

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Nikola Štěpánová

Sacharidy jako integrální součást antioxidačního systému rostlin

Saccharides as an integral part of plant antioxidative system

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Helena Lipavská, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. 5. 2017

Podpis

Poděkování

Chtěla bych moc poděkovat doc. RNDr. Heleně Lipavské, Ph.D. a RNDr. Haně Konrádové, Ph.D. za jejich cenné rady a připomínky, morální podporu a trpělivost, které mi věnovaly během psaní této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za podporu a trpělivost během celé doby mého bakalářského studia.

Abstrakt

Vznik reaktivních forem kyslíku (ROS) v rostlinách je nevyhnutelnou součástí aerobního buněčného metabolismu, během kterého vznikají jako vedlejší produkty základních metabolických drah. ROS se v rostlinách účastní více pochodů. Pokud je jejich hladina na běžné úrovni, slouží jako signální molekuly. Pokud je však rostlina vystavena stresu, hladina ROS se zvýší. Následkem toho může docházet k různým oxidativním poškozením buněčných komponent, ale také k aktivaci dalších signálních drah spojených s obranou proti oxidativnímu stresu. Rostliny se zvýšené hladině ROS brání různými způsoby. Buď se snaží hromadění ROS předcházet, nebo se snaží akumulované ROS zneškodnit. K zneškodnění používají dva efektivní antioxidantní systémy - enzymatický a neenzymatický. Hlavním předmětem této práce je zasazení sacharidů do kontextu neenzymatického antioxidantního systému rostlin a shrnutí dosud navržených mechanismů, kterými sacharidy přispívají ke zhášení ROS. Studium těchto mechanismů je důležité, protože oxidativní poškození způsobené nadměrnou produkcí ROS je považováno za významnou příčinu ztráty produktivity zemědělských plodin. Tyto ztráty se patrně ještě prohloubí důsledkem zvýšené stresové zátěže způsobené očekávanými klimatickými změnami.

Klíčová slova: antioxidanty, hydroxylový radikál, mechanismus zhášení, reaktivní formy kyslíku, sacharidy, stres

Abstract

The formation of reactive oxygen species (ROS) in plants is inevitable part of aerobic cellular metabolism, during which ROS are generated as by-products of basal metabolic pathways. ROS participate in many processes in plants. If the ROS are at normal level, they serve as signal molecules. Under stress, however, the ROS level in plants increases. High ROS accumulation can cause severe oxidative damage of cellular components, but simultaneously it activates other signal pathways controlling defence against oxidative stress. Plants protect themselves against increased level of ROS in different ways. Either they try to prevent increased level of ROS, or they try to detoxify them. Plants utilize for detoxification two efficient antioxidative systems - enzymatic and non-enzymatic ones. The main goal of this work is to put saccharides into context of plant non-enzymatic antioxidative system and summarize saccharides-based ROS scavenging mechanisms, which have been invented so far. Research on mechanisms of ROS scavenging is highly important, because oxidative damage through excessive production of ROS is considered to be significant cause of productivity losses in agricultural crops. These losses are likely to increase as a result of increased stress burden connected with expected climatic changes.

Key words: antioxidants, hydroxyl radical, mechanism of scavenging, reactive oxygen species, saccharides, stress

OBSAH

1. Úvod.....	1
2. Reaktivní formy kyslíku.....	2
2.1. Obecná charakteristika reaktivních forem kyslíku a jejich vznik.....	2
2.2. Charakteristika jednotlivých reaktivních forem kyslíku	2
2.2.1. Superoxid ($O_2^{\bullet-}$).....	2
2.2.2. Singletový kyslík (1O_2).....	3
2.2.3. Peroxid vodíku (H_2O_2).....	4
2.2.4. Hydroxylový radikál (OH^{\bullet}).....	4
3. Antioxidační systémy	5
3.1. Enzymatické antioxidační systémy	5
3.1.1. Superoxid dismutáza (SOD).....	5
3.1.2. Kataláza (CAT)	5
3.1.3. Askorbát peroxidáza (APX)	6
3.1.4. Guajakol peroxidáza (GPOX)	7
3.1.5. Glutation reduktáza (GR)	7
3.1.6. Monodehydroaskorbát reduktáza (MDHAR), Dehydroaskorbát reduktáza (DHAR)	7
3.1.7. Glutation S-transferáza (GST).....	8
3.1.8. Glutation peroxidáza (GPX).....	8
3.2. Neenzymatické antioxidační systémy	8
3.2.1. Kyselina askorbová (askorbát)	8
3.2.2. Glutation	9
3.2.3. Prolin	9
3.2.4. Tokoferol (vitamin E).....	10
3.2.5. Karotenoidy	10
3.2.6. Fenolické sloučeniny – Flavonoidy	11
3.2.7. Sacharidy	11
3.2.7.1. Mechanismy zhášení ROS sacharidy	13

3.2.7.1.1. Zhášení OH• vodíkovou abstrakcí.....	13
3.2.7.1.2. Zhášení OH• pomocí fruktanů.....	13
3.2.7.1.3. Zhášení OH• pomocí sukralózy.....	16
4. Závěr.....	18
5. Seznam použité literatury.....	19

Seznam použitých zkratek:

^1Chl – Chlorofyl v základním stavu

$^1\text{O}_2$ – Singletový kyslík

^3Chl – Chlorofyl v tripletním stavu

AsA – Kyselina askorbová (askorbát)

APX – Askorbát peroxidáza

CAT – Kataláza

DHA – Dehydroaskorbát

DHAR – Dehydroaskorbát reduktáza

FAD – Oxidovaný flavinadenindinukleotid

Fe^{2+} – Železnatý iont

Fe^{3+} – Železitý iont

FruCl_2 – 1,6-dichlor fruktóza

GalCl – 4-monochlor galaktóza

GolS – Galaktinolsyntáza

GPOX – Guajakol peroxidáza

GPX – Glutation peroxidáza

GR – Glutation reduktáza

GSH – Redukovaná forma glutationu

GSSG – Oxidovaná forma glutationu

GST – Glutation S-transferáza

H_2O_2 – Peroxid vodíku

$\text{HO}\cdot$ – Hydroxylový radikál

$\text{HO}_2\cdot$ – Hydroperoxyl

IAA – Kyselina indol-3-octová

MDHA – Monodehydroaskorbát

MDHAR – Monodehydroaskorbát reduktáza

NAD – Oxidovaný nikotinamidadenindinukleotid

NADH – Redukovaný nikotinamidadenindinukleotid

NADP^+ – Oxidovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát

NADPH – Redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát

$O_2^{\bullet-}$ – Superoxid

OH^{\bullet} – Hydroxidový iont

PSI – Fotosystém I

PSII – Fotosystém II

RafS – Rafinózasyntáza

RFO – Oligosacharidy rafinózové řady

RO^{\bullet} – Alkoxyl

ROO^{\bullet} – Peroxyl

ROS – Reaktivní formy kyslíku

SOD – Superoxid dismutáza

1. Úvod

Díky vyvíjejícím se fotosyntetizujícím organismům se asi před 2,7 biliony let začal molekulární kyslík hromadit v atmosféře Země. S touto změnou souvisí i vznik reaktivních forem kyslíku (Halliwell, 2006). Reaktivní formy kyslíku jsou reaktivní molekuly vznikající z molekulárního kyslíku. Zkratka ROS převzatá z angličtiny znamená „reactive oxygen species“. ROS lze rozdělit na 2 skupiny: radikály, které obsahují nepárový elektron, a neutrální (molekulové) formy (shrnutí v Karuppanapandian et al., 2011).

Za optimálních podmínek vznikají ROS (konkrétně superoxid, singletový kyslík, peroxid vodíku a hydroxylový radikál) v rostlinných buňkách jako vedlejší produkty buněčného aerobního metabolismu, při mitochondriální respiraci v mitochondriích (Moller, 2001), při fotosyntéze v chloroplastech (Asada, 1999), dále pak vznikají při fotorespiraci v peroxisomech (Bartoli et al., 2004) a podle novějších studií dochází k hromadění ROS také ve vakuole (Peshev et al., 2013). Během normálních podmínek prostředí, kdy je hladina ROS na určité, relativně nízké úrovni, slouží ROS jako důležité signální molekuly podílející se na regulaci mnoha fyziologických a vývojových procesů, jako je například buněčný cyklus, programovaná buněčná smrt, růst, diferenciaci, odpověď na biotický či abiotický stres nebo obrana proti patogenům. Z tohoto hlediska jsou ROS nepostradatelnou součástí kontrolních mechanismů rostlinných buněk (Pei et al., 2000, shrnutí v Mittler et al., 2011).

Rostliny jako přisedlé organismy jsou neustále vystavovány různým druhům abiotických a biotických stresů. Během stresového působení se zvyšuje hladina ROS, čímž dochází k porušení rovnováhy mezi vznikem ROS a jejich odstraněním. Zvýšená hladina ROS může způsobit v buňkách oxidativní poškození, které následně může vést až k buněčné smrti (Bowler et al., 1992, Foyer et al., 1994, Alscher et al., 1997, Shigeoka et al., 2002, Blokhina et al., 2003). Zda ROS budou plnit kontrolní či signální funkce nebo mít škodlivý efekt na buňku, závisí právě na oné rovnováze (Gratao et al., 2005). Aby rostliny dosáhly určité homeostáze, využívají dvě různé základní strategie. V první se snaží vyvarovat vzniku nadbytečných ROS a vytváří různá preventivní opatření, ve druhé, kdy už dochází ke zvýšení hladiny ROS, jde o snahu reaktivní formy detoxifikovat (Foyer and Noctor, 2005). K detoxifikaci dochází díky obranným antioxidačním systémům, které zahrnují enzymatické a neenzymatické systémy (shrnutí v Mittler, 2002).

Cílem této práce je shrnout dostupné literární údaje o ROS u vyšších rostlin, a to především podat přehled o jednotlivých formách ROS, stručně charakterizovat jednotlivé enzymatické antioxidační systémy a podrobněji charakterizovat jednotlivé neenzymatické antioxidační systémy se zaměřením na sacharidy a mechanismy, kterými zhášejí ROS.

2. Reaktivní formy kyslíku

2.1. Obecná charakteristika reaktivních forem kyslíku a jejich vznik

ROS vznikají z molekulárního kyslíku energetickým přenosem (singletový kyslík) nebo elektronovým přenosem (superoxid, peroxid vodíku, hydroxylový radikál) (Pospisil, 2016). Hlavním místem vzniku ROS v rostlinných buňkách jsou chloroplasty, mitochondrie a peroxisomy. ROS se ale také tvoří v menším množství v endoplazmatickém retikulu, plazmatické membráně, v oblasti buněčné stěny, apoplastu a k hromadění ROS dochází i ve vakuole. ROS mohou buňky ovlivňovat dvojnásobným způsobem. Za optimálních podmínek fungují jako signální molekuly podílející se na kontrole a regulaci různých fyziologických a vývojových procesů. Během stresu, kdy dochází ke zvýšení hladiny ROS, mohou v buňkách způsobovat různá oxidativní poškození, jako je poškození nukleových kyselin a sacharidů, oxidaci proteinů a peroxidaci lipidů (shrnutí v Das and Roychoudhury, 2014).

2.2. Charakteristika jednotlivých reaktivních forem kyslíku

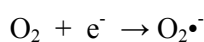
Reaktivní formy kyslíku lze rozdělit na dvě skupiny: volné radikály a neutrální formy (viz Tabulka 1).

Tabulka 1- přehled jednotlivých ROS

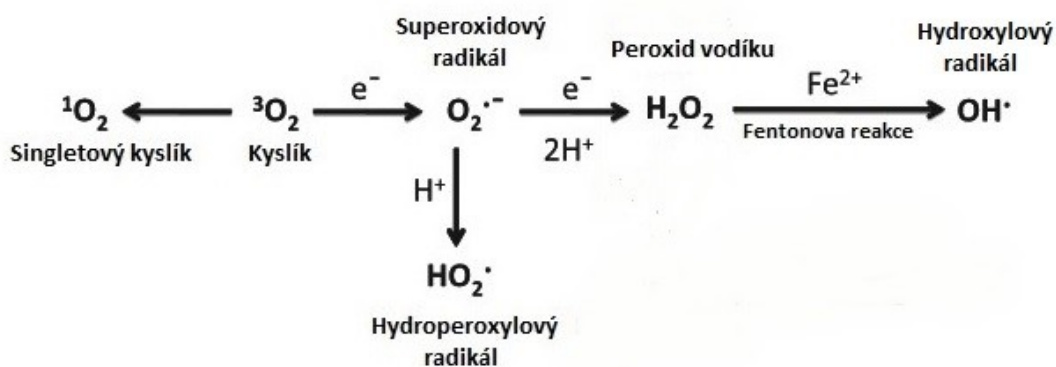
Volné radikály		Neutrální formy	
Superoxid	$O_2^{\bullet-}$	Peroxid vodíku	H_2O_2
Hydroxylový radikál	HO^{\bullet}	Singletový kyslík	1O_2
Peroxy	ROO^{\bullet}		
Alkoxy	RO^{\bullet}		
Hydroperoxy	HO_2^{\bullet}		

2.2.1. Superoxid ($O_2^{\bullet-}$)

$O_2^{\bullet-}$ je produkován především v chloroplastech, peroxisomech, mitochondriích a v oblasti buněčné stěny. Hlavním místem vzniku $O_2^{\bullet-}$ je primární akceptor elektronů fotosystému I (PSI) lokalizovaný na tylakoidní membráně. Dalším místem vzniku je respirační elektronový transportní řetězec mitochondrií. Tento středně reaktivní radikál má záporný náboj, jeden nepárový elektron a vzniká jednoelektronovým přenosem.



Přibližný poločas rozpadu $O_2^{\bullet-}$ je 2-4 μ s. Obvykle jde o první radikál, který vzniká elektronovým přenosem, a je tedy výchozí molekulou pro vznik dalších ROS, například 1O_2 , H_2O_2 , OH^{\bullet} (shrnutí v Gill and Tuteja, 2010). Je známo, že v rostlinných pletivech 1-2% spotřeby O_2 vede ke vzniku $O_2^{\bullet-}$ (Puntarulo et al., 1988). $O_2^{\bullet-}$ se může protonizovat na hydroperoxylový radikál (HO_2^{\bullet}), který přímo napadá nenasycené mastné kyseliny (viz Obrázek 1) (Bielski et al., 1983). Je známo, že dismutační reakci (dismutací) mohou být $O_2^{\bullet-}$ rychle přeměněny na H_2O_2 . Tato reakce může probíhat bez přítomnosti enzymů, tedy spontánně, nebo může být katalyzovaná superoxid dismutázou (SOD). Dismutace je reakce, kdy látka vykazuje jak oxidační, tak redukční vlastnosti při vzájemné reakci (Fridovich, 1972).



Obrázek 1 - Vznik ROS energetickým přenosem (singletový kyslík) a elektronovým přenosem (superoxid, peroxid vodíku, hydroxylový radikál) (upraveno dle Gill and Tuteja, 2010).

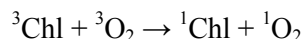
Navíc může $O_2^{\bullet-}$ poskytnout elektron železitému iontu (Fe^{3+}) za vzniku redukované formy (Fe^{2+}). Tato redukována forma železa může poté redukovat dismutací vzniklý H_2O_2 za vzniku OH^{\bullet} . Celý tento komplex reakcí, které vedou ke vzniku OH^{\bullet} , se nazývá Haber-Weissova reakce. Poslední reakce je označována jako Fentonova reakce, během níž dochází k produkci OH^{\bullet} rozkladem H_2O_2 za přítomnosti vhodných přechodových kovů, například železa (Walling, 1975).



2.2.2. Singletový kyslík (1O_2)

Singletový kyslík je první excitovaný stav kyslíku a velmi neobvyklá forma ROS, protože nevzniká elektronovým přenosem, ale excitací elektronů v molekule kyslíku spojenou se změnou

spinu jednoho z vnějších elektronů. Nejčastější reakce, při které $^1\text{O}_2$ vzniká, je interakce mezi chlorofylovými triplety (^3Chl) a základním stavem molekulárního kyslíku ($^3\text{O}_2$).



$^1\text{O}_2$ také může vznikat různými kontrolovanými chemickými reakcemi, které jsou důležité pro programovanou buněčnou smrt způsobenou infekcí patogenů (shrnutí v Gill and Tuteja, 2010). Životnost O_2 je přibližně 3 μs (Hatz et al., 2007). $^1\text{O}_2$ je oxidační činidlo pro široké množství biologických molekul, a může tak reagovat s proteiny, pigmenty, lipidy a nukleovými kyselinami (Wagner et al., 2004, Krieger-Liszkay et al., 2008). $^1\text{O}_2$ vzniklý během fotosyntézy může vážně poškodit fotosystém I a II (PSI a PSII) stejně tak jako ostatní části fotosyntetického aparátu (Gill and Tuteja, 2010). Rostliny dokáží efektivně zhasit $^1\text{O}_2$ pomocí prolinu, tokoferolu a β -karotenu (viz kapitola 3.2.3., 3.2.4., 3.2.5.) (Krieger-Liszkay et al., 2008).

2.2.3. Peroxid vodíku (H_2O_2)

Hlavním místem vzniku H_2O_2 jsou chloroplasty, peroxisomy, mitochondrie a oblast buněčných stěn. Peroxid vodíku vzniká jedoelektronovou redukcí $\text{O}_2\cdot^-$. Sám o sobě H_2O_2 není radikál. Jedná se o středně reaktivní molekulu s relativně dlouhým poločasem rozpadu (1 ms), zatímco ostatní ROS jako $\text{O}_2\cdot^-$, $^1\text{O}_2$, $\text{OH}\cdot$ mají poločas rozpadu 2-4 μs (Bhattacharjee, 2005). Jedná se tedy o relativně stabilní molekulu, z tohoto důvodu se může H_2O_2 šířit na velké vzdálenosti a případně může procházet skrze buněčné membrány (Bienert et al., 2007). Podobně jako další ROS, hraje H_2O_2 v rostlinných buňkách dvojí roli. Při svém nízkém obsahu funguje jako signální molekula zapojená v kontrole procesů vedoucích k toleranci proti různým druhům abiotických a biotických stresů. Při nadbytku H_2O_2 dochází ke vzniku oxidativního stresu a následné programované buněčné smrti (shrnutí v Quan et al., 2008). Dále se H_2O_2 v přítomnosti redukováných přechodových kovů podílí na vzniku nebezpečného $\text{OH}\cdot$ tzv. Fentonovou reakcí (viz kapitola 2.2.1., 2.2.4.) (Walling, 1975).

2.2.4. Hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$)

Nejreaktivnější a nejvíce nebezpečný známý ROS je hydroxylový radikál. V přítomnosti vhodných přechodových kovů mohou vzniknout $\text{OH}\cdot$ Fentonovou reakcí, kdy dochází k rozkladu H_2O_2 (viz kapitola 2.2.1.) (Walling, 1975). Tyto radikály neprochází skrze membrány a musí být zneškodněny v místě vzniku, protože okamžitě reagují s jakýmkoliv organickými molekulami, které se nachází v jejich blízkosti (Griffiths and Lunec, 1996). Problém je v tom, že rostlinné buňky nedisponují enzymatickými systémy, které by tyto nebezpečné reaktivní formy detoxifikovaly

(Gechev et al., 2006, Peshev et al., 2013). Proto ke zhášení OH• dochází pomocí jednoduchých organických sloučenin, například sacharidů (Peshev et al., 2013, Matros et al., 2015).

3. Antioxidační systémy

Jako ochranu před oxidativním poškozením si rostliny vyvinuly antioxidační systémy, které zneškodňují nebezpečné ROS v různých buněčných kompartmentech. Antioxidační systémy lze rozdělit na enzymatické a neenzymatické (Mittler, 2002).

3.1. Enzymatické antioxidační systémy

Mezi hlavní enzymatické antioxidační systémy patří superoxid dismutáza (SOD), kataláza (CAT), askorbát peroxidáza (APX), guajakol peroxidáza (GPOX), glutation reduktáza (GR), monodehydroaskorbát reduktáza (MDHAR), dehydroaskorbát reduktáza (DHAR), glutation S-transferáza (GST) a glutation peroxidáza (GPX).

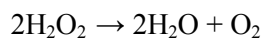
3.1.1. Superoxid dismutáza (SOD)

SOD patřící do skupiny metaloenzymů se považuje za nejefektivnější intracelulární enzymatický antioxidační systém. Vyskytuje se ve všech aerobních organismech a je lokalizována v různých subcelulárních kompartmentech (chloroplast, peroxisom, mitochondrie, cytosol) (Alscher et al., 2002, Fridovich, 1972). SOD katalyzuje dismutaci $O_2^{\bullet-}$ za vzniku H_2O_2 a O_2 . Odstraňuje tedy škodlivý superoxidový radikál (Fridovich, 1972).



3.1.2. Kataláza (CAT)

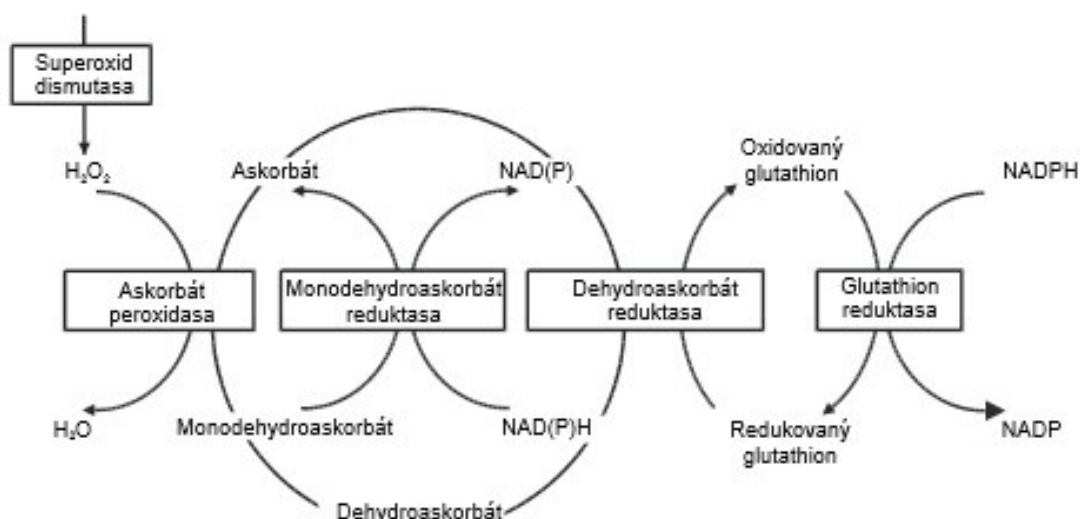
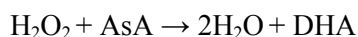
CAT je tetramerní enzym obsahující prostetickou skupinu hem (Loew, 1901, převzato z Anjum et al., 2016). Tento enzym se vyskytuje ve všech aerobních eukaryotech. Jeho funkce je odstraňovat z peroxisomů H_2O_2 , který zde vzniká při β -oxidaci mastných kyselin, fotorespiraci a během katabolismu purinů (shrnutí v Deisseroth and Dounce, 1970). Katalyzuje tedy dismutaci H_2O_2 na H_2O a O_2 (Loew, 1901, převzato z Anjum et al., 2016).



CAT je lokalizována především v peroxisomech, ovšem byla prokázána její přítomnost i v mitochondriích (Anjum et al., 2016).

3.1.3. Askorbát peroxidáza (APX)

APX obsahuje stejně tak jako CAT prostetickou skupinu hem, ovšem APX má vyšší afinitu k H_2O_2 než CAT. APX hraje nepostradatelnou roli v ochraně buněk proti oxidativnímu poškození a zhášení ROS ve vyšších rostlinách, řasách a dalších organismech (Kelly and Latzko, 1979). Zatímco CAT odstraňuje H_2O_2 z peroxisomů, APX odstraňuje H_2O_2 především z chloroplastů, mitochondrií a cytosolu rostlinných buněk za vzniku H_2O a monodehydroaskorbátu (MDHA), který pokud není redukován zpět na askorbát (AsA), následně disproportionací poskytuje askorbát a dehydroaskorbát (DHA) (shrnuto v Asada, 1999). Tyto reakce jsou součástí askorbát-glutationového cyklu, což je komplex reakcí, kde dochází k oxidaci askorbátu a při jeho následné regeneraci dochází k oxidaci glutathionu (GSH). Celý cyklus je katalyzován několika enzymy (APX, MDHAR, DHAR, GR) a je závislý na přítomnosti NADPH. Jako donor elektronů pro APX slouží askorbát (viz Obrázek 2) (Foyer and Halliwell, 1976, shrnuto v Asada, 1999).

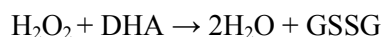


Obrázek 2 - Askorbát-glutationový cyklus (převzato z Piterkova et al., 2005) Askorbát peroxidáza (APX) odstraňuje H_2O_2 za vzniku H_2O a monodehydroaskorbátu (MDHA). Pokud není monodehydroaskorbát redukován zpět na askorbát (AsA) pomocí monodehydroaskorbát reduktázy (MDHAR) (využívající NAD(P)H), dochází k následné disproportionaci monodehydroaskorbátu na askorbát a dehydroaskorbát (DHA). Dehydroaskorbát je zpětně přeměněn na askorbát pomocí dehydroaskorbát reduktázy (DHAR). Při této reakci je redukován glutathion (GSH) oxidován a vzniká jeho oxidovaná forma (GSSG). Glutathion je obnoven pomocí glutathion reduktázy (GR) v NADPH-závislé reakci.

V rostlinách se vyskytují 4 základní izoformy APX: cytosolická, mitochondriální, peroxisomální a glyoxysomální a chloroplastová. Všechny tyto izoformy se podílejí na zhášení H_2O_2 , který nepřetržitě vzniká během buněčného metabolismu (Miyake and Asada, 1996).

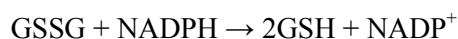
3.1.4. Guajakol peroxidáza (GPOX)

GPOX je enzym obsahující prostetickou skupinu hem. Tento enzym zbavuje buňku nadbytku H_2O_2 , který je produkován za normálních podmínek i během stresu. Také má důležitou roli při biosyntéze ligninu. Výrazný vliv na hormonální rovnováhu má tím, že rozkládá kyselinu indol-3-octovou (IAA). GPOX preferuje aromatické donory elektronů jako guajakol a pyrogallol (Welinder et al., 1992, shrnuto v Almagro et al., 2009).



3.1.5. Glutation reduktáza (GR)

GR je flavoprotein oxidoreduktáza, která byla nalezena jak v prokaryotech, tak v eukaryotech. Tento enzym je lokalizován především v chloroplastech, ale jeho malé množství se také vyskytuje v cytosolu, mitochondriích a peroxisomech (Edwards et al., 1990, Romero-Puertas et al., 2006). GR je součástí askorbát-glutationového cyklu, který je důležitý pro zneškodnění ROS (viz Obrázek 2). GR katalyzuje NADPH-závislou reakci disulfidické vazby GSSG (oxidované formy glutationu), a je tedy důležitá pro dosažení redukovaného stavu glutationu (Akerboom et al., 1982).

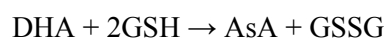


3.1.6. Monodehydroaskorbát reduktáza (MDHAR), Dehydroaskorbát reduktáza (DHAR)

Existují 2 enzymy, které jsou zapojené v regeneraci askorbátu, monodehydroaskorbát reduktáza a dehydroaskorbát reduktáza. MDHAR je flavin adenin dinukleotidový (FAD) enzym přítomný v chloroplastech a cytosolu, kde dokáže zhasit H_2O_2 (Asada, 1999, del Rio et al., 2002). MDHAR využívá jako elektronový donor NADH.

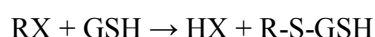


DHAR regeneruje askorbát z jeho oxidovaného stavu na redukovaný stav a slouží jako důležitý regulátor recyklace askorbátu. Zvýšení exprese DHAR zvyšuje toleranci rostlin vůči různým druhům abiotických stresů (Asada, 1999).



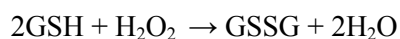
3.1.7. Glutation S-transferáza (GST)

Rostlinná skupina GST je velmi široká a různorodá skupina intracelulárních enzymů, které katalyzují konjugaci nebezpečných elektrofilních xenobiotických subtrátů (RX) s tripeptidem glutationem (Marrs, 1996). Tyto enzymy mají funkci v detoxifikaci herbicidů, hormonální homeostázi, vakuolární sekvestraci antokyanů, metabolismu tyrosinu, detoxifikaci hydroperoxidů, regulaci apoptózy a v rostlinných odpovědích na stres (shrnutí v Edwards et al., 2000).



3.1.8. Glutation peroxidáza (GPX)

GPX je velká skupina různorodých izoenzymů používající glutation k redukci H_2O_2 , také detoxifikují produkty lipidové peroxidace, a tím tedy pomáhají buňkám s ochranou proti oxidativnímu stresu. GPX rozkládá H_2O_2 na H_2O a zároveň oxiduje GSH (Ahmad et al., 2008).



3.2. Neenzymatické antioxidační systémy

Další část této práce se věnuje neenzymatickým antioxidačním systémům, mezi které patří kyselina askorbová, glutation, prolin, α -tokoferol, karotenoidy, fenolické sloučeniny - např. flavonoidy a v neposlední řadě i sacharidy, které jsou hlavním předmětem této práce.

3.2.1. Kyselina askorbová (askorbát)

Nejhojnější a nejsilnější antioxidant rozpustný ve vodě, který zabraňuje vzniku ROS nebo minimalizuje poškození způsobené ROS v rostlinách, je kyselina askorbová (Conklin et al., 1996). Vyskytuje se v cytosolu, chloroplastech, mitochondriích, vakuole a oblasti buněčné stěny (Rautenkranz et al., 1994), je přítomná ve všech rostlinných pletivech, ve vyšších koncentracích ve fotosyntetizujících buňkách, některých plodech a zásobních orgánech (Fukuda et al., 1995, Horemans

et al., 2000). Za normálních fyziologických podmínek se v chloroplastech kyselina askorbová vyskytuje většinou v redukované formě (Foyer and Halliwell, 1976). Kyselina askorbová je považována za nejsilnější zhášec ROS ve vodním prostředí díky své schopnosti odevzdat elektrony v mnoha enzymatických i neenzymatických reakcích (Horemans et al., 1994). Kyselina askorbová může přímo zhášet $O_2^{\bullet-}$, 1O_2 , OH^{\bullet} . Dále se může podílet na ochraně membrán díky schopnosti regenerace α -tokoferolu z tokoperoxylového radikálu (Conklin et al., 1996). Kyselina askorbová může sloužit jako substrát pro askorbát peroxidázu v askorbát-glutationovém cyklu (viz Obrázek 2, kapitola 3.1.3.) (Foyer and Halliwell, 1976). V chloroplastech může kyselina askorbová působit jako kofaktor violaxantin de-epoxidázy, kde takto přispívá k rozptylu nadbytečné excitační energie a předchází oxidativnímu poškození (Neubauer and Yamamoto, 1994).

3.2.2. Glutathion

Dále do skupiny látek s antioxidačními účinky patří glutathion, což je tripeptid skládající se ze zbytků kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu, obsahující thiolovou (-SH) skupinu. Jde o jeden z nejdůležitějších metabolitů podílejících se na ochraně buněk proti nebezpečným ROS (Alscher, 1989). Glutathion se vyskytuje buď v redukované formě (GSH) s volnou thiolovou skupinou nebo v oxidované formě (GSSG) s disulfidickou vazbou mezi dvěma identickými molekulami. Rovnováha mezi GSH a GSSG je důležitá pro regulaci redoxního stavu v buňce (Halliwell and Foyer, 1978). V rostlinných pletivech se častěji vyskytuje v redukované formě, je lokalizován v cytosolu, endoplazmatickém retikulu, vakuole, mitochondriích, chloroplastech, peroxisomech a v apoplastu (Jimenez et al., 1998). Glutathion hraje důležitou roli v antioxidační obraně díky své schopnosti regenerovat jiné ve vodě rozpustné antioxidanty, jako například kyselinu askorbovou skrze askorbát-glutathionový cyklus, který je důležitý pro odstraňování nadbytku H_2O_2 (viz Obrázek 2, viz kapitola 3.1.3.) (Foyer and Halliwell, 1976). Glutathion je potenciální zhášec 1O_2 , H_2O_2 , OH^{\bullet} (Noctor et al., 1998). Glutathion je také prekurzorem fytochelatinů, které jsou důležité pro kontrolu obsahu těžkých kovů v buňce (Grill et al., 1987).

3.2.3. Prolin

Prolin je aminokyselina, která se díky mnoha mechanismům podílí na ochraně buněk proti stresu. Funguje v buňce jako osmoprotektant vyrovnávající turgorový tlak během stresu (Csonka, 1989). Prolin je považován za silný antioxidant fungující jako efektivní zhášec ROS, konkrétně OH^{\bullet} (Floyd and Zs Nagy, 1984) a 1O_2 (Alia et al., 1997). V rostlinách dokáže prolin potlačit produkci 1O_2 , který vzniká v tylakoidech (Alia et al., 1997). Ke zhášení 1O_2 dochází pomocí pětičlenného kruhu prolinu, pyrolidinu. Pyrolidin má nízký ionizační potenciál a tím dokáže zhasit 1O_2 pomocí

mechanismu přenosu nábojů, kterým se kyslík vrací do základního molekulárního stavu (Young et al., 1973, Clennan et al., 1989). Prolin se podílí na udržení intracelulární redoxní homeostáze, udržuje poměr NADP⁺/NADPH hladin (Phang, 1985) a také GSH/GSSG (Hoque et al., 2008). V neposlední řadě prolin funguje jako signální molekula podílející se na kontrole a regulaci programované buněčné smrti, růstu a diferenciaci (shrnutu v Liang et al., 2013).

3.2.4. Tokoferol (vitamin E)

Tokoferoly jsou v tucích rozpustné antioxidanty a nezbytné složky všech biologických membrán. Z čehož vyplývá, že jsou součástí tylakoidních membrán chloroplastů rostlin, kde se podílí na jejich ochraně (Kiffin et al., 2006). V rostlinách byly nalezeny 4 izomery tokoferolů (α -, β -, γ -, δ -). Největší antioxidační aktivitu vykazoval α -tokoferol díky přítomnosti 3 methylových skupin ve své molekule (KamalEldin and Appelqvist, 1996). Tokoferoly jsou považovány za zhášče ROS, konkrétně $^1\text{O}_2$. Tokoferoly jsou známy tím, že chrání lipidy a další složky chloroplastových membrán vyšších rostlin, především ochraňují strukturu a funkci PSII (Igamberdiev et al., 2004). Dále jsou považovány za zhášče lipidových radikálů, protože jsou schopny opravit oxidující radikály, a tím brání řetězové reakci během lipidové autooxidace. α -tokoferol reaguje s lipidovými radikály, které jsou odvozené od nenasycených mastných kyselin. Reakce mezi α -tokoferolem a lipidovými radikály nastane na povrchu membrány, kde α -tokoferol odevzdá atom vodíku lipidovému radikálu. Vzniklý tokoperoxylový radikál může být následně recyklován zpět na α -tokoferol díky reakci s askorbátem nebo jiným antioxidantem (Igamberdiev et al., 2004).

3.2.5. Karotenoidy

Karotenoidy jsou v tucích rozpustné antioxidanty nacházející se v plastidech fotosyntetizujících i nefotosyntetizujících rostlinných pletiv. První jejich důležitou funkcí je absorpce záření v rozmezí od 400 nm do 550 nm a následný přenos zachycené energie na chlorofyl (Gill and Tuteja, 2010). Dále jsou karotenoidy důležité pro sestavení PSI, stabilitu světelného komplexu proteinů a navíc i pro stabilizaci tylakoidní membrány (Niyogi et al., 2001). Další funkcí je ochrana fotosyntetického aparátu zhášením tripletních excitovaných stavů chlorofylu (^3Chl) a dalších škodlivých radikálů (Burton and Ingold, 1984). Karotenoidy dokáží v rámci fotosyntetického aparátu zhášet i $^1\text{O}_2$ (Foote and Denny, 1968). Ke zhášení $^1\text{O}_2$ dochází pomocí lykopenu, což je analog β -karotenu a nejefektivnější zhášec mezi karotenoidy díky nejvyšší rychlostní konstantě reakce (Di Mascio et al., 1989).

3.2.6. Fenolické sloučeniny

Fenolické sloučeniny jsou tvořeny aromatickým kruhem, na kterém je navázána minimálně jedna hydroxylová funkční skupina. Jedná se o sekundární metabolity vyskytující se hojně v rostlinných pletivech. Mezi fenolické sloučeniny patří mimo jiné flavonoidy, taniny a lignin, které mohou fungovat jako antioxidanty zhašející ROS (Blokhina et al., 2003, Karuppanapandian et al., 2011).

Flavonoidy

Flavonoidy se běžně vyskytují na různých rostlinných částech, nejčastěji v listech, květech a pylu. K hromadění flavonoidů dochází ve vakuolách, kde se vyskytují jako příslušné glykosidy. (Gill and Tuteja, 2010). Flavonoidy lze rozdělit na flavonoly, flavony, izoflavony a antokyany. Flavonoidy patří mezi nejvíce bioaktivní sekundární metabolity. V porovnání s kyselinou askorbovou a α -tokoferolem je většina flavonoidů lepšími antioxidanty (Hernandez et al., 2009). Flavonoidy dokáží snížit tekutost membrán a tím bránit difúzi radikálů skrze membrány (Arora et al., 2000).

3.2.7. Sacharidy

Během stresu mohou rozpustné sacharidy přispívat k osmotickému vyrovnání a rovněž i ke stabilizaci proteinů a membrán (Tarczynski et al., 1993, Hinch a et al., 2003). Malé rozpustné sacharidy jsou společně s hormony součástí rostlinné signální sítě podílející se na regulaci obranných odpovědí vůči stresu (Rolland et al., 2006). Jako o zhašecích ROS s prokazatelnými antioxidačními vlastnostmi se o rozpustných sacharidech uvažovalo už dříve (Smirnov and Cumbes, 1989, Morelli et al., 2003), ovšem až teprve nedávno se rozpustné sacharidy začaly považovat za plnohodnotnou součást neenzymatického antioxidačního systému, protože se objevily studie týkající se identifikace mechanismů zhašení ROS (Peshev et al., 2013, Matros et al., 2015). Mezi hlavní sacharidy podílející se na regulaci zvýšené hladiny ROS se řadí monosacharidy (glukóza, fruktóza (Van den Ende and Valluru, 2009)), disacharidy (sacharóza (Smirnov and Cumbes, 1989, Morelli et al., 2003), maltóza (Morelli et al., 2003), trehalóza (Stoyanova et al., 2011)), dále oligosacharidy (rafinóza), oligosacharidy rafinózové řady (RFO) (Nishizawa et al., 2008, Schneider and Keller, 2009), k nimž volně zařadíme i galaktinol (Nishizawa et al., 2008), což je prekurzor RFO. Další sacharidy podílející se na regulaci zvýšené hladiny ROS jsou fruktany (Peshev et al., 2013) a cukerné alkoholy (manitol, sorbitol, myo-inozitol (Smirnov and Cumbes, 1989)).

Existuje mnoho studií, které zkoumají neenzymatické antioxidační schopnosti *in vitro* u výše vyjmenovaných sacharidů. Ovšem jednotlivé studie jsou provedeny na různých úrovních zkoumání, což neumožňuje objektivní srovnání jednotlivých poznatků. Jednou z prvních studií zabývajících se problémem sacharidů jako zhašečů ROS je studie Smirnov and Cumbes (1989). Tato studie testovala

schopnost roztoků cukerných alkoholů a sacharózy zhášet $\text{OH}\cdot$ *in vitro*. Sacharóza vykazovala silné antioxidační vlastnosti a byla efektivním zhášecem $\text{OH}\cdot$. V této studii bylo zjištěno, že cukerné alkoholy jako manitol, sorbitol a myo-inozitol jsou také efektivními zhášeci $\text{OH}\cdot$ (Smirnov and Cumbes, 1989).

Další ze starších studií zabývající se touto problematikou je studie Morelli et al., (2003), která se zabývala antioxidačními vlastnostmi některých rozpustných sacharidů a hodnocením poškození těchto sacharidů po reakci s $\text{OH}\cdot$. Studie potvrdila antioxidační vlastnosti sacharózy, které byly prokázány už dříve (Smirnov and Cumbes, 1989). Dále prokázala, že maltóza umí zhášet $\text{OH}\cdot$ (Morelli et al., 2003).

Na základě další provedené studie *in vitro* je předpokládána funkce galaktinolu a rafinózy jako zhášeců $\text{OH}\cdot$. V transgenních rostlinách vysoká intracelulární hladina galaktinolu a rafinózy souvisela se vzrůstající tolerancí k ošetření methylviologinem (herbucid), zasolení nebo stresu způsobenému chladem. Existuje zde tedy možnost, že galaktinol a rafinóza zhášejí $\text{OH}\cdot$, a tím chrání rostlinné buňky před oxidativním poškozením (Nishizawa et al., 2008).

Další rozsáhlá studie probíhající *in vitro* prokázala, že inulin je velmi efektivní zhášec $\text{OH}\cdot$ a $\text{O}_2\cdot^-$, stejně tak i trehalóza a sacharóza. Mezi další testované sacharidy patřila rafinóza a manitol, u nichž bylo také zjištěno, že jsou efektivními zhášeci $\text{OH}\cdot$. (Stoyanova et al., 2011).

Další studie, které se budu věnovat podrobněji, se zabývá problémem ochrany klíčové a přitom výrazně ohrožené buněčné organely - chloroplastu (Schneider and Keller, 2009). V chloroplastech se vyskytuje řada rozpustných sacharidů, které mají potenciál podílet se na jejich ochraně před oxidativním poškozením. Mezi sacharidy vyskytující se v chloroplastech patří například manitol, myo-inozitol (Bohnert et al., 1995), dále sacharóza a rafinóza. Výše uvedená studie navrhuje roli RFO jako součást chloroplastového antioxidačního systému (Schneider and Keller, 2009). Já se v této části zaměřím na rafinózu, což je trisacharid složený z galaktózy, glukózy a fruktózy patřící mezi oligosacharidy rafinózové řady (RFO). K syntéze rafinózy je potřeba galaktinol, který se syntetizuje pomocí galaktinolsyntázy (Gals). Dále je potřeba sacharóza, na kterou se následným přidáváním pomocí rafinózasyntázy (RafS) naváží galaktózové jednotky pocházející z galaktinolu (Lehle and Tanner, 1973). Díky kompartimentační analýze byla prokázána přítomnost rafinózy v chloroplastech rostlin špenátu (*Spinacia oleracea* L.), zběhovce (*Ajuga reptans* L.) a huseníčku (*Arabidopsis thaliana* L.), které byly vystavené chladu. Nicméně enzymy potřebné pro syntézu rafinózy, galaktinolsyntáza a rafinózasyntáza, byly nalezeny mimo chloroplast. Nyní je na místě položit si otázku, jakým mechanismem se rafinóza dostane do chloroplastu. Experimenty provedené na izolovaných chloroplastech zběhovce a huseníčku poskytly první důkaz, že rafinóza je skutečně transportována dovnitř chloroplastu pomocí transportéru, který se nachází na chloroplastové membráně (Schneider and Keller, 2009). Z čehož lze usoudit, že transport rafinózy do chloroplastu

skrže transportér lze považovat za součást obranného mechanismu rostliny, protože rafinóza transportovaná do chloroplastu se následně podílí na ochraně této organely proti oxidativnímu poškození.

U rozpustných sacharidů byly tedy opakovaně prokázány antioxidační vlastnosti poukazující na jejich možnou roli zhášečů ROS. Nicméně studie byly téměř výhradně prováděny v umělých systémech *in vitro*. Je tedy otázkou, zda by sacharidy prokazovaly antioxidační vlastnosti i *in vivo*.

3.2.7.1. Mechanismy zhášení ROS sacharidy

Studii o mechanismech zhášení ROS sacharidy existuje velmi málo. Všechny studie, které zde uvádím, se týkají zhášení OH• a jsou provedeny na různých úrovních zkoumání. Myslím si, že je třeba toto téma v budoucnosti více prozkoumat.

3.2.7.1.1. Zhášení OH• vodíkovou abstrakcí

Podle teoretické studie Hernandez-Marin, Martínez, (2012) sacharidy zháší OH• pomocí mechanismu přenosu atomu vodíku (vodíkovou abstrakcí). Během tohoto přenosu dochází přednostně k reakci mezi vodíkem vázaným na ten atom uhlíku, kde je nižší hodnota vazebné disociační energie, a následně dochází ke vzniku na uhlíku lokalizovaného radikálu a vody. Nicméně je možná i reakce mezi vodíkovým atomem a kyslíkem. Zpočátku byly navrženy další dva mechanismy: elektronový přenos a radikálová adice. Nakonec byly ale tyto dva další mechanismy na základě výpočtů zavrhnuty, protože bylo potvrzeno, že se neuskuteční (Hernandez-Marin and Martinez, 2012).

3.2.7.1.2. Zhášení OH• pomocí fruktanů

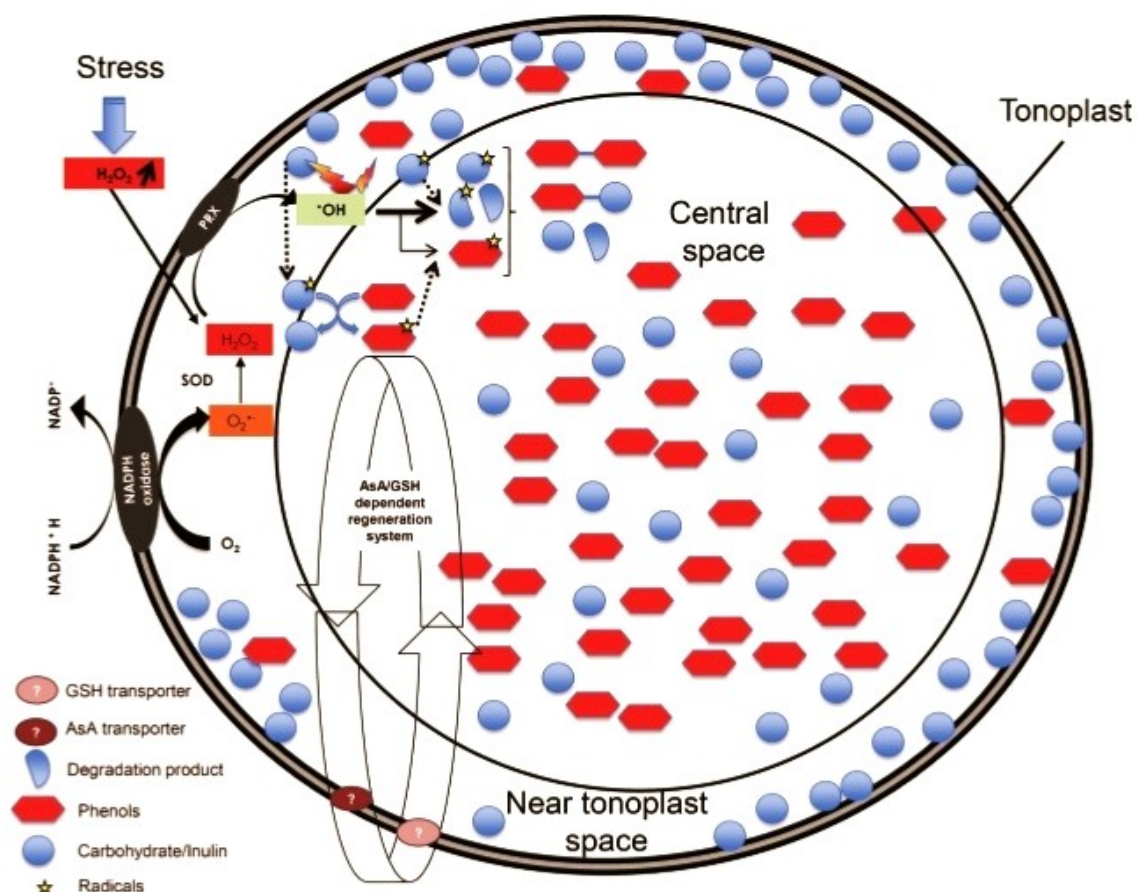
Role vakuoly během oxidativního stresu byla donedávna ve většině studií, až na některé výjimky, zanedbávána. Vzhledem ke svojí velikosti je vakuola významnou strukturou v rostlinných buňkách, zaujímá často více než 95% veškerého buněčného objemu. Teprve nedávno byla vakuola navržena jako součást buněčného antioxidačního systému (Peshev et al., 2013, Van den Ende and Valluru, 2009). S tím souvisí propojení a vzájemná spolupráce sacharidů a sloučenin od nich odvozených (například fruktanů) s vakuolárními fenolickými sloučeninami (Peshev et al., 2013).

Peshev et al. (2013) navrhuje nový hypotetický model, který se zabývá vakuolárními antioxidačními mechanismy a klade důraz na zhášení OH• pomocí fruktanů ve vakuole. Jak již bylo řečeno, OH• jsou extrémně reaktivní formy kyslíku a okamžitě reagují téměř se všemi biomolekulami.

K zneškodnění těchto radikálů dochází pomocí jednoduchých organických sloučenin, například sacharidů (viz kapitola 2.2.4.).

Studie Peshev et al. (2013) popisuje zhášení $\text{OH}\cdot$ pomocí fruktanů následovně. Ve vakuole rozeznáváme 2 základní oblasti: 1. oblast v blízkosti tonoplastu a 2. oblast centrální vakuolární lumen (viz Obrázek 3). Fruktany i fenolické sloučeniny jsou považovány především za vakuolární sloučeniny. Fruktany se vyskytují ve vyšších koncentracích v blízkosti tonoplastu, zatímco fenolické sloučeniny převládají v centrální části vakuolárního lumen. Během stresu se do vakuoly pomocí prosté nebo usnadněné (využívající aquaporiny) difúze může dostat H_2O_2 vznikající v cytosolu (Bienert et al., 2007). Navíc může být v tonoplastu NADPH oxidázou (využívající cytosolický NADPH) produkován $\text{O}_2\cdot^-$, který může být pomocí superoxid dismutázy (SOD) přeměněn na vakuolární H_2O_2 . Ve vakuolách existují vakuolární peroxidázy III. třídy, které jsou spojené s vnitřní stranou tonoplastu a jejichž substrát je H_2O_2 (Costa et al., 2008). Tyto peroxidázy mohou produkovat nebezpečný $\text{OH}\cdot$, který reaguje s fruktany za vzniku nových sacharidových radikálů. Mezi fruktany se řadí například inulin, který je vnořen hluboko v tonoplastu a tím je v ideální pozici pro reakci s $\text{OH}\cdot$. Takto vzniklé sacharidové radikály jsou dále rozštěpeny na méně nebezpečné radikály a na neradikální sloučeniny, které mají sklon difundovat z blízkosti tonoplastu do centrální vakuolární lumen. V centrální lumen dochází k recyklaci sacharidových radikálů na sacharidy nebo k různým rekombinačním reakcím, které mají za následek vznik cukr-fenolických sloučenin, neutrálních sacharidů s vyšším stupněm polymerace nebo fenolických látek (Peshev et al., 2013).

Dále se spekuluje o tom, že oxidované fenolické sloučeniny by mohly být redukovány askorbátem (AsA) nebo glutationem (GSH), které jsou součástí vakuolárního antioxidačního systému (Peshev et al., 2013). Je známo, že GSH se může hromadit ve vakuole, která je vystavena stresu (Queval et al., 2011). Dále byl nalezen AsA ve vakuolách *Arabidopsis thaliana* a v *Nicotiana tabacum*, ovšem v nižších koncentracích než v jiných organelách. Největší nárůst množství AsA ve vakuole byl pozorován následkem nadměrné ozáření (Zechmann et al., 2011). Nicméně propojení mezi vakuolou a zbytkem buněčné antioxidační sítě pomocí transportérů AsA a GSH není dostatečně prozkoumáno, a je tedy potřeba tomu věnovat větší pozornost. Také zůstává otázkou, zda sacharidy mohou s $\text{OH}\cdot$ reagovat ve vakuole i v systémech *in vivo*.



Obrázek 3 - Zhášení $\text{OH}\cdot$ pomocí fruktanů ve vakuole (převzato z Peshev et al., 2013). Ve vakuole existují 2 oblasti: 1. oblast v blízkosti tonoplastu, kde se vyskytují především fruktany, mezi které se řadí například inulin a 2. oblast centrální vakuolární lumen, kde převládají fenolické sloučeniny. Během stresu se do vakuoly může dostat H_2O_2 z cytosolu. V tonoplastu může být NADPH oxidázou produkován $\text{O}_2\cdot^-$, který může být následně pomocí superoxid dismutázy (SOD) přeměněn na vakuolární H_2O_2 . Ve vakuolách existují vakuolární peroxidázy III. třídy (PRX), jejichž substrát je H_2O_2 a mohou produkovat $\text{OH}\cdot$. Inulin, patřící mezi fruktany, je vložen hluboko v tonoplastu a tím je v ideální pozici pro reakci s $\text{OH}\cdot$. Reakcí fruktanů (inulinu) s $\text{OH}\cdot$ dochází ke vzniku sacharidových radikálů, které jsou dále rozštěpeny na méně nebezpečné radikály a na neradikální sloučeniny, které mají sklon difundovat z blízkosti tonoplastu do centrální vakuolární lumen. Tam dochází k recyklaci sacharidových radikálů na sacharidy nebo k různým rekombinačním reakcím, které mají za následek vznik cukr-fenolických sloučenin nebo neutrálních sacharidů s vyšším stupněm polymerace. Oxidované fenolické sloučeniny by mohly být redukovány askorbátem nebo glutationem.

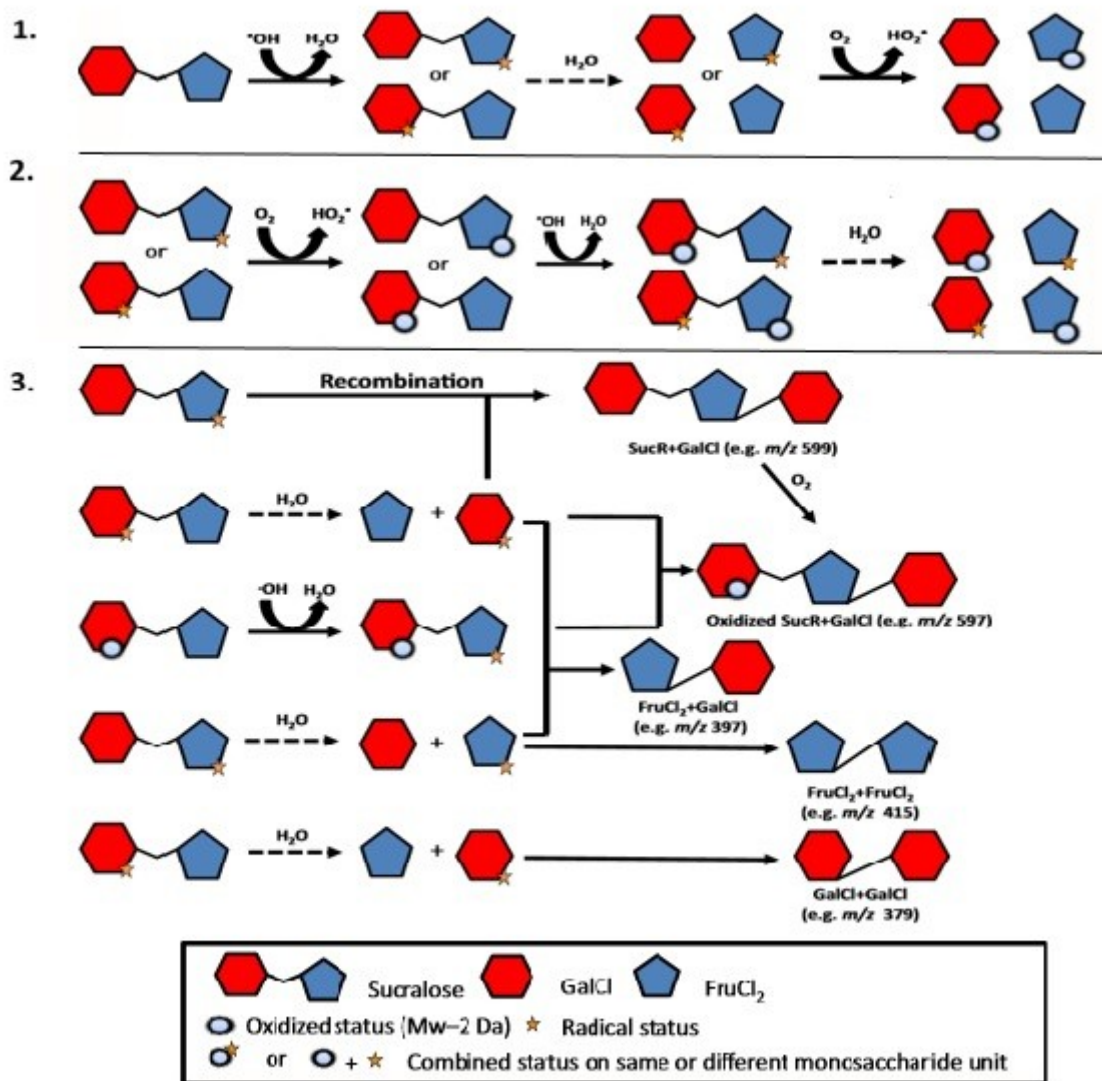
3.2.7.1.3. Zhášení OH• pomocí sukralózy

Další studie zabývající se mechanismem zhášení ROS pomocí sacharidů je studie Matros et al. (2015), kde byl zkoumán mechanismus reakce sukralózy s OH•. Sukralóza je umělý analog sacharózy skládající se z 4-monochlor galaktózy (GalCl), která je spojena s 1,6-dichlor fruktózou (FruCl₂). Sukralóza byla v tomto případě použita proto, že ji buňky nedokáží metabolizovat, tím pádem je snadněji dohledatelná v organismu. Ostatní sacharidy buňky metabolizují a jejich produkty reakcí jsou součástí normálního buněčného metabolismu, takže nelze rozeznat, jakou reakcí produkt vznikl. Předpokládáme tedy, že rozpadové a rekombinační produkty sukralózy vznikají na základě neenzymatických reakcí radikálů, protože buňky nedokáží sukralózu metabolizovat. Podle teoretické studie Hernandez-Marin, Martínez (2012) sacharidy zhášejí OH• pomocí mechanismu přenosu atomu vodíku (vodíkovou abstrakcí), čímž dojde ke vzniku na uhlíku lokalizovaného radikálu a vody. Očekává se tedy, že se uplatňuje podobný mechanismus i se zhášením OH• pomocí sukralózy (Matros et al., 2015), tak jako ve studii Peshev et al., (2013).

K prostudování sacharidů jako pravých zhášečů *in vivo*, bylo nutno nejprve provést Fentonovu reakci se sukralózou *in vitro*. Takto vzniklé produkty reakce sukralózy s OH• byly zkoumány pomocí hmotnostní spektrometrie. Na základě studie Peshev et al., (2013) a literárních dat byly předpovězeny struktury vzniklých sukralózových produktů a jejich molekulární hmotnosti. Lze tedy očekávat, že OH• odebere vodíkový atom ze sukralózy, čímž dojde ke vzniku H₂O a sukralózového radikálu. Tento sukralózový radikál může být oxidován buďto předtím než dojde k jeho rozštěpení, nebo až poté, co dojde k jeho rozštěpení na dvě části, kdy jedna část je radikál a druhá nikoliv. Navíc se sukralózový radikál může rekombinovat s jinými sacharidovými radikály za vzniku neutrálních sloučenin s vyšším stupněm polymerace (viz Obrázek 4) (Matros et al., 2015).

Za účelem zkoumání reakce mezi sukralózou a OH• *in vivo* byly rostliny *Arabidopsis thaliana* kultivovány v hydroponické kultuře, která obsahovala sukralózu, a poté byly vystaveny oxidativnímu stresu. Pomocí hmotnostní spektrometrie byly vyhledány a analyzovány rozpadové produkty sukralózy a nově vzniklé sloučeniny s větší molekulární hmotností. Díky těmto provedeným experimentům bylo potvrzeno, že reakce sukralózy s OH• proběhne *in vitro* a také *in vivo*.

Důležitý závěr těchto experimentů je, že všechny tyto pozorované výsledky potvrzují roli sacharidů jako pravých zhášečů OH•. Další klíčový závěr této práce je, že neenzymatické reakce s OH• jsou nedílnou součástí rostlinného antioxidačního systému podílející se na homeostázi rostlinných buněk, a že jsou mnohem důležitější, než se dříve očekávalo a v budoucnosti by jim mělo být věnováno více pozornosti (Matros et al., 2015).



Obrázek 4 - Zhášení OH• pomocí sukralózy (upraveno dle Matros et al., 2015). 1. OH• odebere atom vodíku buď z FruCl₂ nebo z GalCl jednotky, což vede ke vzniku sukralózového radikálu, který může být hydrolyzován na monosacharidový radikál a neutrální monosacharid. Monosacharidový radikál může být dále podroben oxidaci, která vede ke vzniku derivátu s keto-skupinou. 2. Sukralózový radikál může být oxidován, vzniká sukralózový derivát s keto-skupinou. Následně může dojít k odebrání vodíku a hydrolyze. Výsledkem je neutrální monosacharid s keto skupinou a monosacharidový radikál. 3. Radikály se mohou vzájemně rekombinovat a dochází ke vzniku oligosacharidů s vyšším stupněm polymerace.

4. Závěr

Z dosud publikovaných prací je zřejmé, že enzymatické antioxidační systémy rostlin nestačí na zneškodnění všech typů ROS. Z tohoto důvodu jsou velmi důležité neenzymatické antioxidační systémy, jejichž významnou složkou jsou sacharidy. Pokud dojde ke zvýšení hladiny ROS a následně je nutno ROS zneškodnit, je výhodou účasti sacharidů na tomto procesu fakt, že sacharidy jsou v rostlinných buňkách univerzálně přítomné a není třeba je nově syntetizovat. Studie o tom, že určité sacharidy fungují jako účinné zhášedce ROS se objevovaly už dříve (Smirnoff and Cumbes, 1989, Morelli et al., 2003), ovšem studie týkající se konkrétních mechanismů, kterými sacharidy zhášejí ROS, se začaly objevovat až v nedávné době (Hernandez-Marin and Martinez, 2012, Peshev et al., 2013, Matros et al., 2015). Nicméně stále není jasné, zda tuto schopnost mají všechny sacharidy a jakými mechanismy jednotlivé sacharidy dokáží zhasit ROS. Navíc uvedené studie týkající se mechanismů zkoumaly pouze zhášení $\text{OH}\cdot$. Zůstává tedy otázkou, zda a případně jakými mechanismy dochází ke zhášení ostatních ROS. Myslím si, že co se týče mechanismů, jsme na začátku výzkumu a tomuto tématu by v budoucnosti mělo být věnováno více pozornosti.

5. Seznam použité literatury

Ahmad P, Sarwat M, Sharma S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *J Plant Biol.* 2008;51:167-73.

Akerboom TPM, Bilzer M, Sies H. THE RELATIONSHIP OF BILIARY GLUTATHIONE DISULFIDE EFFLUX AND INTRACELLULAR GLUTATHIONE DISULFIDE CONTENT IN PERFUSED-RAT-LIVER. *J Biol Chem.* 1982;257:4248-52.

Alia, Saradhi PP, Mohanty P. Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage. *J Photochem Photobiol B-Biol.* 1997;38:253-57.

Almagro L, Ros LVG, Belchi-Navarro S, Bru R, Barcelo AR, Pedreno MA. Class III peroxidases in plant defence reactions. *J Exp Bot.* 2009;60:377-90.

Alscher RG. BIOSYNTHESIS AND ANTIOXIDANT FUNCTION OF GLUTATHIONE IN PLANTS. *Physiol Plant.* 1989;77:457-64.

Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiol Plant.* 1997;100:224-33.

Alscher RG, Erturk N, Heath LS. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot.* 2002;53:1331-41.

Anjum NA, Sharma P, Gill SS, Hasanuzzaman M, Khan EA, Kachhap K, et al. Catalase and ascorbate peroxidase-representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research.* 2016;23:19002-29.

Arora A, Byrem TM, Nair MG, Strasburg GM. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Arch Biochem Biophys.* 2000;373:102-09.

Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol.* 1999;50:601-39.

Bartoli CG, Gomez F, Martinez DE, Guiamet JJ. Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Exp Bot.* 2004;55:1663-69.

Bhattacharjee S. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Curr Sci.* 2005;89:1113-21.

Bielski BHJ, Arudi RL, Sutherland MW. A STUDY OF THE REACTIVITY OF HO₂/O₂- WITH UNSATURATED FATTY-ACIDS. *J Biol Chem.* 1983;258:4759-61.

Bienert GP, Moller ALB, Kristiansen KA, Schulz A, Moller IM, Schjoerring JK, et al. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem.* 2007;282:1183-92.

Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot.* 2003;91:179-94.

Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG. ADAPTATIONS TO ENVIRONMENTAL STRESSES. *Plant Cell.* 1995;7:1099-111.

Bowler C, Vanmontagu M, Inze D. SUPEROXIDE-DISMUTASE AND STRESS TOLERANCE. *Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol.* 1992;43:83-116.

Burton GW, Ingold KU. BETA-CAROTENE - AN UNUSUAL TYPE OF LIPID ANTIOXIDANT. *Science.* 1984;224:569-73.

Clennan EL, Noe LJ, Wen T, Szneler E. SOLVENT EFFECTS ON THE ABILITY OF AMINES TO PHYSICALLY QUENCH SINGLET OXYGEN AS DETERMINED BY TIME-RESOLVED INFRARED-EMISSION STUDIES. *J Org Chem.* 1989;54:3581-84.

Conklin PL, Williams EH, Last RL. Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient Arabidopsis mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:9970-74.

Costa MMR, Hilliou F, Duarte P, Pereira LG, Almeida I, Leech M, et al. Molecular cloning and characterization of a vacuolar class III peroxidase involved in the metabolism of anticancer alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* 2008;146:403-17.

Csonka LN. PHYSIOLOGICAL AND GENETIC RESPONSES OF BACTERIA TO OSMOTIC-STRESS. *Microbiol Rev.* 1989;53:121-47.

Das K, Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*. 2014;2:1-13.

Deisseroth A, Dounce AL. CATALASE - PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES, MECHANISM OF CATALYSIS, AND PHYSIOLOGICAL ROLE. *Physiol Rev*. 1970;50:319-369.

del Rio LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gomez M, Barroso JB. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot*. 2002;53:1255-72.

Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. LYCOPENE AS THE MOST EFFICIENT BIOLOGICAL CAROTENOID SINGLET OXYGEN QUENCHER. *Arch Biochem Biophys*. 1989;274:532-38.

Edwards EA, Rawsthorne S, Mullineaux PM. SUBCELLULAR-DISTRIBUTION OF MULTIPLE FORMS OF GLUTATHIONE-REDUCTASE IN LEAVES OF PEA (*PISUM-SATIVUM-L*). *Planta*. 1990;180:278-84.

Edwards R, Dixon DP, Walbot V. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci*. 2000;5:193-98.

Floyd RA, Zsnagy I. FORMATION OF LONG-LIVED HYDROXYL FREE-RADICAL ADDUCTS OF PROLINE AND HYDROXYPROLINE IN A FENTON REACTION. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1984;790:94-97.

Foote CS, Denny RW. CHEMISTRY OF SINGLET OXYGEN .7. QUENCHING BY BETA-CAROTENE. *J Am Chem Soc*. 1968;90:6233-6235.

Foyer CH, Halliwell B. PRESENCE OF GLUTATHIONE AND GLUTATHIONE REDUCTASE IN CHLOROPLASTS - PROPOSED ROLE IN ASCORBIC-ACID METABOLISM. *Planta*. 1976;133:21-25.

Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ. PHOTOOXIDATIVE STRESS IN PLANTS. *Physiol Plant*. 1994;92:696-717.

Foyer CH, Noctor G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*. 2005;17:1866-75.

Fridovich I. SUPEROXIDE RADICAL AND SUPEROXIDE DISMUTASE. *Accounts Chem Res.* 1972;5:321-326.

Fukuda M, Kunisada Y, Noda H, Tagaya S, Yamamoto Y, Kida Y. Effect of storage time of potatoes after harvest on increase in the ascorbic acid content by wounding. *J Jpn Soc Food Sci Technol-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi.* 1995;42:1031-34.

Gechev TS, Van Breusegem F, Stone JM, Denev I, Laloi C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays.* 2006;28:1091-101.

Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem.* 2010;48:909-30.

Gratao PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Funct Plant Biol.* 2005;32:481-94.

Griffiths HR, Lunec J. The Clq binding activity of IgG is modified in vitro by reactive oxygen species: Implications for rheumatoid arthritis. *FEBS Lett.* 1996;388:161-64.

Grill E, Winnacker EL, Zenk MH. PHYTOCHELATINS, A CLASS OF HEAVY-METAL-BINDING PEPTIDES FROM PLANTS, ARE FUNCTIONALLY ANALOGOUS TO METALLOTHIONEINS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:439-43.

Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006;141:312-22.

Halliwell B, Foyer CH. PROPERTIES AND PHYSIOLOGICAL FUNCTION OF A GLUTATHIONE REDUCTASE PURIFIED FROM SPINACH LEAVES BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY. *Planta.* 1978;139:9-17.

Hatz S, Lambert JDC, Ogilby PR. Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability. *Photochem Photobiol Sci.* 2007;6:1106-16.

Hernandez-Marin E, Martinez A. Carbohydrates and Their Free Radical Scavenging Capability: A Theoretical Study. *J Phys Chem B.* 2012;116:9668-75.

Hernandez I, Chacon O, Rodriguez R, Portieles R, Lopez Y, Pujol M, et al. Black shank resistant tobacco by silencing of glutathione S-transferase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;387:300-04.

Hincha DK, Zuther E, Heyer AG. The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions. *Biochim Biophys Acta-Biomembr.* 2003;1612:172-77.

Hoque MA, Banu MNA, Nakamura Y, Shimoishi Y, Murata Y. Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. *J Plant Physiol.* 2008;165:813-24.

Horemans N, Asard H, Caubergs RJ. THE ROLE OF ASCORBATE FREE-RADICAL AS AN ELECTRON-ACCEPTOR TO CYTOCHROME B-MEDIATED TRANS-PLASMA MEMBRANE ELECTRON-TRANSPORT IN HIGHER-PLANTS. *Plant Physiol.* 1994;104:1455-58.

Horemans N, Foyer CH, Potters G, Asard H. Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiol Biochem.* 2000;38:531-40.

Igamberdiev AU, Seregelyes C, Manac'h N, Hill RD. NADH-dependent metabolism of nitric oxide in alfalfa root cultures expressing barley hemoglobin. *Planta.* 2004;219:95-102.

Jimenez A, Hernandez JA, Pastori G, del Rio LA, Sevilla F. Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiol.* 1998;118:1327-35.

KamalEldin A, Appelqvist LA. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids.* 1996;31:671-701.

Karuppanapandian T, Moon JC, Kim C, Manoharan K, Kim W. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Aust J Crop Sci.* 2011;5:709-25.

Kelly GJ, Latzko E. SOLUBLE ASCORBATE PEROXIDASE - DETECTION IN PLANTS AND USE IN VITAMIN-C ESTIMATION. *Naturwissenschaften.* 1979;66:617-18.

Kiffin R, Bandyopadhyay U, Cuervo AM. Oxidative stress and autophagy. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8:152-62.

Krieger-Liszakay A, Fufezan C, Trebst A. Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynth Res.* 2008;98:551-64.

Lehle L, Tanner W. FUNCTION OF MYOINOSITOL IN BIOSYNTHESIS OF RAFFINOSE PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GALACTINOL-SUCROSE 6-GALACTOSYLTRANSFERASE FROM VICIA-FABA SEEDS. *Eur J Biochem.* 1973;38:103-10.

Liang XW, Zhang L, Natarajan SK, Becker DF. Proline Mechanisms of Stress Survival. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19:998-1011.

* **Loew O.** Catalase, new enzyme of general occurrence, with special reference to the tobacco plant. *US Depart Agric Rep.* 1901,68:47.

Marrs KA. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol.* 1996;47:127-58.

Matros A, Peshev D, Peukert M, Mock HP, Van den Ende W. Sugars as hydroxyl radical scavengers: proof-of-concept by studying the fate of sucralose in Arabidopsis. *Plant J.* 2015;82:822-39.

Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 2002;7:405-10.

Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, et al. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* 2011;16:300-09.

Miyake C, Asada K. Inactivation mechanism of ascorbate peroxidase at low concentrations of ascorbate; Hydrogen peroxide decomposes compound I of ascorbate peroxidase. *Plant Cell Physiol.* 1996;37:423-30.

Moller IM. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol.* 2001;52:561-91.

Morelli R, Russo-Volpe S, Bruno N, Lo Scalzo R. Fenton-dependent damage to carbohydrates: Free radical scavenging activity of some simple sugars. *J Agric Food Chem.* 2003;51:7418-25.

Neubauer C, Yamamoto HY. MEMBRANE BARRIERS AND MEHLER-PEROXIDASE REACTION LIMIT THE ASCORBATE AVAILABLE FOR VIOLAXANTHIN DE-EPOXIDASE ACTIVITY IN INTACT CHLOROPLASTS. *Photosynth Res.* 1994;39:137-47.

Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol.* 2008;147:1251-63.

Niyogi KK, Shih C, Chow WS, Pogson BJ, DellaPenna D, Bjorkman O. Photoprotection in a zeaxanthin- and lutein-deficient double mutant of Arabidopsis. *Photosynth Res.* 2001;67:139-45.

Noctor G, Arisi ACM, Jouanin L, Kunert KJ, Rennenberg H, Foyer CH. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J Exp Bot.* 1998;49:623-47.

Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, et al. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature.* 2000;406:731-34.

Peshev D, Vergauwen R, Moglia A, Hideg E, Van den Ende W. Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: a role for fructans? *J Exp Bot.* 2013;64:1025-38.

Phang JM. THE REGULATORY FUNCTIONS OF PROLINE AND PYRROLINE-5-CARBOXYLIC ACID. *Current Topics in Cellular Regulation.* 1985;25:91-132.

Piterkova J, Tomankova K, Luhova L, Petrivalsky M, Pec P. Oxidative stress: Localisation of reactive oxygen species formation and degradation in plant tissue. *Chem Listy.* 2005;99:455-66.

Pospisil P. Production of Reactive Oxygen Species by Photo system II as a Response to Light and Temperature Stress. *Front Plant Sci.* 2016;7:12.

Puntarulo S, Sanchez RA, Boveris A. HYDROGEN-PEROXIDE METABOLISM IN SOYBEAN EMBRYONIC AXES AT THE ONSET OF GERMINATION. *Plant Physiol.* 1988;86:626-30.

Quan LJ, Zhang B, Shi WW, Li HY. Hydrogen peroxide in plants: A versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J Integr Plant Biol.* 2008;50:2-18.

Queval G, Jaillard D, Zechmann B, Noctor G. Increased intracellular H₂O₂ availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts. *Plant Cell Environ.* 2011;34:21-32.

Rautenkranz AAF, Li LJ, Machler F, Martinoia E, Oertli JJ. TRANSPORT OF ASCORBIC AND DEHYDROASCORBIC ACIDS ACROSS PROTOPLAST AND VACUOLE MEMBRANES ISOLATED FROM BARLEY (*HORDEUM-VULGARE* L CV GERBEL) LEAVES. *Plant Physiol.* 1994;106:187-93.

Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J. Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology.* 2006;57:675-709.

Romero-Puertas MC, Corpas FJ, Sandalio LM, Leterrier M, Rodriguez-Serrano M, del Rio LA, et al. Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New Phytol.* 2006;170:43-52.

Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot.* 2002;53:1305-19.

Schneider T, Keller F. Raffinose in Chloroplasts is Synthesized in the Cytosol and Transported across the Chloroplast Envelope. *Plant Cell Physiol.* 2009;50:2174-82.

Smirnoff N, Cumbes QJ. HYDROXYL RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF COMPATIBLE SOLUTES. *Phytochemistry.* 1989;28:1057-60.

Stoyanova S, Geuns J, Hideg E, Van den Ende W. The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress. *Int J Food Sci Nutr.* 2011;62:207-14.

Tarczynski MC, Jensen RG, Bohnert HJ. STRESS PROTECTION OF TRANSGENIC TOBACCO BY PRODUCTION OF THE OSMOLYTE MANNITOL. *Science.* 1993;259:508-10.

Van den Ende W, Valluru R. Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? *J Exp Bot.* 2009;60:9-18.

Wagner D, Przybyla D, Camp ROD, Kim C, Landgraf F, Lee KP, et al. The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of *Arabidopsis thaliana*. *Science.* 2004;306:1183-85.

Walling C. FENTONS REAGENT REVISITED. *Accounts Chem Res.* 1975;8:125-31.

Welinder KG, Mauro JM, Norskovlauritsen L. STRUCTURE OF PLANT AND FUNGAL PEROXIDASES. *Biochem Soc Trans.* 1992;20:337-40.

Young RH, Martin RL, Feriozi D, Brewer D, Kayser R. MECHANISM OF QUENCHING OF SINGLET OXYGEN BY AMINES .3. EVIDENCE FOR A CHARGE-TRANSFER-LIKE COMPLEX. *Photochem Photobiol.* 1973;17:233-44.

Zechmann B, Stumpe M, Mauch F. Immunocytochemical determination of the subcellular distribution of ascorbate in plants. *Planta.* 2011;233:1-12.

* - sekundární citace