

Teoretická část této bakalářské práce byla zaměřena na téma mechanického poškození, oxidativní stresu, reaktivních forem kyslíku a vznikajícího meziproduktu lipidové peroxidace, malondialdehydu.

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo pozorování vzniku malondialdehydu po oxidativním stresu rostliny v důsledku mechanického poškození a stanovení jeho koncentrace v čase. Zároveň byla položena a zodpovězena otázka, zdali je malondialdehyd vhodný marker oxidativního stresu.

V naší práci došlo k potvrzení vzniku ROS při mechanickém poškození nejen v místě samotného poškození, ale i vzniku ROS pár buněk od vzniklého poškození.

Dále proběhlo měření závislosti MDA na stáří rostliny, kdy jsme dospěli k závěru, že existuje závislost koncentrace vznikající MDA na stáří rostliny, kdy starší rostliny prokazovali nárůst hodnot MDA a nárůst vznikajícího poměru mezi kontrolní se stresovanou rostlinou, viz grafy č. 1 a 2.

Následující měření poukázalo na vznikající rozdíly v hodnotách MDA mezi WT a *ILox 2 A. thaliana*. Hlavní rozdíl vzniká u kontrolních rostlin, kde *ILox 2 A. thaliana* dosáhla nižších hodnot koncentrace MDA, což proběhlo dle očekávání. Podobný trend jsme předpokládali i u poškozených rostlin, ale po vzniku poškození tomuto již tak není a námi naměřené hodnoty nesledují jasný trend u stresovaných rostlin.

Poslední měření, na které jsme se zaměřili, byla korelace mezi časem od vzniku poškození a množstvím vznikajícího MDA. V tomto měření jsme očekávali menší nárůst hodnot MDA od vyvolání poškození až po doby ukončení lipidové peroxidace, ale námi naměřené hodnoty tomuto trendu neodpovídali. V závěru jsme tedy nemohli stanovit jasný trend, a myslíme si tedy, že neexistuje korelace mezi množstvím MDA a časem od vzniku poškození.

Podle nás není MDA vhodný marker lipidové peroxidace při mechanickém poškození rostlin. Naopak doporučujeme prozkoumat možnost využít HOTE jako marker lipidové peroxidace při mechanickém poškození.

SEZNAM LITERATURY

SHARMA A., SHAHZAD B., REHMAN A.; Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress; **Molecules**, 2019.

AYALA, A., MUNOZ, M., ARGÜELES, S.; Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 14, p. 9, 2014.

LICHTENTHALEL H. K.; The Stress Concept in Plants: An Introduction; **Stress of life: From molecules to man**, p. 1987-198, 1998.

CLARK C. M., BAI Y., BOWMAN W. D., COWLES J. M.; Nitrogen Deposition and Terrestrial Biodiversity; **Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition**; p. 519-536, 2013.

MENG X., CHEN W. W., WANG Y. Y., HUANG Z. R., YE X., CHEN L. CH., YANG L. T.; Effects of phosphorus deficiency on the absorption of mineral nutrients, photosynthetic system performance and antioxidant metabolism in *Citrus grandis*; **PLoS One**; 2021.

WHITE P. J., BROADLEY M. R.; Calcium in Plants; **Annals of Botany**; p. 487–511; 2003.

WANG M., ZHENG Q., SHEN Q. GUO S.; The Critical Role of Potassium in Plant Stress Response; **International Journal of Molecular Sciences**; p. 487 – 511; 2003.

HODGES D., DELONG J., FORNEY, C. PRANGE R. K.; Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds; **Planta** **207**; p.604–611; 1999.

NOCTOR G., FOYER CH. H.; ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control; **Physiol Plant Mol Biol**; p. 249-279; 1998.

HEATH R. L., PACKER L.; Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation; **Arch Biochem Biophys**; p. 189-198, 1968.

HAVAUX M., BRIGITTE K., AGNIESZKA S., RUMEAU D., FRANCK F., CAFFARRI S., TRIANTAPHYLIDES CH.; Vitamin B6 deficient plants display increased sensitivity to high light and photo-oxidative stress, **Plant Biology**, p.1-22, 2009.

DAI, J., MUMPER, R.; Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties; **Molecules**; p. 7313–7352, 2010.

APEL K., HIRT H.; Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, p. 373-399, 2004.

WEBER H., CHÉTELAT A., REYMOND P.; Selective and powerful stress gene expression in Arabidopsis in response to malondialdehyde, **The Plant Journal**, p. 877 – 888, 2004.

REYMOND P., WEBER H., DAMOND R. FARMER E. E.; Differential Gene Expression in Response to Mechanical Wounding and Insect Feeding in Arabidopsis, **The Plant Cell**, p.707–719, 2000.

BOYER J. S.; Recovery of Photosynthesis in Sunflower after a Period of Low Leaf Water Potential, **The Plant Physiology**, p. 816 – 820, 1971.

GILL S. S., TUTEJA N.; Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants; **Plant Physiology and Biochemistry**; p. 909-930, 2010.

FARMER E. E.; YONG-QIANG G., LENZONI G., WOLFENDER J.-L., WU Q.; Wound- and mechanostimulated electrical signals control hormone responses; **New Phytologist**; p. 14-13, 2020.

YIMENG L. V., MINGFANG X., SHIQING Z., BIXIA W., SHUNZHAO S., MINGYANG L., MA J.; CpCAF1 from *Chimonanthus praecox* Promotes Flowering and Low-Temperature Tolerance When Expressed in *Arabidopsis thaliana*; **International Journal of Molecular Sciences**; 2023.

PAVEL P., PRASAD A., RÁC M.; Mechanism of the Formation of Electronically Excited Species by Oxidative Metabolic Processes: Role of Reactive Oxygen Species; **Biomolecules**, 2019.

PRASAD A., MICHAELA S., BALUKOVA A., RÁC M., POSPÍŠIL P.; Reactive Oxygen Species as a Response to Wounding, In Vivo Imaging in *Arabidopsis thaliana*; **Plant Science**, 2019.

TIWARIA A., RÁC M., POSPÍŠIL P.; Formation of superoxide anion and carbon-centered radicals by photosystem II under high light and heat stress - EPR spin-trapping study; **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, 2013.

SUZUKI N., MITTLER R.; Reactive oxygen species-dependent wound responses in animals and plants; **Free radical Biology and medicine**; 2012.

DEL RIO D., STEWART A. J., PELLEGRINI N.; A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress; **Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases**, p. 316 - 328, 2005.

MANO J., BISWAS S., SUGIMOTO K.; Reactive Carbonyl Species: A Missing Link in ROS Signaling; **Plants**, 2019.

MORALES M., MUNNÉ-BOCH S., Malondialdehyde: Facts and Artifacts; **Plant Physiology**; p. 1346-1250, 2019.

CORDIANO R., DI GIOSCCHINIO M., MAGNIFISTA R., PANZERA C., GANGEMI S., MINCIULLO P.L. Malondialdehyde as a Potential Oxidative Stress Marker for Allergy-Oriented Diseases: An Update; **Molecules**, 2023.

JANERO D. R.; MALONDIALDEHYDE AND THIOBARBITURIC ACID-REACTIVITY AS DIAGNOSTIC INDICES OF LIPID PEROXIDATION AND PEROXIDATIVE TISSUE INJURY; **Free radical biology and Medicine**, p.515-540, 1990

SMIRNOFF M, WHEELER G. L.; Ascorbic Acid in Plants: Biosynthesis and Function; **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, p. 219-314, 2000.

CHOUDHRY F. K., RIVERO R. M., BLUMWALD E., MITTLER RN.; Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination, **The Plant Journal**, p. 856 - 867, 2016.

SAVATIN D. V., GRAMAGNA G., MODESTI V., CERVONE F.; Wounding in the plant tissue: the defense of a dangerous passage; **Frontiers in Plant Science**, p. 460, 2014.

NURNBERGER T., BRUNNER F., KEMMERLING B., PIATER L.; Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences; **Immunol. Rev**; p. 249-266, 2004.

MITHOFER A., EBEL J., FELLE H. H.; Cation fluxes cause plasma membrane depolarization involved in beta-glucan elicitor-signaling in soybean roots. **Mol. Plant Microbe Interact**; p. 983-990, 2005

STEPHENIE S., CHANG Y. P., GNANASEKARAN A., MOHD ESAN., GNANARAD CH.; An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement; **Journal of Functional food**; 2020.