

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND
COMMUNICATION

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

SLEDOVÁNÍ STRESOVÝCH MARKERŮ U ROSTLIN VYSTAVENÝCH PŮSOBENÍ TĚŽKÝCH KOVŮ

Study of stress markers in plants influenced by heavy metals

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S PROJECT

AUTOR PRÁCE

Jakub Rucký

AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

SUPERVISOR

BRNO, 2011



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor

Biomedicínská technika a bioinformatika

Student: Jakub Rucký

ID: 115113

Ročník: 3

Akademický rok: 2010/2011

NÁZEV TÉMATU:

Sledování stresových markerů u rostlin vystavených působení těžkých kovů

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

Seznamte se s problematikou odvozování explantátových kultur rostlin. Práce bude zaměřena na studium sledování stresových markerů u explantátových kultur rostlin vystavených působení těžkých kovů. Provedte odvození vybraných kultur na pracovišti Mendelovy univerzity a vyhodnoťte výsledky. Navrhněte postup přípravy reálných vzorků rostlinných kultur pro spektrometrická stanovení. Provedte základní spektrometrická měření pro stanovení obsahu kovů. Získané výsledky analýz statisticky zpracujte a výsledky vyhodnoťte.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

- [1] DIOPAN, V. et al. Determination of plant thiols by liquid chromatography coupled with coulometric and amperometric detection in lettuce treated by lead(II) ions. *Electroanalysis* 2010, 22, 1248-1259.
- [2] KRIZKOVA, S. et al. Multi-instrumental analysis of tissues of sunflower plants treated with silver(I) ions - Plants as bioindicators of environmental pollution. *Sensors* 2008, 8, 445-463.

Termín zadání: 7.2.2011

Termín odevzdání: 27.5.2011

Vedoucí práce: prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

Abstrakt

V našem experimentu jsme se zabývali vlivem Cd^{2+} na explantátovou kulturu slunečnice roční kultivaru Aloha. Explantátová kultura byla vystavena koncentracích 0, 5, 10, 50, 100 a $500\mu M$ po dobu 7 dnů a byly u ní sledovány změny v antioxidační aktivitě. Ke sledování antioxidační aktivity byly použity metody ABTS, FRAP, Free Radical a DPPH. bychom mohli získané výsledky porovnat, byla naměřená data vyhodnocena pomocí programu STATISTICA. Cílem statistického vyhodnocení dat je určit koncentraci, při které jsou rostliny schopny ještě odolávat jejím negativním vlivům bez smrtelných následků.

Klíčová slova

Explantátové kultury rostlin, kadmium, antioxidační aktivita, spektrofotometrie, statistické vyhodnocení

Abstract

In our experiment, we examined the influence of Cd^{2+} in plant tissue culture of sunflower cultivar Aloha. Plant tissue culture were exposed to concentrations of 0, 5, 10, 50, 100 and $500\mu M$ for 7 days and were monitored changes in its antioxidant activity. We used monitoring methods ABTS, FRAP, Free Radicals and DPPH. To compare the results obtained, measured data were used program STATISTICA. The objective of statistical evaluation is to determine the concentration at which the plants are still able to withstand the negative effects of non-fatal.

Key words

Environment, tissue culture plants, cadmium, antioxidant activity, spectrophotometry, statistical evaluation

RUCKÝ, J. *Sledování stresových markerů u rostlin vystavených působení těžkých kovů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2011. 50 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Sledování stresových markerů u rostlin vystavených působení těžkých kovů jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne 27. května 2011

.....

podpis autora

Poděkování

Děkuji vedoucímu semestrálního projektu prof. Ing. Ivo Provazníkovi, Ph.D. a Mgr. Olze Kryštofové za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé bakalářské práce.

V Brně dne 27. května 2011

.....

podpis autora

Obsah

1	Seznam zkratk	8
2	Seznam obrázků	9
3	Seznam grafů	10
4	Úvod	11
5	Životní prostředí	12
5.1	Znečišťující látky v životním prostředí	13
5.2	Těžké kovy	14
5.2.1	Zdroje těžkých kovů v životním prostředí	15
5.2.2	Kadmium	16
6	Stres rostlin	19
6.1	Obranné mechanismy u rostlin	20
6.2	Stresové markéry	21
6.2.1	Stresové proteiny	21
6.2.2	Antioxidační aktivita	22
6.2.3	Stanovení antioxidační aktivity	22
7	Explantátové kultury rostlin	25
7.1	Metody získávání explantátových kultur	25
8	Spektrofotometrie	27
9	Program STATISTICA	28
9.1	Základní funkce programu	28
9.1.1	Spuštění programu	28

9.1.2	Vstupní data	29
9.1.3	Analýza dat	31
9.1.4	Grafické znázornění dat	33
9.2	Krabicový graf	35
10	Výsledky	37
10.1	Popis experimentu	37
10.2	Popis měření	38
10.2.1	Postup měření automatickým analyzáto- rem pro metodu ABTS	38
10.2.2	Postup měření automatickým analyzáto- rem pro metodu FRAP	38
10.2.3	Postup měření automatickým analyzáto- rem pro metodu DPPH	39
10.2.4	Postup měření automatickým analyzáto- rem pro metodu FREE	39
10.3	Vyhodnocení získaných výsledků	40
10.3.1	Spektrofotometrické stanovení proteinů ve vzorku	40
10.3.2	Vyhodnocení dat naměřených metodou ABTS	41
10.3.3	Vyhodnocení dat naměřených metodou FRAP	42
10.3.4	Vyhodnocení dat naměřených metodou FREE	43
10.3.5	Vyhodnocení dat naměřených metodou DPPH	44
11	Závěr	45
12	Seznam literatury	46

1. Seznam zkratek

TK – těžké kovy

Cd - kadmium

As - arsen

Be - berylium

Co - kobalt

Cr - chróm

Cu - měď

Hg - rtuť

Mo - molybden

Ni - nikl

Pb - olovo

V - vanad

Zn – zinek

FREE – Free Radical

ABTS - 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)

DPPH - 2,2-difenyl-1 pikrylhydrazyl

FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power

TPTZ - 2,4,6-tripyridyl-S-triazin

UV-VIS – ultrafialové až viditelné spektrum

2. Seznam obrázků

Obrázek 1: Zdroje znečišťujících látek v životním prostředí	13
Obrázek 2: Intenzita znečištění zeměkoule těžkými kovy	16
Obrázek 3: Kadmium	17
Obrázek 4: Rozdělení stresových faktorů rostlin	19
Obrázek 5: Idealizovaný průběh stresové reakce	20
Obrázek 6: Explantátová kultura slunečnice roční	25
Obrázek 7: Okno aplikace STATISTICA	28
Obrázek 8: Volba importu	30
Obrázek 9: Pojmenování proměnných	30
Obrázek 10: Data ve formátu *.sta	30
Obrázek 11: Základní statistiky a tabulky	31
Obrázek 12: Volba popisných statistik	32
Obrázek 13: Tabulka s výsledky popisných statistik	32
Obrázek 14: Souhrnné grafické zobrazení sledovaných dat	33
Obrázek 15: Nastavení parametrů krabicového grafu	34
Obrázek 16: Výsledný krabicový graf	34
Obrázek 17: Popis významných parametrů krabicového grafu	35
Obrázek 18: Automatický chemický analyzátor BS – 200	38

3. Seznam grafů

Graf 1: Grafické znázornění obsahu proteinů ve vzorku při různých koncentracích kademnatých iontů	40
Graf 2: Krabicový graf znázorňující změny antioxidační aktivity měřené metodou ABTS při účincích různých koncentrací kademnatých iontů	41
Graf 3: Krabicový graf znázorňující změny antioxidační aktivity měřené metodou FRAP při účincích různých koncentrací kademnatých iontů	42
Graf 4: Krabicový graf znázorňující změny antioxidační aktivity měřené metodou Free Radical při účincích různých koncentrací kademnatých iontů	43
Graf 5: Krabicový graf znázorňující změny antioxidační aktivity měřené metodou DPPH při účincích různých koncentrací kademnatých iontů	44

4. Úvod

V posledních letech je stále více pozornosti upíráno směrem k nebezpečnosti a toxicitě těžkých kovů (TK). Jedná se o kontaminanty anorganického původu, mezi které patří zejména přechodné kovy, některé polokovy, lanthanoidy a aktinoidy. Jejich přirozený výskyt v životním prostředí je zanedbatelný, přesto se však jejich koncentrace rok od roku navyšují. Vinu na tom nese především člověk, který jejich obsah v životním prostředí zvyšuje při osidlování a industrializaci krajiny. Kovy uvolněné do životního prostředí se kumulují v půdě, odkud se mohou dostávat do rostlin a následně do celého potravního řetězce.

Jedním z nejtoxičtějších a nejrizikovějších těžkých kovů kumulujících se v životním prostředí a živých organismech je kadmium. Jeho negativní účinky se u rostlin projevují narušením fotosyntézy, respiračního řetězce, narušením příjmu živin nebo chlorózou listů. V případě, že jsou rostliny podstoupeny dále do potravního řetězce, může dojít na jeho vrcholu, kde se nachází člověk, k poškození především plic a kostí. Při opakované expozici narušuje v lidském organismu hospodaření s vápníkem, což vede ke vzniku osteoporózy. Negativní vliv má také na funkčnost ledvin a reprodukčních orgánů člověka.

Existuje mnoho způsobů, jak studovat toxické účinky těžkých kovů. Jedním z nich jsou tzv. explantátové kultury rostlin. Jedná se o izolované rostlinné orgány, pletiva nebo buňky, které jsou pěstovány *in vitro* za specifických podmínek na zvláštních živných půdách. Explantátové kultury se využívají v oboru rychlého klonování, množení a šlechtění rostlin a jsou užívány k různým fyziologickým, biochemickým a genetickým studiím. Také nám pomáhají v proteomických a genetických studiích lépe pochopit rozdíly mezi liniemi na kontaminant tolerantními a na kontaminant citlivými.

5. Životní prostředí

Životní prostředí lze definovat nejrůznějšími způsoby. V roce 1979 bylo životní prostředí definováno na konferenci v Tbilisi jako „systém složený z přírodních, umělých a sociálních složek materiálního světa, jež jsou nebo mohou být s uvažovaným objektem ve stálé interakci. Je to vše, co vytváří přirozené podmínky existence organismů, včetně člověka a je předpokladem jejich dalšího vývoje. Skládá se především z ovzduší, vody, hornin, půdy, organismů, ekosystémů a energie“ (mzp.cz).

O pět let dřív v roce 1974 definoval český geograf a geomorfolog Jaromír Demek životní prostředí jako souhrn materiálních částí světa, přírodních i člověkem uměle vytvořených, v nichž a s jejichž pomocí člověk uspokojuje své materiální i kulturní potřeby. Životní prostředí je tedy vše, co vytváří přirozené podmínky existence pro organismy a má určité předpoklady pro jejich pokračující vývoj [1] Tyto přirozené podmínky pro vývoj, růst a život organismů jsou však stále intenzivněji narušovány nejrůznějšími kontaminanty, které je znečišťují a tím znehodnocují. Znečišťováním životního prostředí rozumíme kontaminaci ekosystémů, která vede k narušení stability, nesčetnému množství poškození, či značnému nepohodlí jednotlivých systémů a žijících organismů. [2]

Hlavní složky životního prostředí jsou ovlivňovány přírodními a antropogenními faktory. Přírodními faktory jsou myšleny klimatické změny, kosmické vlivy, tektonické jevy, biologické faktory, přirozená radioaktivita prostředí, vlastnosti atmosféry jako jsou například teplota, tepelná bilance atmosféry a zemského povrchu, tlakové poměry atmosféry a další. [1] Druhou skupinou jsou faktory antropogenní, které ovlivňuje člověk svým jednáním a zanáší do životního prostředí mnoho znečišťujících látek. [1] Značné množství znečišťujících látek je spojeno se spalováním paliv, jako jsou pohonné hmoty, tuhá paliva či odpady (obr. 1). K jejich spalování dochází denně například v tepelných elektrárnách, dopravě, při lesních požárech či řízeném vypalování lesů, nebo při pouhém spalování na ohništích, v kamnech, v pecích a podobně. K dalším antropogenním zdrojům patří veškerá průmyslová činnost, skládky odpadů, vojenské zdroje (např. toxické plyny nebo jaderné a biologické zbraně) a v neposlední řadě také nevhodné obdělávání půdy a zacházení s přírodními zdroji (obr. 1). [3] Množství a způsob čerpání přírodních zdrojů působí velmi intenzivně na životní prostředí. Neustále roste jejich spotřeba a z tohoto

důvodu musí růst také jejich těžba. Výsledkem zvyšující se těžby je stále větší množství dostupných surovin, se kterými lidé nenakládají ekonomicky a vzniká tak zbylý materiál, který by mohl být ještě použit například v jiném průmyslu, ale místo toho je z něj odpad.



Obr. č. 1: Zdroje znečišťujících látek v životním prostředí.

Ať se jedná o přírodní nebo antropogenní zdroje znečištění, oba tyto faktory mají negativní dopad na zdraví člověka. To se projevuje především vznikem celé řady onemocnění, která se týkají především dýchacího a kardiovaskulárního systému (astma, bronchitidu, respirační alergie a onemocnění srdce). [2]

5.1 Znečišťující látky v životním prostředí

Jakákoliv látka, která je svým množstvím anebo podstatou cizorodá pro prostředí a je zde zanesena v důsledku činnosti člověka, je považována za nežádoucí a tedy za znečišťující pro životní prostředí. [1] Tyto látky ovlivňují přírodu z hlediska lokálního, kdy dochází k dopadu na ekosystémy a tím i na člověka, který je jejich součástí a také z hlediska globálního, kdy mohou vézt až k velkým klimatickým změnám (vznik kyselých dešťů, oteplování Země, zeslabování ochranné ozonové vrstvy, postupná degradace půdy a další).

V oblasti znečišťujících látek anorganického původu představují největší hrozbu těžké kovy (TK). Celý svět je každodenně vystaven určitým dávkám těchto kovů. Hlavními zdroji vstupu TK do životního prostředí s následnou kontaminací půdy a rostlin jsou především odpady a nejrůznější zplodiny průmyslových a energetických provozů, při nichž se šíří TK v nejnebezpečnější formě (plynů, aerosolu a mikročastic). Porovnáním měst s oblastmi venkova je patrné větší znečištění těžkými kovy ve městech a to až několikanásobně. To platí také se znečištěním v oblastech okolo těžebních, průmyslových a zpracovatelských provozů. [4] Svým způsobem paradoxní, avšak nesčetné jsou případy, kdy sám člověk (ne)vědomě podporuje vstup TK do životního prostředí například nevhodným nakládáním s odpadem.

Ochrana životního prostředí závisí kromě lidské ohleduplnosti vůči životnímu prostředí i na legislativě a technologických možnostech jednotlivých států. Každá země má jiné možnosti využívat technologie, které co nejvíce zabraňují znečišťování. Důležitou součástí boje proti znečišťování životního prostředí je také nacházet nově vznikající chemické látky, které nikdy dřív nebyly součástí biosféry. Je důležité znát co nejpřesněji jejich složení, způsob vzniku, uvolňování a kumulaci v životním prostředí, aby mohly být co nejefektivněji snižovány jejich koncentrace. V posledních letech jich bylo objeveno více než 100 000 a za jejich výskyt a zvyšující se koncentrace nese největší vinu člověk. [5]

Jedná se především o látky s obsahem TK či neustále znečišťující organické látky, o jejichž nebezpečné povaze se ví už mnoho let. Objevují se také látky, o kterých přesně nevíme, co se s nimi při průchodu životním prostředím děje, zda se kumulují, případně kde je najdeme. Na druhou stranu u mnoha chemických látek, jejichž toxicita a účinky na organismy jsou dlouhou dobu známy, dochází ke snižování emisí a to z důvodu zlepšujících se ekonomických podmínek a efektivnějšího využívání technologií. [2]

5.2 Těžké kovy

Do skupiny prvků s názvem těžké kovy spadají především některé přechodné kovy, polokovy, lanthanoidy a aktinoidy. Jak je již z názvu patrné, jedná se o prvky s kovovými vlastnostmi, jejichž měrná hmotnost je vyšší než 5 g/cm³ [6]. Těžké kovy jsou významným faktorem znečištění životního prostředí a jejich toxicita je stále vážnějším problémem, jelikož jsou nebezpečné již při velmi nízkých koncentracích. Mezi těžké kovy

řadíme As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, V a Zn. Z tohoto výčtu patří mezi nejrizikovější a také nejtoxičtější kadmium, olovo nebo také rtuť. [7]

Některé těžké kovy jsou v určitých dávkách esenciální a tedy nepostradatelnou složkou pigmentů a enzymů (např. Cu, Ni, Zn, Co, Fe a Mo), avšak ve zvýšených koncentracích jsou jedovaté, jelikož narušují funkce enzymů a produkci reaktivních funkčních radikálů a také dochází k jejich náhradě v pigmentech za esenciální kov. K této náhradě dochází z důvodu podobnosti některých esenciálních a toxických těžkých kovů. Jedná se například o podobnost kadmia a zinku. Jde o velice stabilní prvky, které nepodléhají biologickému odbourávání. Tím dochází k jejich akumulaci v kostech, ledvinách a dalších částech organismu, vzrůstá jejich toxicita pro organismus a v konečném součtu je rozhodující jejich celková koncentrace, nikoliv jednotlivé dávky. [2]

5.2.1 Zdroje těžkých kovů v životním prostředí

V životním prostředí existují mnohé zdroje těžkých kovů. Patří mezi ně například zdroje přírodní, zemědělské, průmyslové, odpadní vody, atmosférické a další. [5]

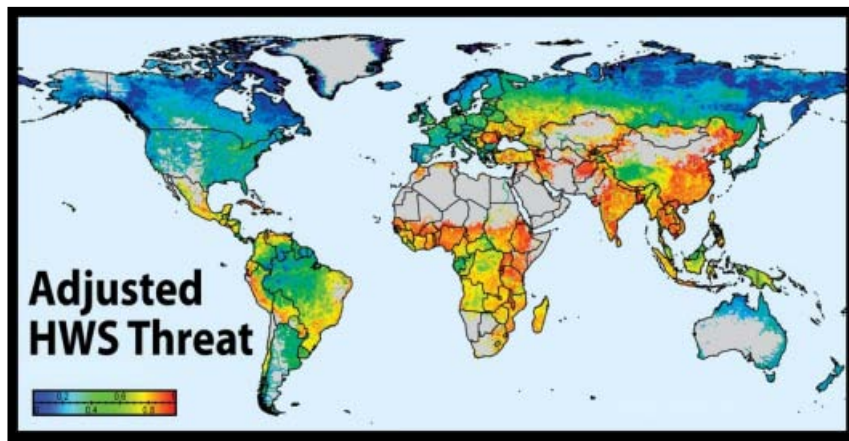
Přírodními zdroji těžkých kovů je myšlen jejich přirozený výskyt a ten je v zemské kůře nepatrný. Do životního prostředí se mohou uvolnit například v podobě vyvřelých hornin sopečného původu. Složení a koncentrace TK závisí na druhu horniny a aktivaci procesu zvětrávání. Tyto vyvřelé horniny mají obecně vysoké koncentrace Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Sn, Hg a Pb. Půda se však tvoří od sedimentární horniny, která obsahuje pouze minimální množství TK, jelikož zde neprobíhá snadno proces zvětrávání. [5]. Z tohoto důvodu jsou přírodní zdroje TK poměrně nízké.

Drtivá většina znečišťujících těžkých kovů se uvolňuje antropogenní činností člověka, který nese vinu na jejich neustále se zvyšujících koncentracích v půdě, atmosféře a vodních zdrojích. Jejich pronikání do životního prostředí probíhá nejvíce v důsledku průmyslových a zemědělských procesů. Z tohoto důvodu jsou koncentrace TK (ve srovnání se vzdálenějšími lokalitami od zdroje znečištění) vyšší právě v těchto lokalitách.

V zemědělství je nejnebezpečnějším zdrojem TK hnojení půd. Při tomto procesu dochází ke zvyšování jejich hladiny daleko více, než například při užívání dusíkatých hnojiv či kompostů. Přestože je celková koncentrace TK v zemědělských půdách poměrně malá, opakované používání fosfátových hnojiv s dlouhou perzistencí může vést k jejich

hromadění. Kontaminace zemědělské půdy těžkými kovy závisí na četnosti aplikace látek o určité koncentraci kovů a na vlastnostech půdy, na kterou jsou použity. [5].

K průmyslovým zdrojům kontaminujícím životní prostředí v nejvyšší míře patří zejména těžba rud, tavení a povrchové úpravy kovů a jejich recyklace. V oblasti hornictví jsou zdrojem znečištění uhelné doly, vinou kterých dochází k nadměrnému uvolňování arsenu a kadmia. Vysoká teplota užívaná při zpracování kovů způsobuje uvolňování TK v nejnebezpečnější formě částic a par. K rozptýlení těchto částic může dojít buď větrem (suchá depozice) nebo vlivem srážek (mokrý depozice), které způsobují značnou kontaminaci půdy či vodních toků. Na znečištění těchto přírodních složek těžkými kovy se podílí také prach vznikající při dopravě, koroze kovů, spalování ropy a vyluhování TK do půdy či odpadních vod. Právě splaškové vody představují pravděpodobně největší zdroj TK v řekách a jezerech. [5]



Obr. č. 2: Intenzita znečištění zeměkoule těžkými kovy. (www.nature.com)

5.2.2 Kadmium (Cd - cadmium)

Kadmium (obr. 3) je neušlechtilý kov, jehož všechny sloučeniny jsou toxické. Jedná se o měkký a lehce tavitelný kovový prvek. Jeho přirozený výskyt v přírodě je poměrně vzácný. V malé míře je obsažen v zemské kůře jako příměs v rudách zinku a mořské vodě. Zvýšení jeho koncentrace v životním prostředí je způsobeno především těžbou a zpracováním rud, spalováním odpadů a používáním minerálních a organických hnojiv. [7]



Obr. č. 3: Kadmium.

Kadmium bylo dříve používáno jako součást nejrůznějších slitin anebo k povrchové ochraně jiných kovů před korozi, dále je dosud používáno k výrobě nikl-kadmiových akumulátorů a jako malířský pigment (kadmiová žlut'). Z důvodu jeho prokázané vysoké toxicity, převládá v současné době snaha o jeho nahrazení jinými kovy všude, kde je to možné. [4]

Toxicita kadmia spočívá zejména v jeho velké podobě se zinkem, který patří mezi stopové prvky, a tudíž je v malých dávkách pro organismus nezbytný. Právě z důvodu chemické podobnosti těchto dvou kovů může dojít k jejich záměně při biochemických procesech v organismu. Kadmium snadno vstupuje do řady enzymatických reakcí místo zinku a následné biochemické pochody probíhají jiným způsobem anebo dokonce neproběhnou vůbec (např. zablokování inzulínového cyklu). [6]

Do živočišného organismu proniká kadmium výhradně potravou, přičemž jeho příjem z potravin rostlinného a živočišného původu je zastoupen poměrem 5:1. K jeho akumulaci dochází ve velké míře především v plicích a dále také v kostech. Při opakované expozici porušuje hospodaření s vápníkem, což vede ke vzniku osteoporózy. Dále kadmium ovlivňuje funkci ledvin a reprodukční orgánů člověka, jelikož narušuje funkčnost a kvalitu spermií. Konzumace potravin a tekutin kontaminovaných kadmiiem může vést v průběhu času také k těžkým gastrointestinálním (trávicím) problémům. Navíc je dokázáno, že se jedná o bio-perzistentní prvek, což znamená, že v organismu člověka může setrvat po mnoho let. Byla také prokázána jeho karcinogenita. Nejvíce ohroženou skupinou obyvatel jsou kuřáci, a to jak u aktivní tak pasivní, protože u nich byly zaznamenány několikanásobně větší koncentrace. Při expozici kadmiu může nastat celá řada onemocnění a poruch, jako jsou například oxidační stres, obstrukční plicní choroby, rakoviny plic, zvýšený krevní tlak, poškození srdce a další. [2]

Do rostlin vstupuje kadmium nejčastěji kořeny z půdy a v menší míře nadzemními částmi rostliny kdy dochází ke vstřebávání kadmia z atmosféry. Přítomnost kadmia se negativně podílí na růstu a vývoji rostlin. Mezi nejsnáze pozorovatelné projevy toxického působení kadmia je chloróza listů, hnědnutí kořenových vlásků, narušení fotosyntézy, respiračního řetězce, narušení příjmu živin. [7] [1]

6. Stres rostlin

Rostliny mohou být po dobu svého života vystavovány nejrůznějším nežádoucím vlivům, které negativně ovlivňují jejich životní funkce a mohou vézt dokonce až k jejich uhynutí. Tyto nežádoucí vlivy jsou označovány jako stresory (stresové faktory). Stresory mohou být biotické i abiotické povahy (obr. 4). [8]



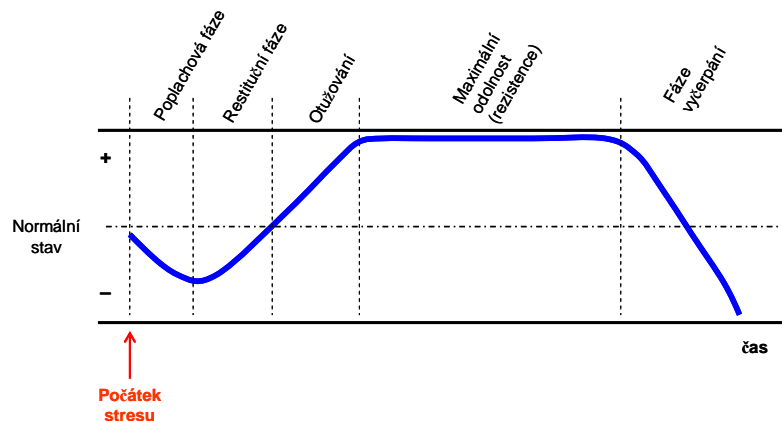
Obr. č. 4: Rozdělení stresových faktorů rostlin.

Působení stresových faktorů na rostliny u nich vyvolává stres. Stres je obecně definován jako stav živého organismu, který je vystaven nepříznivým životním podmínkám (stresovým faktorům) a jeho následné obranné reakce, které mají za cíl zachování homeostázy a zabránění poškození nebo smrti organismu. [9]

Problematika stresu u rostlin je mnohem komplikovanější než u živočichů, protože rostliny žijí přisedlým způsobem života a tudíž, nemají možnost úniku jako živočichové. Další nevýhodou rostlin je jejich velká mezidruhová variabilita a heterogenita vnitřního prostředí (buněk, pletiv). Z těchto důvodů je velmi těžké stanovit, kdy se jedná o stresové podmínky a kdy ne. [9]

6.1 Obranné mechanismy u rostlin

Rostlina vystavená působení stresoru na obranu spouští velké spektrum obranných mechanismů, které zahrnují fyzikální i chemické bariéry (např. produkce proteinů, zesilování buněčné stěny). [10] Tyto obranné mechanismy mohou mít zaprvé trvalý důsledek v podobě určité evoluční změny rostliny, která má geneticky dané předpoklady pro odpověď na působení stresového faktoru např. tlustá kutikula na listech a výrazná impregnace buněčných stěn. Druhým důsledkem je spuštění obranných reakcí jedná se o tzv. aktivní odolnost, která omezuje negativní dopad stresorů až po jejich proniknutí k plazmatické membráně buněk a do symplastu. V takovém případě dochází ke spuštění řetězce reakcí, který bývá označen jako stresová reakce (obr. 5). [10]



Obr. č. 5: Idealizovaný průběh stresové reakce upraveno dle [11].

Pro zjednodušení lze tuto reakci rozdělit do 4 fází, (viz. obr. 5) [10]:

1. poplachová fáze
2. restituční fáze
3. fáze rezistence
4. fáze vyčerpání

Na počátku působení stresového faktoru dochází k narušení buněčných struktur a funkcí (poplachová fáze). Pokud intenzita působení stresoru není letální, dochází k imobilizaci kompenzačních mechanismů (restituční fáze), které směřují ke zvýšení odolnosti rostliny (fáze rezistence). Zvýšení odolnosti a opětovné ustavení homeostaze

bývá obvykle dosahováno jen za cenu dodatečných energetických nákladů, hlavně na syntézu specifických enzymů a metabolitů. I některé další změny v metabolismu zajišťující vysokou odolnost bývají často provázeny snížením rychlosti získávání nových zdrojů hmoty a energie, a tedy snížením rychlosti tvorby biomasy. Při dlouhodobém a intenzivním působení stresového faktoru může být vystřídáno dalším poklesem (fáze vyčerpání). [12]

Rostliny nemusejí být vystaveny působení pouze jednoho stresového faktoru. Je poměrně častá situace, kdy dojde k působení několika stresových faktorů najednou. Může se jednat např. o nedostatek vody způsobený vysokými teplotami. Charakter reakce se pak může změnit a výsledkem je jiné působení stresorů na rostlinu, než při samostatném napadení. Stresory se mohou také orientovat pouze na jednu část rostliny. Zde dojde ke stresové reakci, která je schopna způsobit stres i v dalších částech rostliny. [9]

Průběh stresové reakce a její konečný výsledek je závislý na intenzitě a délce působení stresového faktoru na danou rostlinu, i na geneticky vázaných předpokladech odpovědi, souhrnně označovaných jako adaptační schopnosti. Přejídné zvýšení odolnosti získané pod vlivem stresoru – aklimace, může být založeno jak na změnách rychle pomíjivých (tvorba specifických metabolitů), tak i na změnách trvalejších (změny v tvorbě nových orgánů a v jejich vnitřní struktuře). [9]

6.2 Stresové markéry

Během vývoje se rostliny vybavily velkým množstvím obranných drah, při kterých vznikají a zpětně se regenerují sloučeniny, které umožňují rostlinám aktivně ovlivňovat jak stresové faktory, tak i následky vzniklé jejich působením.

6.2.1 Stresové proteiny

Pod vlivem stresových faktorů, ať už se jedná o těžké kovy nebo aktivní formy kyslíku, dochází často již během několika desítek minut v buňkách k velmi dramatickým biochemickým změnám. Kromě změny enzymové aktivity a biochemických procesů stoupá i tvorba některých proteinů, u jiných se naopak zastavuje. V hojné míře se však také syntetizují proteiny, které se za normálních okolností vůbec nedají v buňkách zjistit [9]. Z několika desítek proteinů, jejichž syntéza se působením určitého stresoru prudce zvyšuje (stresové proteiny), se jen jistá část vyskytuje pravidelně i u jiných typů stresů.

Indukce zbývající části stresových proteinů je specificky vázána na určitý stresový faktor [9]. Nově tvořené stresové proteiny mají velmi rozmanitou velikost i funkci. Je velmi snadné rozdělit je pomocí běžných detekčních metod (např. dvojrozměrné gelové elektroforézy) do skupin podle hmotnosti. Mnohem obtížnější je určit jejich funkci. Většina z těchto proteinů, jejichž tvorba je indukována nespecificky, tedy různými typy stresorů, patří do některé z těchto tří funkčních skupin:

1. molekulární chaperony – speciální proteiny, které v buňce pomáhají skládat právě vytvořené proteiny (které po translaci opouštějí velkou podjednotku ribozomu). Kontrolují a zabezpečují správnou prostorovou strukturu proteinů a brání vzniku nesprávných vazeb.

2. proteázy – enzymy produkované buňkami, které štěpí proteiny. Hydrolyzují peptidické vazby aminokyselin, pomocí kterých aminokyseliny drží v peptidickém řetězci.

3. ubikvitin – protein sloužící k označení molekul proteinů u kterých došlo k velkým nenapravitelným změnám v konformaci. Jejich intenzivní tvorba souvisí se vzrůstem počtu poškozených proteinů v různých buněčných strukturách [9].

6.2.2 Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita je definována jako schopnost sloučeniny (směsi látek) inhibovat oxidační degradaci jiných sloučenin. [13] Je ukazatelem míry stresové reakce probíhající v organismu, při kterých vznikají volné radikály. Volnými radikály rozumíme reaktivní atomy nebo molekuly, v jejichž elektronovém obalu se nachází obvykle jeden, případně i více volných elektronů. [13] Reakce vyvolaná těmito radikály způsobuje změny ve struktuře buněk, dochází k poškození rostlinných pletiv, orgánů a důležitých funkcí v organismu. Narušují správnou tvorbu biologicky významných sloučenin, jako jsou lipidy, nukleové kyseliny a bílkoviny, způsobují u nich změnu struktury a tím modifikují jejich funkci. [14]. Všechny tyto negativní projevy působení volných radikálů mohou způsobovat řadu patologických stavů nebo jsou tvořeny v důsledku působení tohoto stavu na organismus a způsobují sekundární poškození. [15].

6.2.3 Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivitu stanovujeme pomocí antioxidantů, které chrání organismy před negativními účinky volných radikálů. Antioxidanty jsou molekuly, které mohou zabraňovat nebo omezovat oxidační destrukci látek. [16] Tyto obranné mechanismy jsou

především enzymatické (superoxiddismutasa, glutathion peroxidasa, katalasa, glutathionreduktasa), ale částečně také neenzymatické povahy (α – tokoferol, kyselina L-askorbová, glutathion, koenzym Q10, flavonoidy, albumin, atd.). Princip tohoto obranného mechanismu spočívá ve schopnosti těchto sloučenin poskytnout volný radikál, který se sloučí za vzniku neutrální molekuly s reaktivním radikálem. [17]

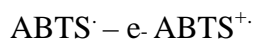
Antioxidační aktivita může být měřena chemickými nebo fyzikálními metodami. Chemické metody jsou založeny na použití činidel, která při chemické reakci s volnými kyslíkovými radikály tvoří různě barevné produkty, jejichž vzniku brání ve vzorku obsažené antioxidanty. Intenzita zbarvení vzorku se měří z pravidla spektrofotometricky. [14] V posledních letech vznikla celá řada metod umožňujících měření antioxidační aktivity. Tyto metody jsou principiálně odlišné a postupně dochází k vývoji jejich modifikací.

Obecně lze chemické metody pro stanovení antioxidační aktivity rozdělit do dvou základních skupin. První z nich je založena na eliminaci volného radikálu (ABTS, DPPH) a druhá je založena na hodnocení redoxních vlastností látek (FRAP, Free Radical).

Metody založené na eliminaci volného radikálu

Metoda ABTS

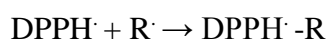
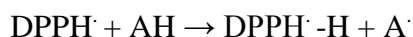
Metoda ABTS bývá označována také jako metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity). Jedná se o jednu ze základních a nejčastěji užívaných metod pro stanovení antioxidační aktivity. Tato metoda využívá zhášení radikálového kationu $ABTS^+$ (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)). [14]



Výsledná antiradikálová aktivita vzorku při měření metodou ABTS je srovnatelná s antiradikálovou aktivitou syntetické látky Troloxu (6 - hydroxy - 2,5,7,8-tetramethylchroman-2- karboxylová kyselina), kyseliny gallové (3,4,5-hydroxybenzoová kyselina) nebo kyseliny askorbové. Reakce probíhající při měření touto metodou jsou sledovány spektrofotometricky na základě změny absorpčního spektra. (nejčastěji se měří absorbance při 734 nm). [18]

Metoda DPPH

Tato metoda je určena především pro posuzování antiradikálové aktivity čistých látek i různých směsných vzorků. Je založena na reakci testované látky se stabilním radikálem 2,2-difenyl-1 pikrylhydrazylu. [18] Využívá podobně jako je tomu u metody ABTS zhášecí schopnosti radikálu DPPH, což je stabilní volný radikál, který může být díky své struktuře akceptorem atomu vodíku a přejít do formy stabilní diamagnetické molekuly. Z důvodu redukce radikálu dochází tedy ke vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). [14] Při tomto testu se po redukcí antioxidantem (AH) nebo radikálem (R·) roztok odbarví podle následující reakce [19]:



Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek

Metoda FRAP

Metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) spočívá v redukcí téměř bezbarvých, případně lehce nahnědlých železitých komplexů TPTZ (2,4,6-tripyridyl-S-triazin) s chloridem železitým (FeCl₃), které se účinkem redukce barví do modra za vzniku železnatého komplexu. [13] Tyto komplexy jsou spektrofotometricky měřitelné při vlnové délce 593nm. [18]

Nevýhodou metody FRAP jsou její limitní omezení spočívající v měření při nefyziologicky nízkých hodnotách pH (3,6) a v neschopnosti zachycení polyfenolických látek a thiolů, které s komplexem pomalu reagují. [18], [13]

Metoda Free Radical

Pro stanovení byl použit komerčně dodávaný kit od firmy Sedium, který obsahoval reakční pufr, koncentrát chlorofylu a katalyzátor. Tyto roztoky byly smíchány v poměru dle příbalového letáku. Stanovování volných radikálů metodou Free Radical spočívá ve schopnosti chlorofylinu, což je sodno-měďnatá sůl chlorofylu, odevzdávat a přijímat elektrony za současné stabilní změny absorpčního maxima. [13]

7. Explantátové kultury rostlin

Explantátové kultury rostlin jsou izolované rostlinné orgány, pletiva nebo buňky pěstované *in vitro* za sterilních specifických podmínek na zvláštních živných půdách (obr. 6). Pro odvozování explantátových kultur je v podstatě vhodné jakékoli rostlinné pletivo, které obsahuje buňky s funkčním jádrem. Získávají se oddělením určité části rostliny (listu, stonku, kořene, atd.) a umístěním na živnou půdu (médiu). Tato půda obsahuje zdroj energie, výživy a regulačních látek, které stimulují tvorbu explantátové kultury (fytohormony). [20]

Explantátové kultury nacházejí své využití v oboru rychlého klonování, množení a šlechtění rostlin, dále se mohou využívat k fyziologickým, biochemickým, genetickým, anebo morfologickým studiím. Také nám pomohou v proteomických a genomických studiích lépe pochopit rozdíly mezi liniemi na kontaminant tolerantními a na kontaminant citlivými.



Obr. č. 6: Explantátová kultura slunečnice roční.

7.1 Metody získávání explantátových kultur

Celý vývoj rostlin v podmínkách *in vitro* se dá rozdělit na 4 základní fáze. Vývoj začíná první fází, při které dojde k odvození sterilní kultury tzv. primokultury. Primokultura se vytvoří po odebrání vhodného explantátu, který je následně sterilizován a kultivován na živném médiu. Růst a vývoj explantátu ovlivňuje roční období jeho odebrání. Dojde totiž ke změně teploty, délky dne, hladiny osvětlení atd.

Odvozené explantáty z mateřských rostlin následně prochází druhou fází. Jedná se o tzv. proliferační fázi. Jak již z názvu vyplývá, je tato fáze spojená s množением a snahou získat co nejvíce nových explantátů. Proliferační fáze se může opakovat, anebo následuje fáze třetí.

V této fázi dochází k zakořeňování, které může probíhat v podmínkách *in vitro* nebo *in vivo*. Při zakořeňování v podmínkách *in vivo* však vzniká velmi často problém a to z důvodu nevyvinutého kořenového vlášení a celkové křehkosti kořene. Při snaze přenést rostlinu do půdy dochází k jejich lámání.

Při poslední čtvrté fázi již dochází k přemístění kultury do podmínek *in vivo*. [21]

8. Spektrofotometrie

V oblasti chemických analýz patří spektrofotometrie k nejrozšířenějším metodám, jelikož se jedná o časově nenáročnou, vysoce citlivou a specifickou metodu. Jde o optickou metodu založenou na absorpci záření z oblasti UV (ultrafialového spektra) případně VIS (viditelného spektra) molekulami analytu v roztocích.

Princip spektrofotometrie spočívá v interakci elektronů umístěných v orbitalech molekuly s fotony UV – VIS záření (200 – 800 nm). Pomocí energie tohoto záření dochází k excitaci elektronů v orbitalech na vyšší excitační hladinu. Současně dojde k absorpci záření o konkrétní vlnové délce. Absorbuje se vždy ta část elektromagnetického záření, která svou energií odpovídá excitační energii potřebné k přechodu elektronu na vyšší excitační hladinu. [22]

Ke spektrofotometrickému stanovení analytu dochází v případě, že alespoň část molekuly analytu absorbuje UV nebo VIS záření. Za tuto absorpci jsou odpovědné tzv. chromofory, což jsou atomy nebo funkční skupiny analytu. Tyto chromofory jsou přítomny především v organických látkách, avšak spektrofotometrická měření se často využívají také pro stanovení anorganických látek, především kovů. Ty však ve většině případů (až na některé barevné kovové ionty) neobsahují vhodný chromofor. Z tohoto důvodu dochází k reakci kovových iontů s vhodnými organickými komplexotvornými činidly, díky kterým dojde ke vzniku barevného komplexu absorbujícího VIS záření. [22]

Absorpce UV – VIS záření je popsána pomocí Lambert – Beerova zákona, který říká, že intenzita zabarvení roztoku (měřená jako absorbance A) dané sloučeniny je při konstantní tloušťce vrstvy měřeného roztoku d (rozměr kyvety) a konstantní vlnové délce záření přímo úměrná molární koncentraci c barevné sloučeniny v roztoku. [22]

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

, kde ε je molární absorpční dekadický koeficient [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]. V případě, že je absorpce záření nulová, je nulová také absorbance.

9. Program *STATISTICA*

Software *STATISTICA* je komplexní systém obsahující prostředky pro správu dat, jejich analýzu, vizualizaci a vývoj uživatelských aplikací. Program nám nabízí řadu základních i pokročilých technik speciálně vyvinutých pro podnikání, vytěžování dat, vědu a inženýrské aplikace. (www.statsoft.cz)

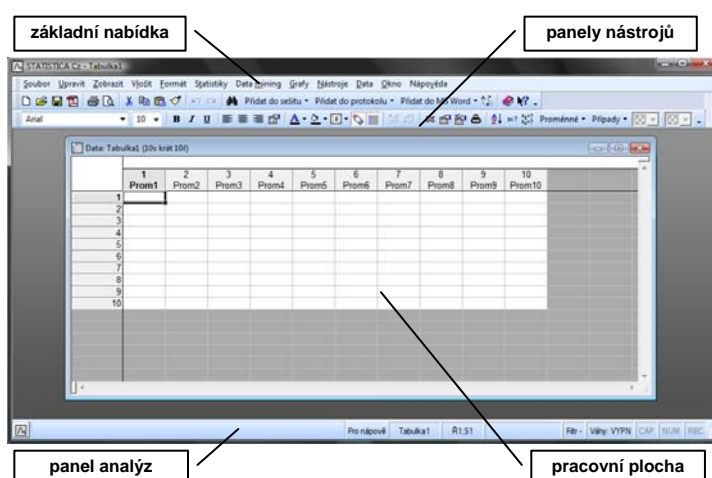
Produkty řady *STATISTICA* našly uplatnění v celé řadě nejrůznějších výrobních podniků, výzkumných oborů či služeb, v oblasti vzdělávání, finančních institucí u těch nejvýznamnějších světových firem a korporací. (www.statsoft.cz)

9.1. Základní funkce programu

Práce v programu je poměrně snadná a intuitivní. Cílem následujících kapitol bude seznámení se základními možnostmi ovládání programu, jako je například import různých druhů dat, vytváření grafů, spouštění analýz a další. [23]

9.1.1. Spuštění programu

Po prvotním spuštění programu se zobrazí uvítací dialog, pomocí něhož můžeme otevírat soubory. V dolní části dialogu se nám nabízí možnost načtení naposledy otevřených souborů, pokud jsme již dříve s tímto programem pracovali. V případě, že si nepřejeme zobrazení dialogu při následujících spouštěních programu, zvolíme *Příště tento dialog nezobrazovat*. [23]



Obr. č. 7: Okno aplikace *STATISTICA*.

Po zavření úvodního dialogu se nám zobrazí okno samotné aplikace *STATISTICA* (obr. 7). Pro práci v tomto okně zde nalezneme základní nabídku, která slouží k ovládní systému a zpřístupňuje nám všechny nástroje programu. Pro jednodušší přístup k různým příkazům se zde nachází panely nástrojů. Další součástí okna je panel analýz, který v levém dolním rohu obsahuje tlačítko pro rychlé zpřístupnění často používaných nástrojů. Jsou zde také minimalizována okna všech spuštěných analýz, což nám umožňuje přepínání mezi nimi. [23]

9.1.2. Vstupní data

Data pro samotnou analýzu lze získat několika způsoby:

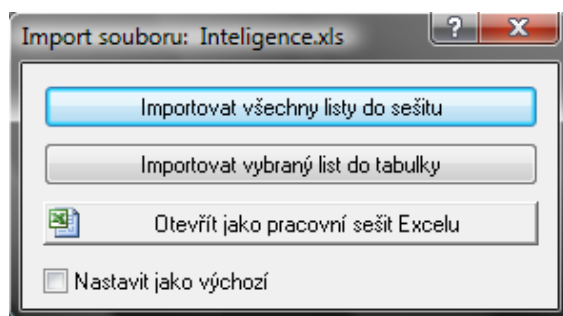
1. importováním již dříve uložených souborů různých formátů
2. otevřením tabulky Microsoft Excel přímo v programu *STATISTICA* bez importu
3. vložením nových dat do tabulky v programu *STATISTICA*
4. sběrem dat on-line

Ve všech následujících praktických modelových ukázkách budeme pracovat s daty obsaženými v souboru *Slunečnice-antioxidační ukazatele.xls*. Data byla získána spektrofotometrickým měřením explantátové kultury slunečnice, která byla ovlivňována různými koncentracemi kademnatých iontů. Měřením byla stanovována antioxidační aktivita pomocí metod ABTS, FRAP, Free Radical a DPPH. Soubor obsahuje tři listy – *Data*, *Dny* a *Koncentrace*. Na listu s názvem *Data* se nacházejí všechna data bez ohledu na den měření nebo koncentraci kovu, list *Dny* obsahuje data sečtená v jednotlivých dnech měření bez ohledu na koncentraci a naopak list *Koncentrace* je tvořen daty sečtenými v koncentracích 0, 5, 10, 50, 100 a 500 μM , bez zohlednění dne měření.

Ze všech způsobů získávání dat si ukážeme *import dat z Excelu* a *otevření tabulky Microsoft Excel bez importu*. [23]

Ukázka 1 – import dat z Excelu

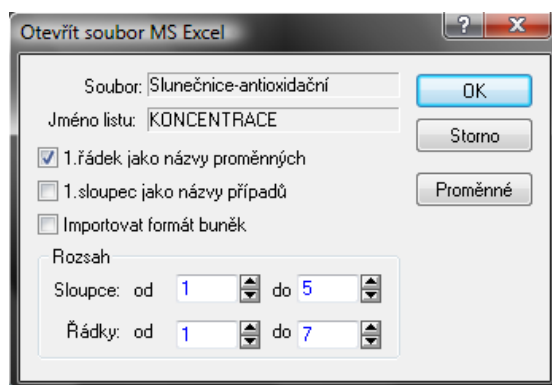
V základní nabídce zvolíme *Soubor* → *Otevřít*. Zobrazí se nám okno ve kterém zvolíme *Soubory typu*: nastavíme formát *Excel soubory (*.xls)*. Poté již vyhledáme soubor *Slunečnice-antioxidační ukazatele.xls* a otevřeme jej.



Obr. č. 8: Volba importu.

Zvolíme *Importovat vybraný list do tabulky* (obr. 8). Jelikož má importovaný soubor více než jeden list, zobrazí se nám ještě výběr mezi listy *Data*, *Dny* a *Koncentrace*. Zvolíme list *Koncentrace*.

Zobrazí se nám dialog *Otevřít soubor MS Excel* (viz. obr. 9). Zvolíme zde volbu *1. řádek jako názvy proměnných*.



Obr. č. 9: Pojmenování proměnných.

Po potvrzení tlačítkem *OK* se zobrazí nová tabulka, která je již ve formátu **.sta* (obr. 10). Tímto se dá import dat tohoto typu pokládat za dokončený.

	1	2	3	4	5
	sečtené koncentrace	ABTS	FRAP	FREE	DPPH
1	0	169.0114	50.75206	405.7486	3.402077
2	5	174.7531	57.45021	417.0902	4.94067
3	10	175.4452	61.94544	407.7597	5.672831
4	50	194.2175	74.46774	457.1455	5.511275
5	100	191.4012	79.84547	432.9027	5.456005
6	500	181.9173	73.91696	447.0638	5.404442

Obr. č. 10: Data ve formátu **.sta*.

Ukázka 2 - otevření tabulky Microsoft Excel bez importu

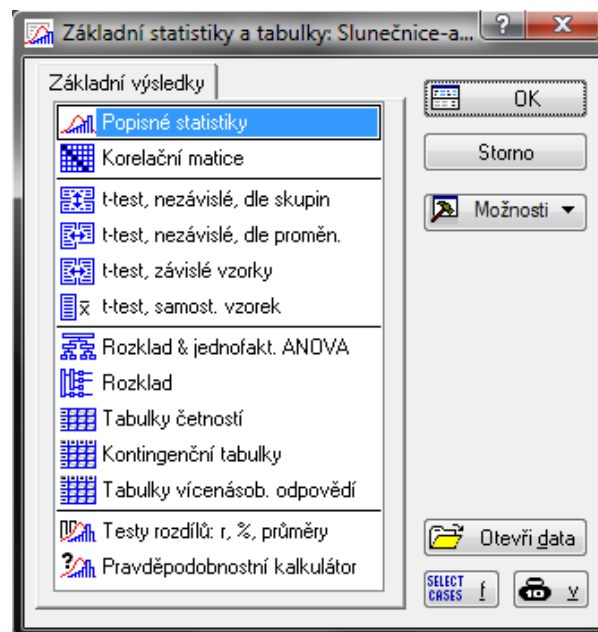
Počáteční postup je obdobný jako u ukázky 1, až na volbu importu dat. V okně *Import souboru* zvolíme *Otevřít jako pracovní sešit Excelu*. Vzniklá pracovní plocha vypadá jinak než v prvním případě a její výhoda spočívá v možnosti kombinace funkcí programů *MS Excel* a *STATISTICA*. [23]

9.1.3. Analýza dat

Ukázka 3 – výpočet popisných statistik

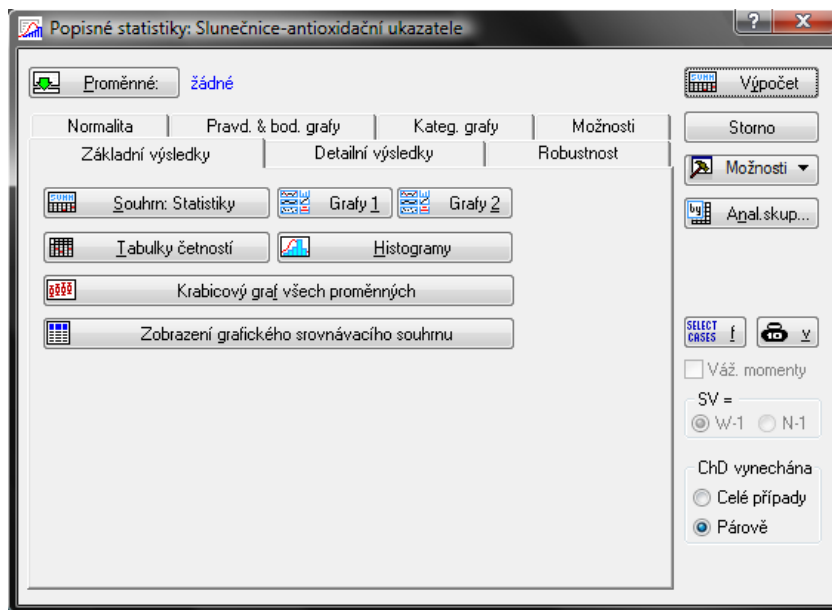
Na otevřené tabulce *Slunečnice-antioxidační ukazatele.sta*, kterou jsem si vytvořili při importu dat u ukázky 1, si ukážeme výpočet popisných statistik pro proměnné *ABTS* a *FRAP*.

V okně aplikace *STATISTICA* v základní nabídce zvolíme záložku *Statistiky* → *Základní statistiky/tabulky* (viz. obr. 7). [23]



Obr. č. 11: Základní statistiky a tabulky.

Zde vybereme *Popisné statistiky* a potvrzením přejdeme do okna vlastní analýzy (obr. 11).



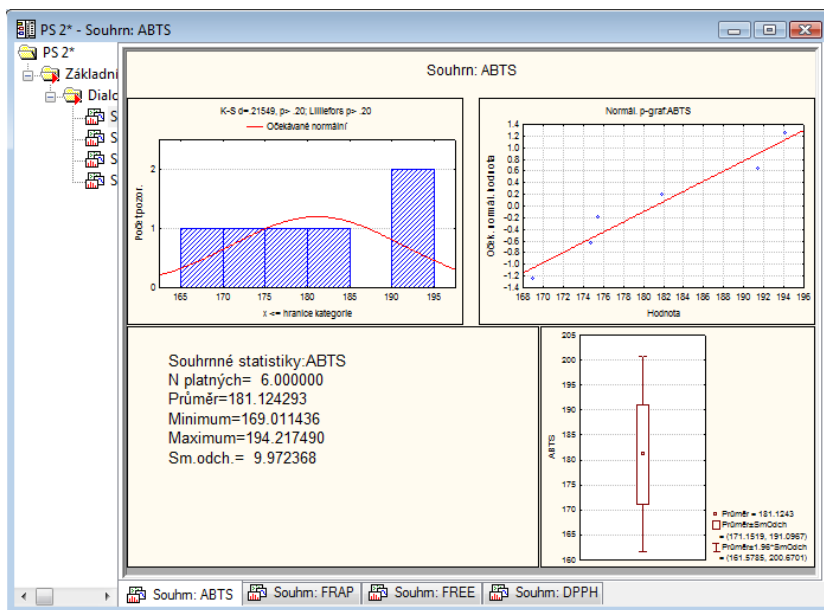
Obr. č. 12: Volba popisných statistik.

Zobrazený dialog obsahuje celou řadu záložek sloužících pro tvorbu grafů a výpočet různých popisných statistik. Máme možnost se zabývat podrobným nastavením nebo můžeme pouze zvolit ikonu *Výpočet* a program nás provede sám jednotlivými kroky potřebnými pro výpočet základních popisných statistik (obr. 12). Prvně musíme zvolit proměnné, které chceme analyzovat. V našem případě to bude *ABTS* a *DPPH* (obr. 13). [23]

Proměnná	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Sm.odch.
ABTS	6	181.1243	169.0114	194.2175	9.972368
DPPH	6	5.0645	3.4021	5.6728	0.850588

Obr. č. 13: Tabulka s výsledky popisných statistik.

Dosažené výsledky se dají doplnit také přímo grafickým zobrazením naměřených hodnot různými způsoby (obr. 14). V našem případě se jedná o histogram, bodový a krabicový graf. Dosáhneme toho obnovením dialogu *Popisné statistiky*, který je minimalizován na panelu analýz a zvolením možnosti *Souhrn: Grafy* (viz. obr. 12).



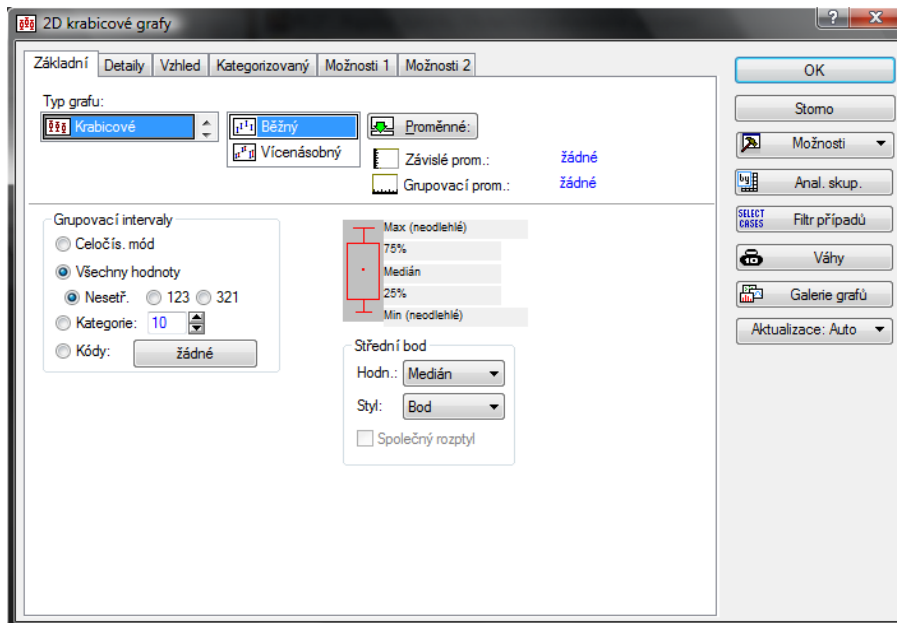
Obr. č. 14: Souhrnné grafické zobrazení sledovaných dat.

9.1.4. Grafické znázornění dat

V případě, že chceme sestavit pouze určitý typ grafu, místo souhrnného grafického přehledu, musíme postupovat následovně. Pro zobrazení kompletní nabídky grafů musíme zvolit v základní nabídce záložku *Grafy*. Zde se nachází široký výběr nejrůznějších grafických zobrazení. Ukážeme si postup sestavení například 2D krabicového grafu. [23]

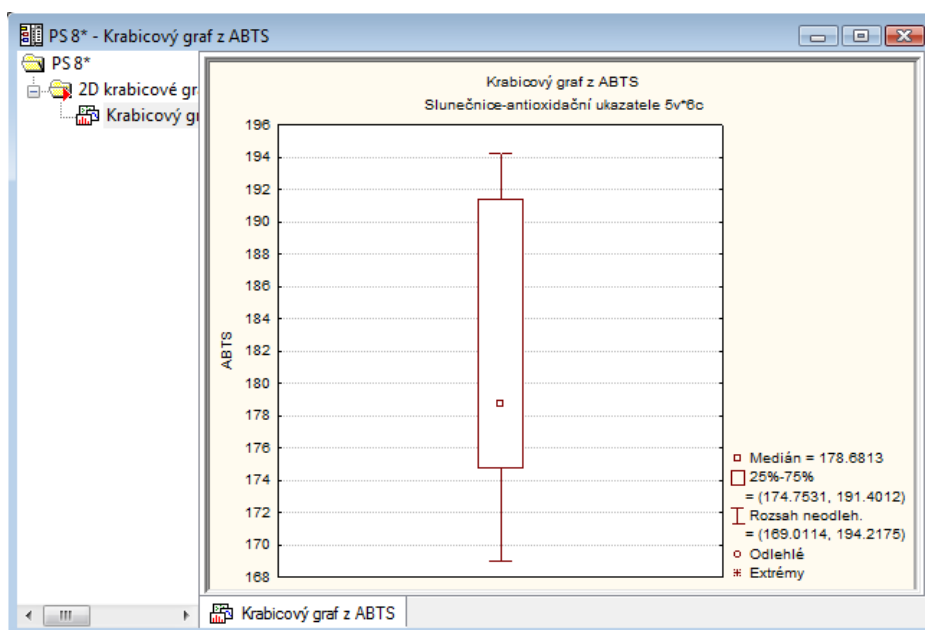
Ukázka 4 – sestavení krabicového grafu

Budeme opět pracovat s tabulkou dat *Slunečnice-antioxidační ukazatele.sta* (viz. obr. 10). Sestojíme si krabicový graf znázorňující například parametry metody *ABTS* z listu *Koncentrace*. V základní nabídce zvolíme *Grafy* → *2D grafy* → *Krabicové grafy*. Zobrazí se nám následující okno:



Obr. č. 15: Nastavení parametrů krabicového grafu.

Máme opět možnost si individuálně nastavit jednotlivé parametry krabicového grafu nebo pokračovat bez nastavení a program nás sám provede jednotlivými kroky sestavení grafu (obr. 15). Po potvrzení si již jen zvolíme parametry, které chceme vykreslit. [23]



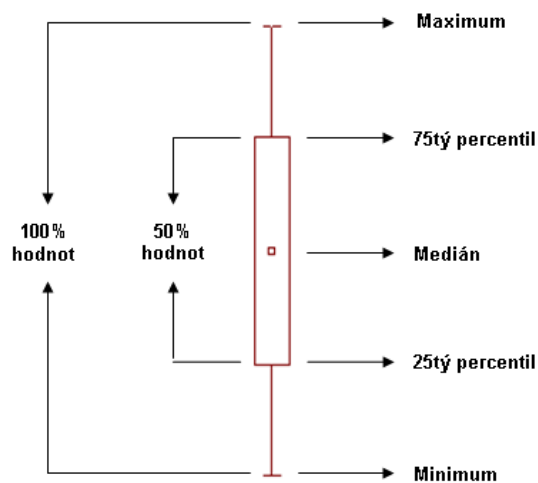
Obr. č. 16: Výsledný krabicový graf.

Zobrazil se nám přehledný krabicový graf, který nám zobrazuje všechny hodnoty naměřené při měření metodou ABTS v jedné „krabici“. V pravém dolním rohu vidíme legendu, která vysvětluje důležité symboly vyskytující se v grafu (obr. 16).

Výše uvedené kapitoly stručně popisují to nejzákladnější ovládání programu *STATISTICA* a slouží k usnadnění orientace v něm. Provádí nás analýzou dat od jejich vstupu do programu, až po jejich vyhodnocení a grafické zobrazení.

9.2 Krabicový graf

K vyhodnocování a grafickému znázornění získaných dat budeme používat krabicové grafy. Krabicové grafy jsou vynikajícím nástrojem pro vizualizaci rozložení dat ve zkoumaných vzorcích. Dokážeme díky němu vidět jednoduchým grafickým znázorněním i složitější vztahy ve zkoumaných vzorcích. Poskytuje nám informace o nejvyšší (maximální) a nejnižší (minimální) hodnotě, o rozsahu hodnot mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou (nazývaný rozpětí) a také o tzv. mediánu.



Obr. č. 17: Popis významných parametrů krabicového grafu.

Medián nám určuje střední hodnotu skupiny dat. Pro medián platí, že ze všech naměřených hodnot je 50% vyšších a 50% nižších. Někdy dochází k zaměňování mediánu za průměr, tyto dvě hodnoty se však shodují jen ve výjimečných případech.

Celý krabicový graf se rozděluje v podstatě na 3 kvartily (obr. 17). Na obrázku můžeme pozorovat tzv. 50% hodnot, kterým se říká jinak také mezikvartilové rozpětí. Tato „prostřední“ část krabicového grafu leží mezi 75-tým percentilem, nad nímž se

nachází 25% nejvyšších naměřených hodnot (1. kvartil) a 25-tým percentilem, pod nímž leží 25% nejnižších hodnot (3. kvartil).

V případě potřeby bývá krabicový graf doplněn také o indikaci extrémních hodnot. Tyto hodnoty jsou graficky znázorněny symbolem, avšak jejich hodnoty nejsou brány v úvahu aby nedošlo k deformaci samotného grafu.

10. Výsledky

10.1 Popis experimentu

Cílem naší práce bylo sledovat stresové markéry rostlin, které byly vystaveny účinkům těžkých kovů. Měření byla prováděna na explantátové kultuře slunečnice roční kultivaru Aloha. Na tuto explantátovou kulturu působily kademnaté ionty o koncentracích 0, 5, 10, 50, 100 a 500 μM .

Explantátová kultura byla odvozena následujícím způsobem. Namořené komerčně dodávané nažky slunečnice roční kultivaru Aloha byly vydezinfikovány v roztoku chlornanu sodného (20% v/v, po dobu 20 min.), následně několikrát omyty ve sterilizované destilované vodě a vysazeny na kultivační médium Murashige a Skoog [24] bez růstových regulátorů. Osm dnů stará rostlina byla rozdělena na části (kořeny, hypokotyl a listy) a ty byly pěstovány na modifikovaném MS médium doplněném o 5 g/l KNO_3 , 0,5% (w/v) polyvinylpyrrolidonu (PVP), 2,7 μM α -naftyloctovou kyselinu (NAA), 2,2 μM 6-benzylaminopurin (BAP), a 0,2 μM gyberelovou kyselinu (GA3), upraveného na pH 5,7. Explantáty byly kultivovány při 24 ± 1 °C s fotoperiodou 16 h a intenzitou světla 93 ± 1 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$. [25]

Pro analýzu byly zpracovány vzorky explantátové kultury. Navážky o hmotnosti přibližně 0,2 g byly homogenizovány pomocí homogenizační vrtačky (ULTRA-TURRAX T8, IKA, Německo) za stálého chlazení s přídavkem 1 ml 0,2 M fosfátového pufru, pH 7. Pevný podíl byl odstraněn centrifugací (Eppendorf 5402, USA) po dobu 30 min při 16000 g při 4 °C. Takto připravený kapalný vzorek byl podroben analýze.

Prováděli jsme měření antioxidační aktivity užitím metod ABTS, FRAP, Free Radical a DPPH. Naměřená data byla statisticky zpracována v programu STATISTICA a následně vynesena do grafů.

10.2 Popis měření

Spektrofotometrické analýzy byly provedeny na automatickém chemickém analyzátoru BS – 200 (obr. 18). Reagencie a vzorky byly umístěny v podavači vzorků chlazeném na 4°C. Z podavače byly vzorky pipetovány přímo do plastových kyvet. Inkubace probíhala při 37°C. Každá kyveta byla přidána reagentem či vzorkem a promíchána. Celý přístroj byl ovládán softwarem BS – 200.



Obr. č. 18: Automatický chemický analyzátor BS – 200.

10.2.1 Postup měření automatickým analyzátozem pro metodu ABTS

Do plastových kyvet bylo pipetováno 245 μ l reagentie, následně bylo přidáno 5 μ l vzorku (kyselina gallová, trolox). Absorbance byla měřena při vlnové délce 670nm po dobu 1520 sekund. Pro výpočet bylo použito hodnoty před poklesem absorbance (14. cyklus měření, 224 sekunda – A_{14}). Výsledná hodnota se vypočítá dle vzorce pro změnu absorbance (%) = $100 - [(A_{95}/A_{14}) * 100]$. [13]

10.2.2 Postup měření automatickým analyzátozem pro metodu FRAP

Do plastových kyvet bylo pipetováno 200 μ l reagentie, následně bylo přidáno 20 μ l měřeného vzorku (kyselina gallová, trolox). Absorbance byla měřena po dobu 1520 sekund při primární vlnové délce 604 nm. [13]

10.2.3 Postup měření automatickým analyzátozem pro metodu DPPH

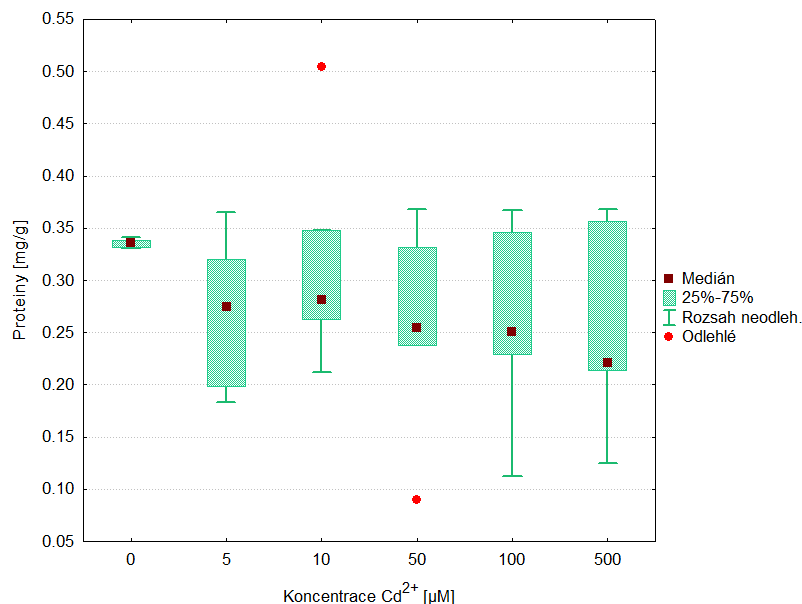
Do plastových kyvet bylo pipetováno 200 μ l reagentie, následně bylo přidáno 20 μ l měřeného vzorku (kyselina gallová, trolox). Absorbance byla měřena při vlnové délce 515nm po dobu 1520 sekund. Pro výpočet bylo použito hodnoty před poklesem absorbance (14. cyklus měření, 224 sekunda – A_{14}). Výsledná hodnota se vypočítá dle vzorce pro změnu absorbance (%) = $100 - [(A_{95}/A_{14}) * 100]$. [13]

10.2.4 Postup měření automatickým analyzátozem pro metodu FREE

Pro stanovení byl použit komerčně dodávaný kit od firmy Sedium, který obsahoval reakční pufr, koncentrát chlorofylu a katalyzátor. Tyto roztoky byly smíchány v poměru dle příbalového letáku. Do plastových kyvet bylo pipetováno 200 μ l reagentie, následně bylo přidáno 8 μ l měřeného vzorku (kyselina gallová, trolox). Absorbance byla měřena 35 cyklů (560 sekund) při vlnové délce 450nm. Pro výpočet byla použita poslední hodnota měření.

10.3 Vyhodnocení získaných výsledků

10.3.1 Spektrofotometrické stanovení proteinů ve vzorku

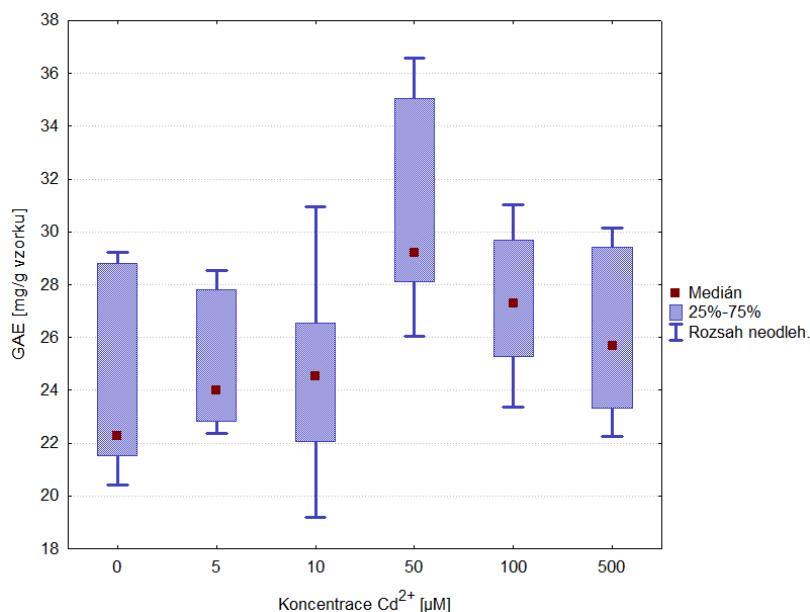


Graf č. 1: Grafické znázornění obsahu proteinů ve vzorku při různých koncentracích kademnatých iontů..

Před samotným měřením antioxidační aktivity vzorků slunečnice roční, jsme stanovili pomocí spektrofotometrického měření celkový obsah proteinů při měnících se koncentracích kademnatých iontů. Z výsledků je patrné, že při nulové koncentraci je ve všech dnech měření zanedbatelné rozpětí naměřených hodnot.

Podle pozice hodnot mediánu můžeme z grafu usoudit, že při narůstající koncentraci kademnatých iontů dochází k pozvolnému úbytku množství proteinů ve vzorku a to již od nejnižší aplikované koncentrace kademnatých iontů 5µM (graf 1).

10.3.2 Vyhodnocení dat naměřených metodou ABTS

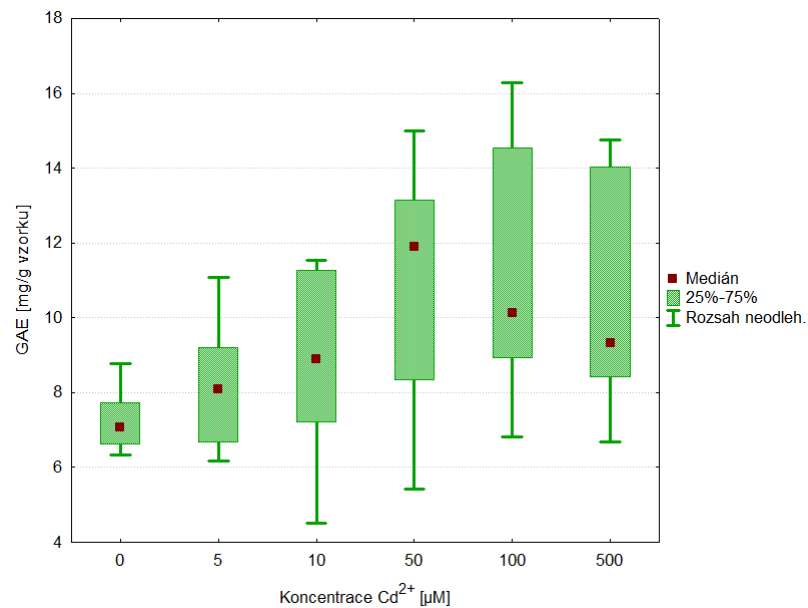


Graf č. 2: Krabicový graf znázorňující změny antioxidační aktivity měřené metodou ABTS při účincích různých koncentrací kadmennatých iontů.

Z grafu č. 2 vyplývá, že hodnota mediánu narůstala po koncentraci 50μM. Z toho můžeme usuzovat, že k této koncentraci docházelo k nárůstu antioxidační aktivity vzorku. Po překročení této koncentrace začala střední hodnota klesat. Na koncentraci 50μM se nachází také nejvyšší naměřená hodnota antioxidační aktivity ze všech koncentrací.

Každá zkoumaná koncentrace obsahuje data ze 7 dnů měření. Pozorujeme, že u koncentrací 10μM a 50μM jsou naměřené hodnoty v největším rozpětí, což se dá vysvětlit velmi rozdílnou antioxidační aktivitou v jednotlivých dnech stanovování a naopak v koncentracích 5μM a 100μM je rozpětí nejnižší.

10.3.3 Vyhodnocení dat naměřených metodou FRAP

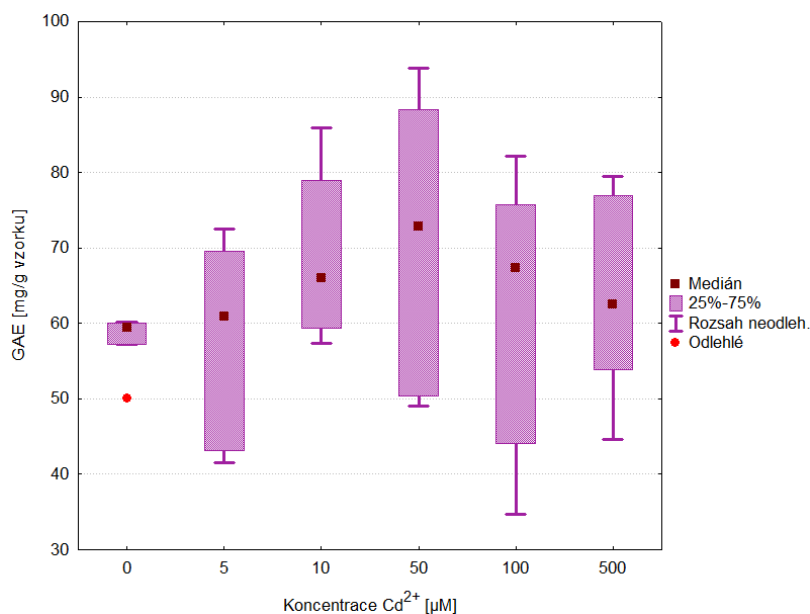


Graf č. 3: Krabicový graf znázorňující změny antioxidační aktivity měřené metodou FRAP při účincích různých koncentrací kademnatých iontů.

Na grafu č. 3 pozorujeme obdobně jako u metody ABTS nárůst hodnoty mediánu po koncentraci 50µM. Po překročení této hodnoty začne docházet k poklesu mediánu.

Rozpětí naměřených hodnot se v případě měření antioxidační aktivity metodou FRAP v žádné koncentraci kademnatých iontů příliš nevychyluje, až na rozpětí v koncentraci 0µM, které je jednoznačně nejnižší. Je to způsobeno tím, že se jedná o kontrolní vzorky.

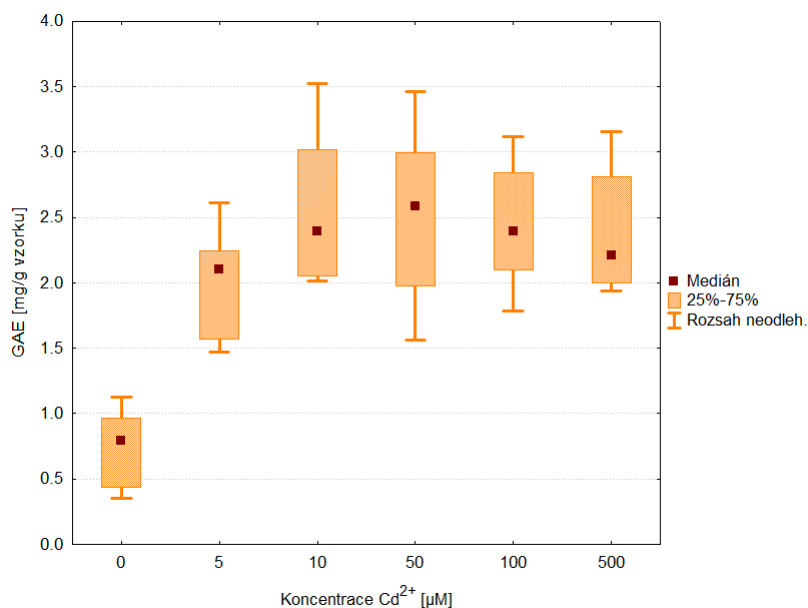
10.3.4 Vyhodnocení dat naměřených metodou FREE



Graf č. 4: Krabicový graf znázorňující změny antioxidační aktivity měřené metodou Free Radical při účincích různých koncentrací kadmennatých iontů.

Na grafu č. 4 pozorujeme obdobně jako u metody ABTS a metody FRAP růst mediánu naměřených hodnot antioxidační aktivity. Rozpětí naměřených hodnot je nejvyšší v koncentracích 50 a 100 µM. U koncentrace kovu 0 µM se vyskytuje symbol odlehlé hodnoty, který je v grafu pouze zaznačen, ale z důvodu možnosti zkraslení grafického znázornění není tato naměřená hodnota započítána mezi ostatní. Nejvyšší hodnota antioxidační aktivity je změřena při koncentraci 50 µM a nejnižší při 100 µM.

10.3.5 Vyhodnocení dat naměřených metodou DPPH



Graf č. 5: Krabicový graf znázorňující změny antioxidační aktivity měřené metodou DPPH při účincích různých koncentrací kademnatých iontů.

U grafu č. 5 při měření antioxidační aktivity metodou DPPH můžeme na první pohled vyčíst rozdíl mezi vzorky, které byly ovlivněny kademnatými ionty a kontrolou. U kontaminovaných vzorků jsou v porovnání s kontrolou výrazně vyšší hodnoty antioxidační aktivity.

O hodnotě mediánu můžeme tvrdit stejně jako u předchozích metod měření, že po hodnotu koncentrace kademnatých iontů 50µM stoupá a po překročení této hranice dochází k jejímu poklesu.

Nejvyšší hodnota antioxidační aktivity byla naměřena pro koncentraci 10µM a největší rozpětí naměřených hodnot registrujeme pro koncentraci 50µM.

11. Závěr

Cílem naší práce bylo sledovat změny stresových markerů při ovlivňování explantátové kultury slunečnice roční různými koncentracemi kademnatých iontů. Zaměřili jsme se na sledování antioxidační aktivity. Ke stanovení antioxidační aktivity byly užity metody ABTS, FRAP, Free Radical a DPPH.

Nejdřív byl změřen celkový obsah proteinů ve vzorku. Zjistili jsme, že obsah proteinů klesá v porovnání s kontrolou již od koncentrace $5\mu\text{M}$ a pokles s rostoucí koncentrací dále pokračuje. Můžeme tedy tvrdit, že s rostoucí koncentrací kademnatých iontů dochází ke snižování celkového obsahu proteinů.

Z výsledků je patrné, že u všech vzorků docházelo do koncentrace $50\mu\text{M}$ k růstu antioxidační aktivity. Po překročení této koncentrace začalo docházet k jejímu poklesu. Můžeme tedy usuzovat, že po koncentraci $50\mu\text{M}$ je rostlina schopna odolávat negativním účinkům kademnatých iontů, ale po jejím překročení již dochází k pozvolnému odumírání živých buněk a následné smrti celé rostliny.

12. Seznam literatury

- [1] B. Rychlíková *Průmysl a životní prostředí*, (1994).
- [2] K. Gulati, B. Banerjee, S.B. Lall and A. Ray Effects of diesel exhaust, heavy metals and pesticides on various organ systems: Possible mechanisms and strategies for prevention and treatment, *Indian Journal of Experimental Biology* 48 (2010) 710-721.
- [3] P. Tomeček *Současné problémy životního prostředí a možnosti jejich řešení*, (1998).
- [4] M. Herčík *111 otázek a odpovědí o životním prostředí*, (2004).
- [5] P.C. Nagajyoti, K.D. Lee and T.V.M. Sreekanth Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review, *Environmental Chemistry Letters* 8 (2010) 199-216.
- [6] O. Krystofova, J. Zehnalek, V. Adam, L. Trnkova, P. Babula and R. Kizek Effect of cadmium(II) ions on sunflower callus culture, *Listy Cukrovarnicke a Reparske* 126 (2010) 408-408.
- [7] V. Bencko and M. Cikrt *Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka*, (1995).
- [8] G. DalCorso, S. Farinati, S. Maistri and A. Furini How plants cope with cadmium: Staking all on metabolism and gene expression, *Journal of Integrative Plant Biology* 50 (2008) 1268-1280.
- [9] J. Gloser, L. Havel, J. Kerkule, I. Macháčková, L. Nátr, I. Prášil, S. Procházka, Z. Sladký, J. Šantrůček, J. Šebánek, M. Tesařová and B. Vyskot *Fyziologie rostlin*, (1998).
- [10] S. Procházka, I. Macháčková, J. Kerkule and J. Šebánek *Fyziologie rostlin*, (2003).
- [11] W. Larcher *Physiological plant ecology*, (1995).
- [12] P. Tlustoš, D. Pavlíková and J. Balík *Mechanismus příjmu rizikových prvků rostlinami a jejich hromadění v biomase*, (2006).
- [13] J. Sochor, M. Ryvolova, O. Krystofova, P. Salas, J. Hubalek, V. Adam, L. Trnkova, L. Havel, M. Beklova, J. Zehnalek, I. Provaznik and R. Kizek Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages, *Molecules* 15 (2010) 8618-8640.
- [14] M. Fidler, Kolářová, L., Holčapek, M. *Analýza antioxidantů v chmelu a pivu*, (2007).
- [15] Z. Gazdik, B. Krska, V. Adam, J. Saloun, T. Pokorna, V. Reznicek, A. Horna and R. Kizek Electrochemical Determination of the Antioxidant Potential of Some Less Common Fruit Species, *Sensors* 8 (2008) 7564-7570.
- [16] M. Fidler, Kolářová, L. *Analýza antioxidantů v chmelu a pivu*, (2009).
- [17] H.B. Shao, L.Y. Chu, Z.H. Lu and C.M. Kang Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells, *International Journal of Biological Sciences* 4 (2008) 8-14.
- [18] H. Paulová, H. Bochořáková and E. Táborská *Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro*, (2004).
- [19] L. Parejo, C. Codina, C. Petrakis and P. Kefalas Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH center dot (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 44 (2000) 507-512.
- [20] J. Šebánek and Z. Sladký *Biotechnologie rostlinných explantátů*, (1988).

- [21] J. Kováč Explantátové kultury rostlin, (1995).
- [22] P. Klouda Moderní analytické metody, (2003).
- [23] P. Beranová Stručný manuál k ovládní programu STATISTICA, (2008) 16.
- [24] T. Murashige and F. Skoog A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.* 15 (1962) 473-497.
- [25] C. Santos and G. Caldeira Callus formation and plant regeneration from protoplasts of sunflower calli and hypocotyls, *Acta Soc. Bot. Pol.* 67 (1998) 31-36.