



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

# FYTOTOXICITA VYBRANÝCH NAFTOCHINONU NA VYBRANÉM ROSTLINNÉM MODELU

PHYTOTOXICITY OF SELECTED NAPHTHOQUINONES ON A SELECTED PLANT MODEL

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. JAKUB RUCKÝ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. IVO PROVAZNÍK, Ph.D.

BRNO 2013



VYSOKÉ UČENÍ  
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky  
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

# Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor  
**Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**

**Student:** Bc. Jakub Rucký

**ID:** 115113

**Ročník:** 2

**Akademický rok:** 2012/2013

## NÁZEV TÉMATU:

**Fytotoxicita vybraných naftochinonů na vybraném rostlinném modelu**

## POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Prostudujte problematiku fytotoxicity vybraných naftochinonů na rostlinném modelu (*Hypericum perforatum* L.), zejména s ohledem na allelopatické působení těchto látek. Zaměřte se na kořen jako orgán, který zabezpečuje příjem látek z půdního roztoku. 2) Navrhněte metody určení cytotoxicity, a to s ohledem na vybrané biochemické (antioxidační enzymy) nebo cytologické (změny v buněčné struktuře, programovaná buněčná smrt), zvláštní zřetel věnujte změnám v anatomické stavbě kořene a programované buněčné smrti. 3) Navrhněte experimentální protokol a vyberte parametry, které budou měřeny či sledovány. 4) Proveďte mikroskopickou analýzu zvolenou metodou s využitím fluorescenční/konfokální mikroskopie. 5) Vyhodnoťte také změny v syntéze sekundárních metabolitů (celkové polyfenoly, HPLC analýza). 5) Vyhodnoťte výsledky ve formě uceleného souboru informací o fytotoxicitě zvolených látek a o mechanismu jejich účinku. 6) Výsledky diskutujte.

## DOPORUČENÁ LITERATURA:

- [1] BABULA, P., ADAM, V., HAVEL, L., KIZEK, R. Noteworthy Secondary Metabolites Naphthoquinones - their Occurrence, Pharmacological Properties and Analysis. *Current Pharmaceutical Analysis*. 2009, roč. 5, č. 1, s. 47-68. ISSN 1573-4129.
- [2] BABULA, P., ADAM, V., KIZEK, R., SLADLY, Z., HAVEL, L. Naphthoquinones as allelochemical triggers of programmed cell death. *Environmental and Experimental Botany*. 2009, roč. 65, č. 2-3, s. 330-337. ISSN 0098-8472.

**Termín zadání:** 11.2.2013

**Termín odevzdání:** 24.5.2013

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

**Konzultanti diplomové práce:**

**prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.**

*Předseda oborové rady*

# Abstrakt

Úvodní část mé diplomové práce je zaměřena na teoretický rozbor řešené problematiky, jako je zkoumání toxicity naftochinonů plumbagin a juglon a to především s ohledem na jejich alelopatické působení. Další část se zaměřuje na stres rostlin, vyvolaný působením stresových faktorů, vedoucí až k jejich úhynu. Je zde rozebrán experimentální protokol a možnosti stanovení vlivu naftochinonů na rostlinný model. Experimentální část pojednává o měnících se růstových parametrech rostlinných vzorků, v závislosti na různých koncentracích naftochinonu. Je zkoumána životaschopnost buněk a změny v syntéze sekundárních metabolitů. Data získaná pomocí spektrofotometrické a mikroskopické analýzy jsou vyhodnocena pomocí softwaru STATISTICA a statistické významnosti jsou vyneseny do grafů.

## Klíčová slova

Naftochinony, juglon, stres rostlin, fluorescenční mikroskopie, spektrofotometrická analýza.

## Abstract

The introductory part of this thesis is focused on the theoretical analysis of solved problems as examining the toxicity of naphthoquinones plumbagine and juglone, especially with regard to their allelopathic action. The next section is focuses on the plant stress, caused by the action of stress factors leading to their death. There is an experimental protocol and the possibilities of determination the effect of naphthoquinones on the plant model. Experimental section discusses changing growth parameters of the plant samples in different concentrations of the naphthoquinone. There is examined cell viability and changes in the synthesis of the secondary metabolites. Data obtained by using spectrophotometric and microscopic analysis are evaluated with STATISTICA software and statistical significance are plotted.

## Key words

Naphthoquinones, juglone, plant stress, fluorescence microscopy, spectrophotometry.

RUCKÝ, J.; *Fytotoxicita vybraných naftochinonů na vybraném rostlinném modelu.*

Brno: FEKT VUT v Brně, 2013. 72 s.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma Fytotoxicita vybraných naftochinonů na vybraném rostlinném modelu jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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 diplomové 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 24. května 2013

.....  
podpis autora

## **Poděkování**

Děkuji vedoucímu diplomové práce prof. Ing. Ivo Provazníkovi, Ph.D., dále také doc. Pharm. Dr. Petru Babulovi, Ph.D. a doc. RNDr. Jaromíru Baštincovi CSc. za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé diplomové práce.

V Brně dne 24. května 2013

.....  
podpis autora

# Obsah

Obsah.....	6
1. Seznam obrázků.....	8
2. Seznam grafů.....	9
3. Seznam tabulek.....	11
4. Úvod.....	12
5. <i>Zea mays</i> L. ( <i>Poaceae</i> ) – kukuřice setá.....	13
6. Naftochinony.....	14
6.1. Biosyntéza naftochinonů u rostlin.....	14
6.1.1. Šikimátová cesta.....	15
6.2. Alelopatické účinky naftochinonů.....	17
7. Stres rostlin.....	18
7.1. Obranné mechanismy rostlin.....	18
7.2. Stresové markery.....	20
7.2.1. Thiolové sloučeniny.....	20
7.2.2. Stresové proteiny.....	21
8. Fluorescenční mikroskopie.....	22
8.1. Úvod do fluorescenční mikroskopie.....	22
8.2. Konstrukce fluorescenčního mikroskopu.....	23
8.2.1. Transmisní fluorescenční mikroskopie.....	24
8.2.2. Epifluorescenční mikroskopie.....	24
8.3. Využití fluorescence.....	25
8.3.1. Imunofluorescence.....	25
9. Chromatografie.....	27
9.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, HPLC.....	27
9.1.1. Základní komponenty HPLC.....	28
9.1.2. Vyhodnocení HPLC.....	30
10. Spektrofotometrie.....	32
11. Experimentální protokol.....	33
11.1. Reaktivní formy kyslíku.....	33
11.2. Metody určení viability.....	33
12. Výsledky.....	35
12.1. Spektrofotometrická vyhodnocení růstových faktorů.....	35

12.1.1.	Vyhodnocení spektrofotometrických dat .....	36
13.	Spektrofotometrické vyhodnocení syntézy sekundárních metabolitů.....	48
14.	Vyhodnocení mikroskopických dat.....	56
15.	Závěr.....	66
16.	Seznam literatury.....	70

# 1. Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Samičí a samčí květenství kukuřice seté.	13
Obrázek č. 2: <i>Plumbago europaea</i> (vlevo) a <i>Juglans regia</i> (vpravo).	14
Obrázek č. 3: Kondenzační reakce kyseliny šikimové a kyseliny $\alpha$ -ketoglutarové za vzniku naftochinonů typu droseronu a juglonu.	15
Obrázek č. 4: Vznik naftochinonů typu plumbaginu a 7-methyljuglonu.	16
Obrázek č. 5: Stresové faktory rostlin.	18
Obrázek č. 6: Idealizovaný průběh stresové reakce (Podle Larchera 1995).	19
Obrázek č. 7: Strukturní vzorce vybraných thiolových sloučenin.	20
Obrázek č. 8: Excitační a emisní spektra vybraných fluoroforů.	23
Obrázek č. 9: Princip excitačního a bariérového filtru.	24
Obrázek č. 10: Konstrukce epifluorescenčního mikroskopu.	25
Obrázek č. 11: Schématický nákres vysokoúčinného kapalinového chromatografu.	28
Obrázek č. 12: Princip smyčkového dávkovače.	29
Obrázek č. 13: Základní parametry chromatogramu.	31
Obrázek č. 14: Fluorescenční mikroskopické obrazy kořene získané s využitím DAPI, FITC a TRITC filtrů.	56
Obrázek č. 15: Popis kořene.	56
Obrázek č. 16: Vývojový diagram.	57
Obrázek č. 17: Vybrané výseče středního válce a primární kůry pro analýzu intenzity v MATLABU.	58

## 2. Seznam grafů

Graf č. 1: Změny délek rostlinných částí v závislosti na působících látkách.	38
Graf č. 2: Vliv juglonu a benzoátu sodného na délku kořene.	38
Graf č. 3: Vliv juglonu a peroxidu vodíku na délku kořene.	39
Graf č. 4: Změny obsahů vody rostlinných částí v závislosti na působících látkách.	40
Graf č. 5: Vliv benzoátu sodného na obsah vody v kořeni.	40
Graf č. 6: Vliv peroxidu vodíku na obsah vody v kořeni.	41
Graf č. 7: Změny svěžích hmotností rostlinných částí v závislosti na působících látkách.	42
Graf č. 8: Poměr chlorofylů a/b.	43
Graf č. 9: Změny obsahu karotenoidů a prolinu v závislosti na působících látkách.	45
Graf č. 10: Testování viability buněk pomocí MTT testu.	46
Graf č. 11: Testování viability buněk pomocí TTC testu.	47
Graf č. 12: Změna syntézy celkových fenolů.	49
Graf č. 13: Změna syntézy celkových fenolů s vlivem benzoátu sodného.	50
Graf č. 14: Změna syntézy celkových fenolů s vlivem peroxidu vodíku.	50
Graf č. 15: Změna syntézy celkových flavonoidů.	51
Graf č. 16: Změna syntézy celkových flavonoidů s vlivem benzoátu sodného.	52
Graf č. 17: Změna syntézy celkových flavonoidů s vlivem peroxidu vodíku.	52
Graf č. 18: Změna syntézy proanthokyanidinů.	54
Graf č. 19: Změna syntézy anthokyanů.	55
Graf č. 20: Změny intenzity záření středních válců kořene s DAPI filtrem.	59
Graf č. 21: Vliv peroxidu vodíku na intenzitu záření středních válců kořene s DAPI filtrem.	60
Graf č. 22: Intenzita záření pro střední válec kořene s FITC filtrem.	61
Graf č. 23: Intenzita záření pro primární kůru s FITC filtrem.	61

Graf č. 24: Porovnání syntézy fenolů ve středním válci a primární kůře užitím FITC filtru.	62
Graf č. 25: Intenzita záření středních válců kořene s TRICT filtrem.	63
Graf č. 26: Intenzita záření primární kůry s TRITC filtrem.	63
Graf č. 27: Intenzita záření pro střední válec a primární kůru kořene s TRITC filtrem.	64
Graf č. 28: Intenzita záření pro střední válec a primární kůru kořene s TRITC filtrem.	65

### 3. Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Způsoby uvolňování chemikálií z rostlin.	17
Tabulka č. 2: Stresové proteiny.	21
Tabulka č. 3: Základní fluorofory používané ve fluorescenční mikroskopii.	22
Tabulka č. 4: Barviva užívaná pro testování životaschopnosti buněk.	34
Tabulka č. 5: Popis vyhodnocovaných parametrů.	35
Tabulka č. 6: Popis testů životaschopnosti buněk.	36
Tabulka č. 7: Délky kořene a 2. plně vyvinutého listu.	37
Tabulka č. 8: Obsah vody kořene a nadzemní části.	39
Tabulka č. 9: Svěží hmotnost kořene a nadzemní části.	41
Tabulka č. 10: Obsah jednotlivých chlorofylů.	42
Tabulka č. 11: Obsah karotenoidů a prolinu.	44
Tabulka č. 12: Data MTT test.	45
Tabulka č. 13: Data TTC test.	46
Tabulka č. 14: Vyhodnocované sekundární metabolity.	48
Tabulka č. 15: Syntéza celkových fenolů.	49
Tabulka č. 16: Syntéza celkových flavonoidů.	51
Tabulka č. 17: Syntéza proanthokyanidinů.	53
Tabulka č. 18: Syntéza anthokyanů.	54
Tabulka č. 19: Jasové hodnoty s použitím DAPI filtru.	58
Tabulka č. 20: Jasové hodnoty s použitím FITC filtru.	60
Tabulka č. 21: Jasové hodnoty s použitím TRITC filtru.	62

## 4. Úvod

Naftochinony jsou barevné pigmenty přírodního původu, vyskytující se ve formě glykosidů ve vakuolách buněk. V přírodě jsou zastoupeny jako sekundární metabolity v několika čeledích rostlin, hub a mikroorganismů. Jedná se o vysoce cytotoxické látky, u kterých byly pozorovány antimikrobní, antifungální, antivirální a antiparazitální účinky. Nejčastějšími zástupci naftochinonů jsou plumbagin, juglon, lawson a různé deriváty lapacholu.

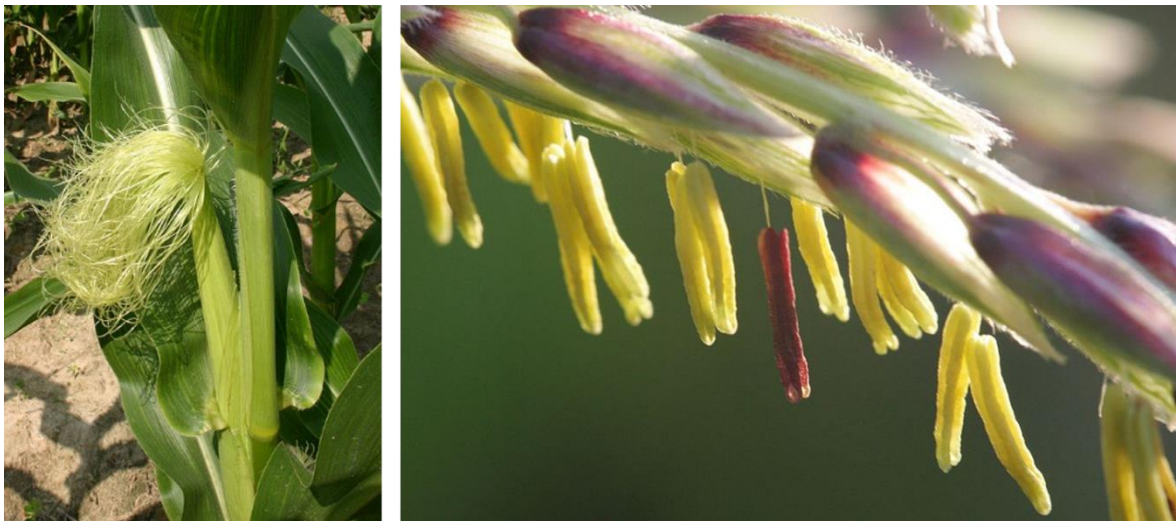
Naftochinony vykazují silné alelopatické účinky. Termín alelopatie označuje tvorbu určitých specifických biomolekul jednou rostlinou, které mohou následně ovlivňovat rostliny další. Naftochinony jako sekundární metabolity ovlivňují fotosyntetické a mitochondriální funkce, narušují strukturu buňky jako celku a z důvodu jejich působení dochází k tvorbě reaktivních forem kyslíku, což může vést až k buněčné smrti.

Negativní vlivy na rostliny u nich vyvolává stres. Rostliny jsou schopny se do určité míry bránit proti nežádoucím účinkům stresorů. Jakmile je rostlina vystavena působení stresoru, dochází ke spuštění celé řady obranných mechanismů, které zahrnují fyzikální a chemické bariéry. Mezi tyto mechanismy patří například produkce celé řady proteinů nebo zesilování buněčné stěny. Obranné mechanismy mohou mít trvalý důsledek projevující se určitou evoluční změnou rostliny, např. zesílením kutikuly na listech a výraznou impregnací buněčné stěny nebo dojde ke spuštění obranných reakcí, kdy dojde k tzv. aktivní odolnosti rostliny, která tlumí negativní dopad stresových faktorů až po jejich proniknutí k plazmatické membráně buněk a do symplastu.

Existuje řada chemických metod, vhodných pro analýzu rostlinných vzorků ovlivněných působením stresových faktorů. K nejrozšířenějším a nejpoužívanějším metodám se řadí spektrofotometrie. Jedná se o optickou metodu založenou na absorpci záření z oblasti UV (ultrafialového spektra) případně VIS (viditelného spektra) molekulami analytu v roztocích. Principem spektrofotometrie je interakce elektronů umístěných v orbitalech molekuly s fotony UV – VIS záření (200 – 800 nm). Díky energii tohoto záření dochází k excitaci elektronů v orbitalech na vyšší excitační hladinu. Současně dochází 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.

## 5. *Zea mays* L. (*Poaceae*) – kukuřice setá

Kukuřice setá, neboli *Zea mays* L. je druh jednoděložné rostliny z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Jedná se o jednoletou robustní rostlinu, dorůstající výšky nejčastěji 1-3 metrů. Listy kukuřice jsou střídavé, mají souběžnou žilnatinu a jsou přisedlé s listovými pochvami. Květenství kukuřice seté je pohlavně rozlišeno. Samčí květenství je tvořeno vrcholovou latou klásků, které jsou uspořádány v párech, kdy vždy jeden z klásků je přisedlý a druhý stopkatý a každý z nich obsahuje 2 květy. Samičí květenství vyrůstají z úžlabí listu. Jedná se o klas, nazývaný také jako palice, který se skládá z několika řad obilek. Tento klas je uzavřen v pochvách listenů, na jejichž vrcholu vyčuhuje chomáč čnělek s bliznami. Samičí klásky jsou stejně jako samčí dvoukvěté, dolní květ je však sterilní a proto vzniká z každého klásku pouze jedna obilka (obr. 1). [1], [2]



Obr. č. 1: Samičí a samčí květenství kukuřice seté.

Kukuřice patří mezi větrosprašné rostliny a pyl je přenášen především větrem. Rozprašování pylu probíhá přibližně po dobu 14 dní. Jelikož pylová zrna kukuřice seté rychle vysychají, pohybuje se jejich životnost v rozmezí 10 - 30 minut. Rozmnožování kukuřice probíhá nejčastěji obilkami, ale z důvodu ztráty její schopnosti uvolňovat obilky z palice, k níž došlo v průběhu domestikace, je rozmnožování kukuřice možné hlavně s pomocí člověka. Kukuřice patří mezi tropické rostliny, které jsou schopny s dostatečným osvětlením velmi rychle růst a vyprodukovat enormní množství biomasy. [1], [2]

## 6. Naftochinony

Naftochinony jsou barevné pigmenty přírodního původu a vyskytují se ve formě glykosidů ve vakuolách buněk. V přírodě se vyskytují ve formě sekundárních metabolitů v několika čeledích rostlin (*Plumbaginaceae*, *Juglandaceae*, *Ebenaceae*, *Boraginaceae*, *Dioncophyllaceae*, *Ancistrocladaceae*, *Iridaceae*, *Verbenaceae*, *Scrophulariaceae*, *Avicenniaceae*, *Balsaminaceae*, *Bignoniaceae*, *Gentianaceae*, *Droseraceae*, *Nepenthaceae*, *Lythraceae*, *Euphorbiaceae*) hub a také mikroorganismů (*Streptomyces*, *Fusarium*) (obr. 2). Jedná se o vysoce cytotoxické látky, u kterých byly pozorovány antimikrobní, antifungální, antivirální a antiparazitální účinky. K tvorbě naftochinonů dochází v procesu biosyntézy a to celou řadou chemických reakcí. Tyto biosyntetické pochody jsou zpravidla charakteristické pro určité čeledi nebo rody rostlin. Bylo stanoveno, že základním prekurzorem pro syntézu většiny naftochinonů je kyselina šikimová.[3], [4]



Obr. č. 2: *Plumbago europaea* (vlevo) a *Juglans regia* (vpravo).

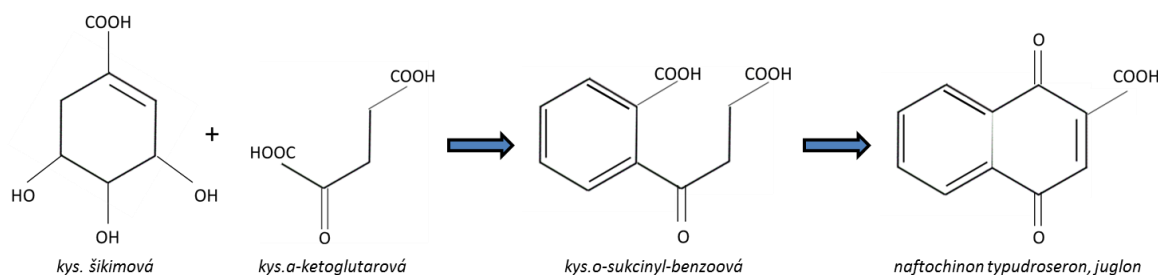
### 6.1. Biosyntéza naftochinonů u rostlin

Na biosyntéze naftochinonů se podílí několik prekurzorů (sloučenin). U rostlin se jedná především o deriváty 1,4-naftochinonu. Nejčastějšími zástupci této skupiny jsou plumbagin, juglon, lawson a různé deriváty lapacholu. [5]

Ke vzniku naftochinonů může dojít několika biochemickými cestami. Některé z nich jsou charakteristické pro určité čeledi a rody rostlin. K prozkoumání jejich biosyntézy byly použity prekurzory značené radioaktivními izotopy. Byly prozkoumány dvě hlavní biosyntetické cesty. [6]

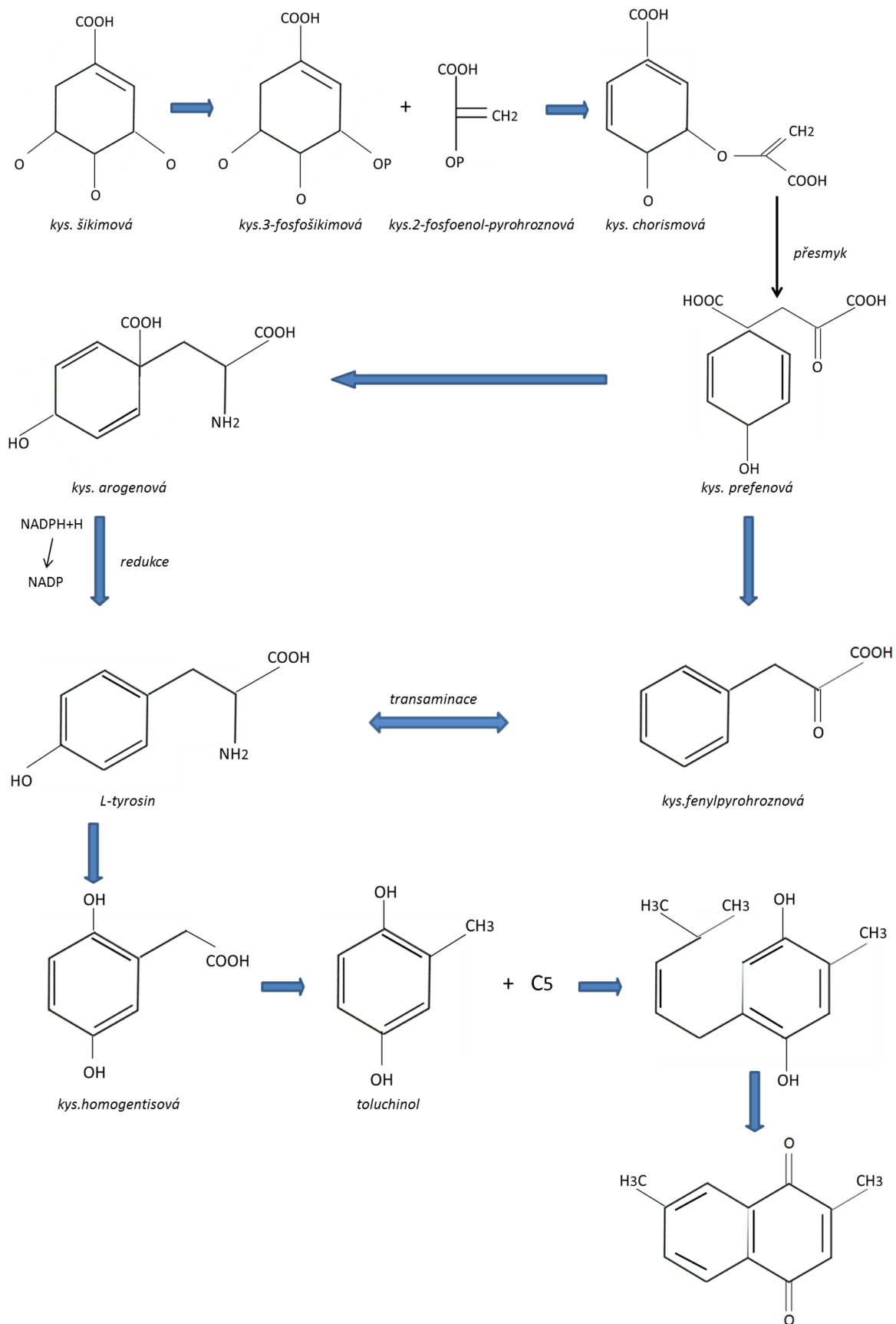
### 6.1.1. Šikimátová cesta

Kyselina šikimová je základním prekurzorem biosyntézy většiny naftochinonů. Častá biosyntetická cesta je kondenzace kyseliny šikimové a kyseliny  $\alpha$ -ketoglutarové za současného působení enzymu thiaminpyrofosfázy. Dochází ke vzniku kyseliny *o*-sukcinylbenzoové, ze které se tvoří naftochinon typu juglonu a droseronu (obr. 3). [3], [4], [6]



Obr. č. 3 : Kondenzační reakce kyseliny šikimové a kyseliny  $\alpha$ -ketoglutarové za vzniku naftochinonů typu droseronu a juglonu.

Další syntetická cesta je zahájena opět reakcí kyseliny šikimové, ze které vzniká kyselina 3-fosfošikimová. Ta reaguje s kyselinou 2-fosfoenolpyrohroznovou za vzniku kyseliny chorismové, ze které vniká přesmykem kyselina prefenová. Z té se tvoří dvěma možnými způsoby tyrosin. První z nich je redukcí kyseliny arogenové, která vznikla z kyseliny prefenové a druhý začíná odštěpením molekuly vody a oxidu uhličitého z kyseliny prefenové za vzniku kyseliny fenyropyrohroznové, která po transaminaci dává vzniku tyrosinu. Včlenění tyrosinu do naftochinonu probíhá nepřímou cestou, kdy sledem nejrůznějších reakcí vzniká kyselina homogentisová a toluchinol. Poté dochází ke kondenzaci toluchinolu s izoprenovou jednotkou  $C_5$ , po které se již tvoří substituované naftochinony typu methyljuglonu a plumbaginu (obr. 4). [3], [4], [6]



Obr. č. 4: Vznik naftochinonů typu plumbaginu a 7-methyljuglonu.

## 6.2. Alelopatické účinky naftochinonů

Termín alelopatie označuje tvorbu určitých specifických biomolekul jednou rostlinou, které mohou následně ovlivňovat rostliny další. Existuje několik způsobů, kterými jsou sekundární metabolity z rostlin uvolňovány (tab. 1). [7]

Vypařování	Sekundární metabolity mohou být uvolňovány ve formě plynu prostřednictvím průduchů v listech rostliny.
Exsudace	Sekundární metabolity jsou uvolňovány do půdy prostřednictvím kořene.
Loužení	Sekundární metabolity jsou uloženy v listech, po jejichž opadnutí se rozloží a uvolní chemické látky do půdy.

Tab. č. 1: Způsoby uvolňování chemikálií z rostlin.

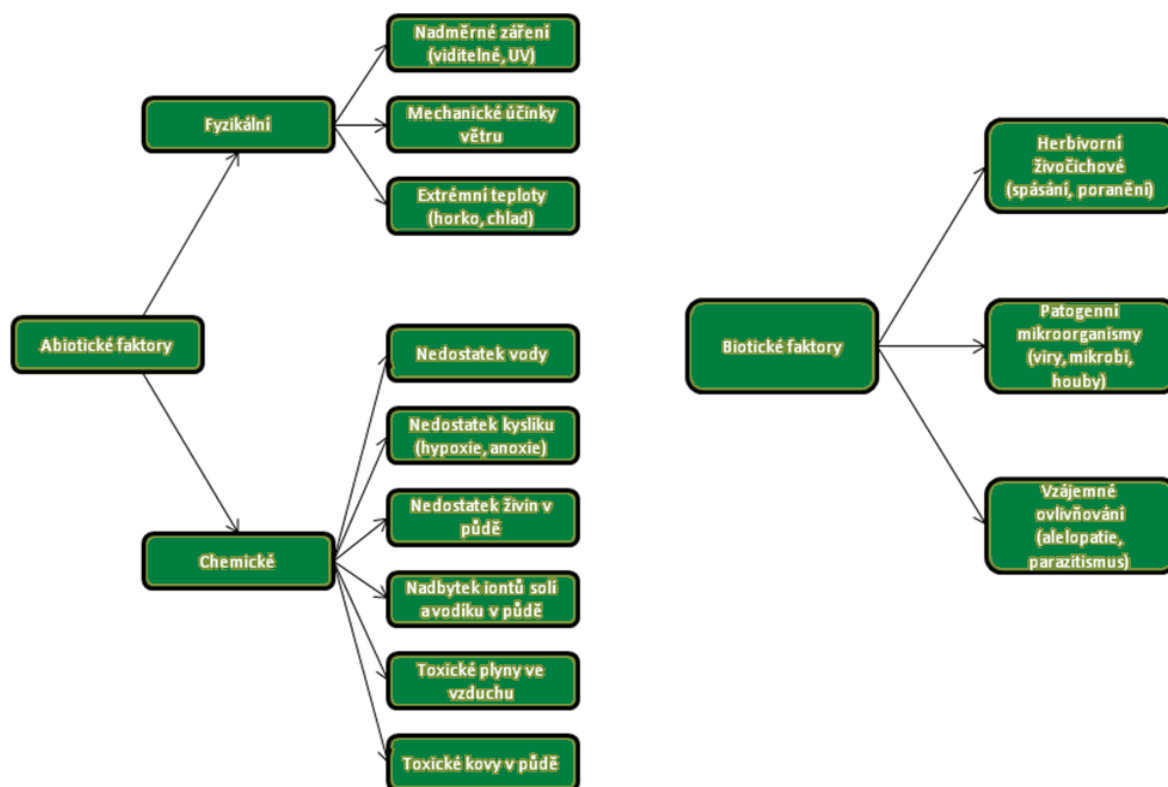
Tyto alelopatické pochody bývají nejčastěji odstartovány působením sekundárních metabolitů, které vykazují širokou škálu účinků a to od účinků na DNA (alkaloidy), činnosti fytohormonů, iontového příjmu a vodní bilance (fenoly), až po ovlivnění fotosyntetické a mitochondriální funkce (chinony). [7]

Jednou skupinou těchto alelopatických sloučenin jsou právě kyslíkové deriváty naftalenu – naftochinony. Mezi nejrozšířenější naftochinony řadíme juglon (5–hydroxy - 1,4-naftochinon), což je jantarově zbarvená sloučenina izolovaná ze zástupců čeledi *Juglandaceae* a plumbagin (5–hydroxy–2–methyl-1,4-naftochinon, oranžově zbarvený, izolovaný ze zástupců čeledí *Dioncophyllaceae*, *Droseraceae*, *Plumbaginaceae*. Tyto sekundární metabolity vznikají v procesu již výše zmíněné biosyntézy naftochinonů. Plumbagin a obzvláště juglon jsou v posledních letech podrobně studovány, a to právě pro jejich alelopatickou aktivitu. [7]

Již v roce 1925 se předpokládalo, že ořešák černý (*Juglans nigra* L.) má inhibiční vliv na růst některých rostlinných druhů. Tato inhibice měla být způsobena vylučováním určité sloučeniny prostřednictvím kořene do půdy. V roce 1928 byla tato směs sloučenin stanovena jako juglon. Juglon je uložen v rostlinných pletivech ve vakuolách ve formě hydrojuglon- $\beta$ -D-glukopyranosidu a může být rozložen pomocí enzymu hydrojuglon- $\beta$ -D-glukopyranosidu na juglon. Juglon, stejně jako plumbagin má schopnost vytrvat v půdě týdny až měsíce, a proto se jejich alelopatické vlastnosti mohou projevit i po delší době. Mají schopnost inhibovat *p*-hydroxyfenylpurývát dioxygenázu, důležitý enzym při syntéze plastochinonů, a tím dochází k narušení fotosyntetických vlastností a transpirace rostliny. Důležitou skutečností je také schopnost naftochinonů vytvářet reaktivní formy kyslíku, což hraje rozhodující roli v ochraně rostlin proti patogenům. [7]

# 7. Stres rostlin

Rostliny jsou po dobu celého svého života vystavovány nejrůznějším nežádoucím vlivům, které ovlivňují negativně většinu jejich životních funkcí a mohou vyústit až k jejich uhynutí. Těmto nežádoucím vlivům se říká stresory, nebo také stresové faktory a dělíme je na stresory biotické a abiotické povahy (obr. 5). [8]



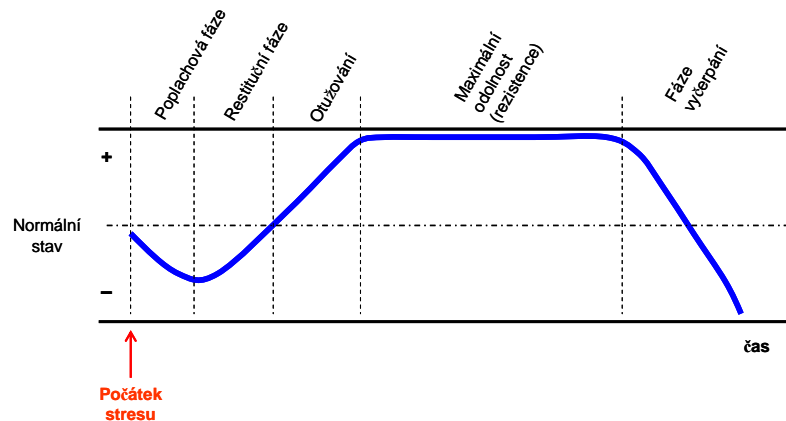
Obr. č. 5: Stresové faktory rostlin.

Tyto nežádoucí faktory vyvolávají u rostlin stres. Problematika stresu je mnohem komplikovanější u rostlin než u živočichů, jelikož rostliny žijí přisedlým způsobem života a nemají na rozdíl od živočichů možnost úniku. 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]

## 7.1. Obranné mechanismy rostlin

Jakmile je rostlina vystavena působení stresoru, dochází ke spuštění celé řady obranných mechanismů, které zahrnují fyzikální a chemické bariéry. Mezi tyto mechanismy patří například produkce celé řady proteinů nebo zesílení buněčné stěny a její lignifikace. [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, kdy dochází k tzv. aktivní odolnosti, která tlumí negativní dopad stresových faktorů až po jejich proniknutí k plazmatické membráně buněk a do symplastu. V tomto případě dochází ke spuštění řetězce reakcí, který se označuje jako stresová reakce rostliny (obr. 6). [10]



Obr. č. 6: Idealizovaný průběh stresové reakce (Podle Larchera 1995).

Zjednodušeně lze tuto reakci rozdělit na 4 hlavní fáze (obr. 6). [10]

1. Poplachová fáze
2. Restituční fáze
3. Fáze rezistence
4. Fáze vyčerpání

Na samém počátku působení stresového faktoru a tedy poplachové fáze dochází k narušení buněčných struktur a funkcí rostliny. Pokud se nejedná pouze o letální intenzitu působení stresového faktoru, dojde k imobilizaci kompenzačních mechanismů (restituční fáze), které vedou ke zvýšení odolnosti rostliny (fáze rezistence). Zvýšení odolnosti a opětovné ustavení homeostázy 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 vystředáno dalším poklesem (fáze vyčerpání). [11]

Na rostliny nemusí působit pouze jeden stresový faktor. Je poměrně častým jevem, že na rostlinu působí dva či více stresorů současně. Může se jednat např. o nedostatek vody způsobený vysokými teplotami. Důsledkem toho bývá rozdílné působení stresového faktoru na rostlinu, než při samostatném napadení. Stresory mohou také působit jen na určitou část rostliny, kde dojde ke stresové reakci a odtud je poté stres šířen do zbylých částí rostliny. [9]

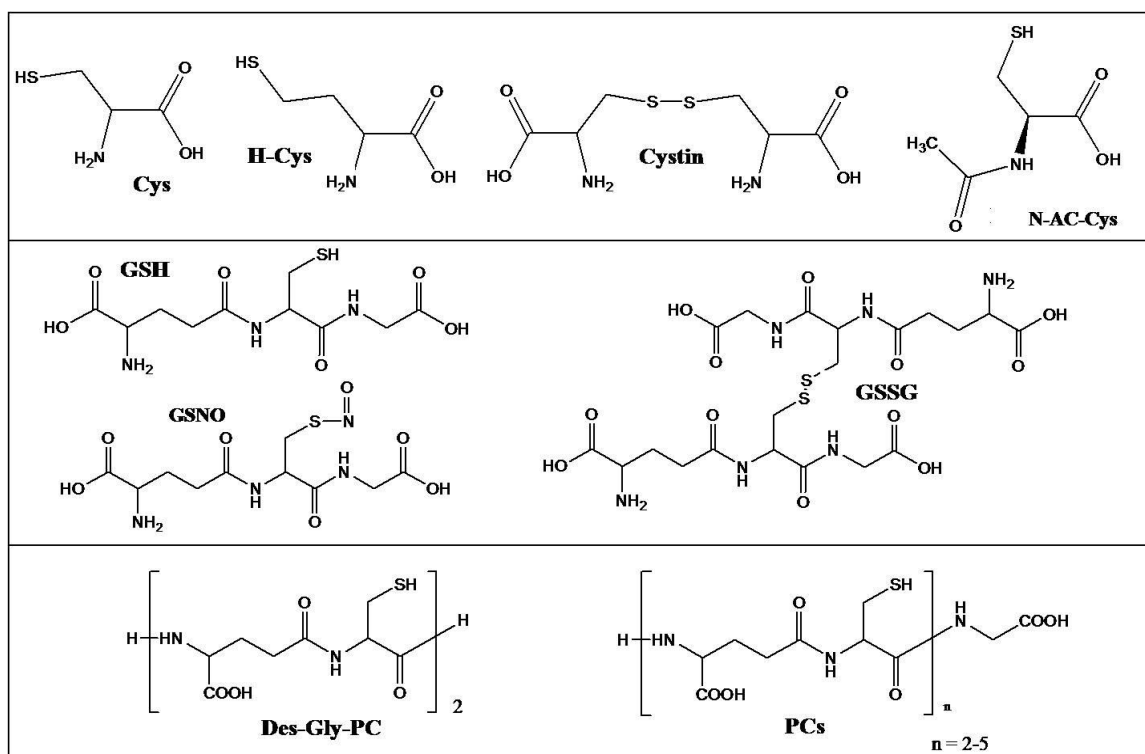
Průběh a konečný důsledek stresové reakce je ovlivněn intenzitou a délkou působení stresového faktoru na danou rostlinu a v neposlední řadě také adaptační schopností rostliny. Přechodné zvýšení odolnosti získané pod vlivem stresoru – aklimatizace, může být založeno jak na změnách rychle pomíjivých (tvorba specifických metabolitů), tak i na změnách trvalejších (změny v tvorbě nových orgánů a v jejich vnitřní struktuře).

## 7.2. Stresové markery

V průběhu vývoje se rostliny vybavily celou řadou obranných drah, při kterých vznikají a zpětně se regenerují sloučeniny, díky kterým mohou rostliny aktivně ovlivňovat stresové faktory a následky vzniklé jejich působením.

### 7.2.1. Thiolové sloučeniny

Thiolové sloučeniny mají pro organismus nepostradatelný význam. Podílejí se na významných metabolických pochodech, jako je například eliminace volných radikálů a iontů těžkých kovů, regulace transkripce a translace a další. Tuto schopnost mají díky přítomnosti SH skupin. Mezi tyto sloučeniny řadíme hlavně cystein, glutathion, oligomery glutathionu fytochelaniny a metalothionein, který je ovšem typický pro živočišné buňky (obr. 7). [12]



Obr. č. 7: Strukturální vzorce vybraných thiolových sloučenin. [12]

### 7.2.2. Stresové proteiny

Pod vlivem stresových faktorů, ať už se jedná o aktivní formy kyslíku nebo těžké kovy, dochází v buňkách již během několika desítek minut k dramatickým biochemickým změnám. Kromě změny enzymové aktivity a biochemických procesů stoupá i tvorba některých proteinů, u jiných se naopak zastavuje. Dochází však také k hojně syntéze proteinů, které bychom za normálních okolností v buňkách nenašli. [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 nespécificky, tedy různými typy stresorů, patří do některé ze tří funkčních skupin. (tab. 2)

Molekulární chaperony	Jedná se o 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[9].
Proteázy	Jsou enzymy produkované buňkami, které štěpí proteiny. Hydrolyzují peptidické vazby aminokyselin, pomocí kterých aminokyseliny drží v peptidickém řetězci [9].
Ubikvitin	Je protein sloužící k označení molekul proteinů, u kterých došlo k nenapravitelným změnám v konformaci. Jejich intenzivní tvorba souvisí se vzrůstem počtu poškozených proteinů v různých buněčných strukturách [9].

Tab. č. 2: Stresové proteiny.

# 8. Fluorescenční mikroskopie

## 8.1. Úvod do fluorescenční mikroskopie

Po mnoho desetiletí sloužila ke zkoumání veškerých živých objektů klasická světelná mikroskopie. S rostoucími požadavky na zkoumané vzorky bylo potřeba technologické inovace a to především s ohledem na velikost rozlišitelných objektů pod úrovní nejkratších vlnových délek viditelného světla. V tomto ohledu bylo průlomem objevení elektronového mikroskopu, který využívá místo fotonů elektromagnetické vlnění. Dalším požadavkem bylo simultánní sledování několika buněčných struktur a to v živých buňkách. Simultánního pozorování bylo umožněno vynalezením fluorescenční mikroskopie, která je založena na jevu zvaném fluorescence. [14]

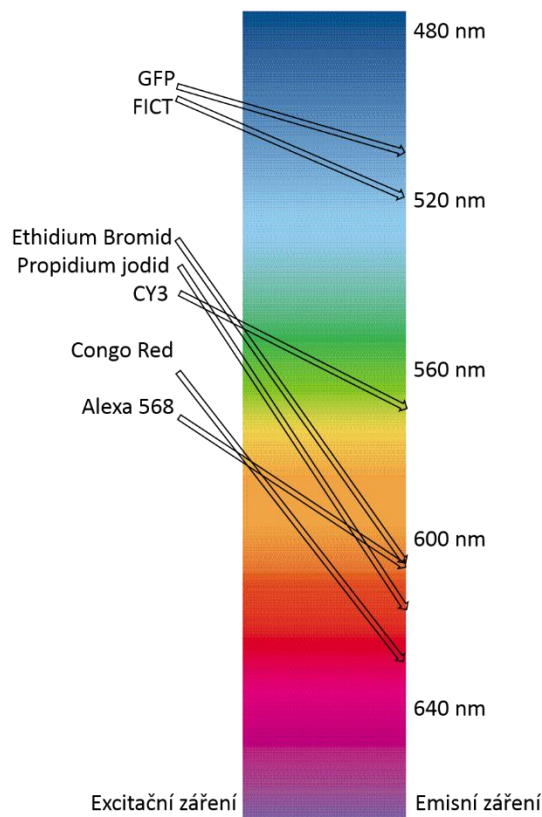
Fluorescence patří podobně jako fosforescence k jevům, kdy látka po ozáření vysílá do prostředí světlo. Obecný název pro tyto jevy je luminiscence. Záření, které luminiscenci vyvolává se označuje jako excitační a záření vysílané látkou jako emisní. Zatímco u fluorescence trvá vyzařování emisního světla krátkou dobu a po zhasnutí excitačního záření téměř okamžitě emise zhasíná, u fosforescence může k emisi docházet i dlouhou dobu po zhasnutí excitačního záření. [14]

Fluorofor	Popis a aplikace	Excitační / Emisní spektrum
GFP	Zelený fluorescenční protein - fluoreskuje zeleně po ozáření modrým světlem.	489 nm / 509 nm
FITC	Fluorescein isothiokyanát – oblíbený fluorofor snadno kovalentně modifikující např. protilátky.	495 nm / 525 nm
Ethidium bromid	Váže se na dvouřetězcovou DNA a RNA.	526 nm / 605 nm
Propidium jodid	Barví červeně DNA.	535 nm / 617 nm
Congo red	Váže se na amyloid a barví růžově.	560 nm / 630 nm
CY3	Oba fluorofory byly speciálně vyvinuty pro fluorescenční mikroskopii. Jedná se o vysoce fotostabilní látky s vysokou účinností fluorescence.	550 nm / 570 nm
Alexa 568		579 nm / 603 nm

Tab. č. 3: Základní fluorofory používané ve fluorescenční mikroskopii.[14, 15, 16]

Klíčovým termínem fluorescenční mikroskopie je fluorofor. Elektrony těchto látek absorbují foton excitačního záření, čímž dochází k nárůstu jejich energie (tab. 3). Tato nově

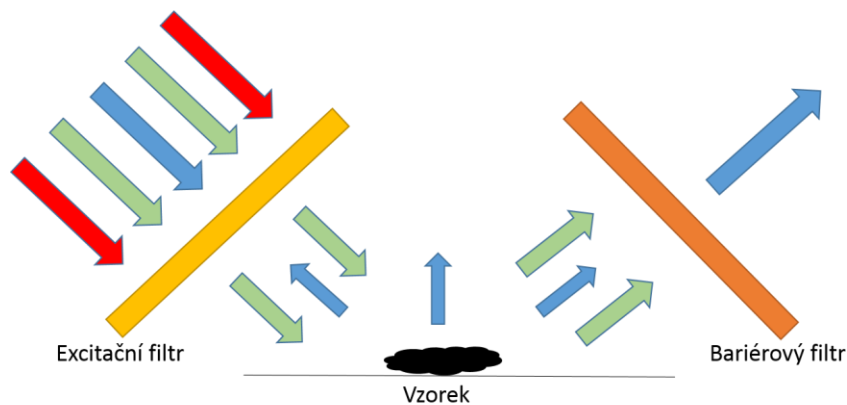
nabytá energie je po chvíli vyzářena jako foton s nižší energií a tedy delší vlnovou délkou. Jelikož dochází ke ztrátě energie, platí zde tzv. Stokeovo pravidlo, že vlnová délka emisního světla je vždy delší než vlnová délka světla excitačního. Díky Stokeovu pravidlu pozorujeme u emitovaného záření v porovnání s excitačním zářením posun k červené části spektra (obr.8). [14], [15]



Obr. č. 8: Excitační a emisní spektra vybraných fluoroforů.

## 8.2. Konstrukce fluorescenčního mikroskopu

Jestliže chceme dobře pozorovat emisní záření o mnohem nižší intenzitě než záření excitační, je potřeba dvojice filtrů. Do okuláru tak proniká pouze emitovaný signál na černém pozadí (excitující záření je odfiltrováno). [15] Přes první z nich, tzv. excitační filtr prochází z barevného spektra pouze část potřebná pro excitaci fluorescence a dochází k zamezení průchodu záření o stejné nebo podobné vlnové délce jako má světlo emisní. Druhý filtr je bariérový a ten zamezuje průchodu intenzivního excitačního záření a propouští pouze emisní část spektra, která je díky odfiltrování excitačního záření viditelná. [14]



Obr. č. 9: Princip excitačního a bariérového filtru.

Zdrojem světla u fluorescenčních mikroskopů je rtuťová výbojka. Podle konstrukce dělíme fluorescenční mikroskopy na dva základní typy.

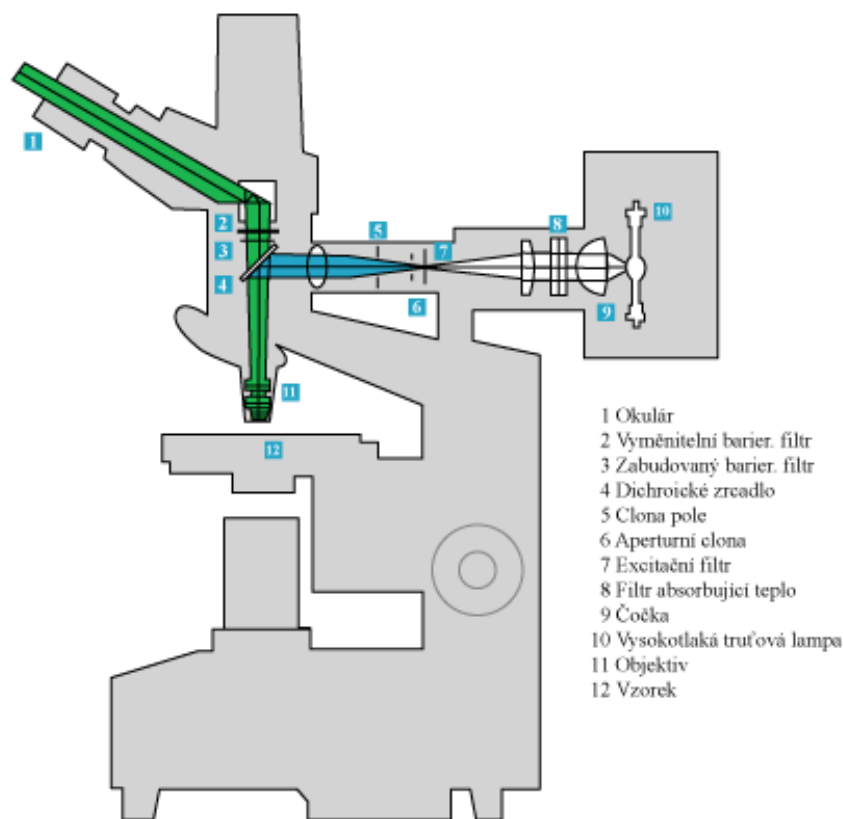
### 8.2.1. Transmisní fluorescenční mikroskopie

Jedná se o typ mikroskopu, u kterého přichází světlo prošlé excitačním filtrem zespodu na preparát, jako je tomu u klasické světelné mikroskopie. K osvětlení preparátu však není použito klasického kondenzoru, ale kondenzoru zástinového, který rozptyluje světlo tak, aby dopadalo na preparát z boku. Tímto je docíleno toho, že se excitační záření vyhne objektivu, do kterého se dostane pouze záření emitované. Od tohoto typu mikroskopie se však upouští a více se používá epifluorescenční mikroskopie. [14]

### 8.2.2. Epifluorescenční mikroskopie

Tyto typy mikroskopů pracují za pomoci speciálního zrcadla, které odráží excitační záření do objektivu a propouští emisní záření do okuláru. V začátcích epifluorescenční mikroskopie se používalo polopropustné zrcadlo, které však polovinu záření odrazilo a polovinu propustilo a to bez ohledu na typ záření. Touto metodou docházelo k velkým ztrátám světla, a proto se začalo používat tzv. dichroické zrcadlo. [14]

Dichroické zrcadlo propouští i odráží světlo v závislosti na jeho vlnové délce. Chceme docílit nalezení takového zrcadla, které maximum excitačního záření odrazí a maximum emisního záření propustí. Existuje tzv. kostka, což je kombinace dichroického zrcadla a excitačního a bariérového filtru, která je vhodná pro určité použité typy fluoroforů. Dvě stěny této kostky tvoří filtry a uhlopříčkou mezi nimi je dichroické zrcadlo. Tyto kostky jsou specifické pro každý jiný fluorofor a proto jsou umístěny na výměníku, kde je lze podle potřeby měnit. [14], [15]



Obr. č. 10: Konstrukce epifluorescenčního mikroskopu.

## 8.3. Využití fluorescence

Fluorescenční mikroskopie je v současnosti nejpoužívanější metodou k detekci strukturálních a funkčních změn uvnitř buněk a specifických molekul (např. proteinů, lipidů, konkrétních sekvencí DNA a RNA) v buňkách, bez nutnosti jejich zničení. Některé fluorofory (např. ethidium bromid a propidium jodid) se váží na určité molekuly (např. DNA) a můžeme je tedy použít k jejich zviditelnění. Tomuto postupu se říká přímá fluorescence.

### 8.3.1. Imunofluorescence

V případě, že nelze nalézt pro struktury v buňce fluorofor, který by se na ni specificky vázal, použijeme tzv. imunofluorescenci. Existují určité postupy, díky kterým lze vyrobit protilátku, specificky se vázající téměř na jakoukoli molekulu. Jestliže získáme tuto protilátku, můžeme vytvořit kovalentní vazbu na fluorofor fluoreskující molekulu, která specificky rozeznává to, co potřebujeme. Tento postup se označuje jako přímá imunofluorescence. [14]

Z důvodu poměrně komplikované výroby této fluoreskující molekuly se často používá nepřímé imunofluorescence. U této metody se ze všeho nejdříve připraví primární protilátka, která se následně naváže na strukturu nebo molekulu, kterou chceme detekovat. Poté se z preparátu vymyje přebytečná primární protilátka a přidá se komerčně dodávaná protilátka obsahující fluorescein. Ta nám vazbou na primární protilátku zviditelní hledanou strukturu, která má však v porovnání s přímou fluorescencí nižší specifitu. [14]

Třetí, často používaná metoda imunofluorescence využívá silné vazby bazického glykoproteinu avidinu a biotinu. Biotin se váže na molekuly primárních protilátek, na které se poté váže fluorofor značený avidin. Výsledkem této metody je jasná a ostrá fluorescence. Díky této metodě lze zviditelnit více různých struktur v jedné buňce a sledovat tak jejich vzájemnou polohu. Toho je docíleno přítomností celého barevného spektra fluoroforů. [14]

# 9. Chromatografie

Chromatografie je separační a současně analytická fyzikálně chemická metoda, která se užívá k separaci a analýze složitých směsí. Má široké uplatnění v chemických, biochemických a biologických laboratořích, ale také v různých průmyslových odvětvích, např. ve farmaceutickém průmyslu. [17], [18]

Existuje celá řada chromatografických metod, které se liší použitou mobilní a stacionární fází, způsobem separace a celkovou konstrukcí přístroje. Analyzovaná směs látek (vzorek) je rozpuštěná v mobilní fázi (plyn, kapalina, kapalina v superkritickém nebo subkritickém stavu). Tato mobilní fáze obohacená o rozpuštěný vzorek je tlačena skrz stacionární fázi, která je nemísitelná, vůči okolí nepohyblivá a každou složku dělené směsi zadržuje různou silou. Složky analyzované směsi se liší svojí afinitou k oběma fázím a mají snahu střídavě vnikat do obou z nich. Do každé fáze vnikají na různě dlouhou dobu, až se po určité chvíli ustaví dynamická rovnováha, kdy poměr látkových množství každé látky ve fázi mobilní a stacionární je konstantní. To je základním principem chromatografického procesu. [17], [18]

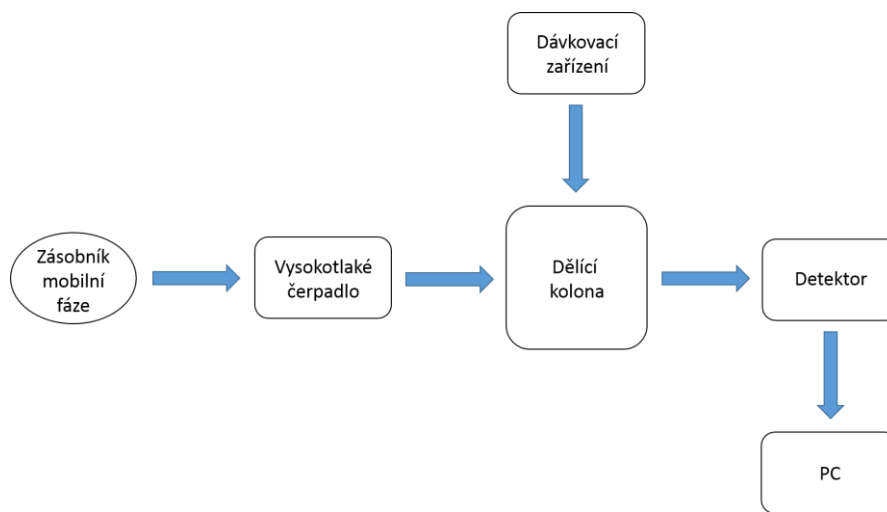
Chromatografické metody se dělí podle různých hledisek a vždy záleží na uspořádání a druhu použité mobilní a stacionární fáze. Mobilní (pohyblivá) fáze může být kapalinná nebo plynná. V prvním případě se jedná o kapalinovou chromatografii, v druhém o chromatografii plynovou. Stacionární (nepohyblivou) fází může být pevná látka nebo film kapaliny zakotvený na pevné látce. Podle uspořádání obou fází dělíme chromatografii na sloupcovou, kdy je stacionární fáze umístěna v úzké trubici, kterou pod tlakem prochází fáze mobilní a planární, kdy se stacionární fáze nachází na rovné desce (papíru) a mobilní fáze do ní prochází vztlínáním nebo vlivem gravitace. Jelikož ve své práci užívám HPLC (High performance liquid chromatography) analýzu, zaměřím se dále pouze na ni. [17]

## 9.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie využívá kapalnou mobilní fázi a stacionární fáze ve formě filmu příslušné látky zakotveném na povrchu nosiče nebo pevného adsorbentu. Již z názvu této metody vyplývá, že se jedná o vysoce účinný separační proces, kterého je docíleno použitím kolon s velmi jemně zrněným sorbentem (3 – 10  $\mu\text{m}$ ), s dobře definovanou velikostí částic, vysokou hustotou a homogenitou náplně. Separační proces se tak stává účinnějším a kratším a používané kolony mají menší rozměry. Z důvodu klesající velikosti částic však narůstá odpor kolony a pro dosažení potřebné rychlosti průtoku mobilní fáze je třeba použít tlak jednotek až desítek MPa. Proto se někdy tato metoda označuje jako vysokotlaká kapalinová chromatografie.

### 9.1.1. Základní komponenty HPLC

- Zásobník mobilní fáze
- Vysokotlaké čerpadlo
- Dávkovací zařízení
- Dělicí kolona
- Detektor
- PC



Obr. č. 11: Schématický náčrt vysokoúčinného kapalinového chromatografu. [19]

#### Zásobníky mobilní fáze

Jsou zásobárnou mobilní fáze, která je z nich transportována čerpadly na kolony. Před samotným čerpáním mobilní fáze musí dojít k odstranění rozpuštěného plynu z kapaliny, jelikož při vyšším tlaku dochází v kolonách ke vzniku nežádoucích bublin. K odplynění dochází za pomoci ultrazvuku, snížením tlaku nebo varem. [18]

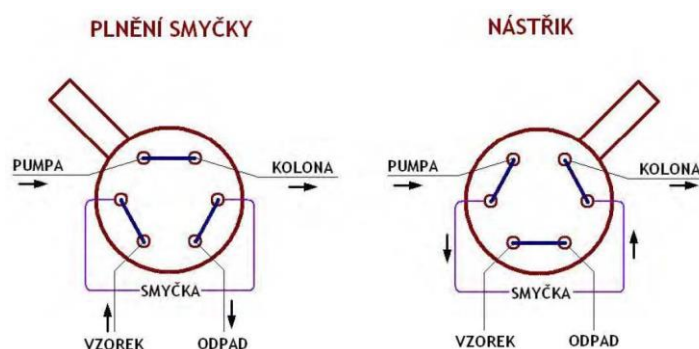
#### Vysokotlaká čerpadla

Úkolem vysokotlakých čerpadel je zajišťovat konstantní nebo programovatelný bezpulzní průtok (0,1 – 10 ml/min) při tlacích do 60 MPa. Nejčastěji používaná jsou dvě pulzní pístová čerpadla s fázově posunutou činností, která se pohybují způsobem vhodným pro maximální potlačení pulzace toku mobilní fáze.

Nejčastěji používaným režimem čerpání mobilní fáze je režim isokratický. Mobilní fáze v něm může mít konstantní polaritu, přičemž čerpadlo pumpuje do kolony jedno rozpouštědlo. Při měnícím se zastoupení dvou či více rozpouštědel můžeme libovolně korigovat eluční sílu mobilní fáze. Tento postup je možný s využitím gradientového čerpadla s programátorem gradientu. [18]

### Dávkovací zařízení

Hlavní překážkou dávkování je velký pracovní tlak uvnitř kolony. Proto se v HPLC analýze nejčastěji používá 6 - cestný injekční ventil s vyměnitelnou smyčkou, díky kterému je tlak snížen (obr. 12). Na levé části obrázku je znázorněno, jak dochází k naplnění dávkovače vzorkem za pomoci stříkačky. Přitom se vzorkem zaplní externí smyčka (5 – 100  $\mu$ l). V průběhu jejího plnění prochází mobilní fáze ventilem na kolonu. Pravá část obrázku znázorňuje rotující ventil takovým způsobem, aby začala mobilní fáze proudit přes smyčku a vzorek se tak vnesl na kolonu. [18]



Obr. č. 12: Princip smyčkového dávkovače. Převzato z: [19]

### Dělicí kolony

Nejvyužívanějším materiálem pro konstrukci kolony je sklo a nerezová ocel. Výhodnou variantou je kombinace kovové kolony, jejíž vnitřní povrch je potažen vrstvou skla. Délka kolony bývá volena v rozmezí od 10 – 30 cm, s průměrem v řádu jednotek milimetrů. Účinnost kolony závisí na typu použité stacionární fáze, rozměrech, tvaru a materiálu kolony a také na úpravě vnitřního povrchu kolony na množství spojovacích částí. Kolony se nejčastěji kupují již hotové od výrobců, ale je možno je plnit stacionární fází i v laboratoři.

Náplň kolony je volena vždy podle charakteru analyzovaných sloučenin a principu, který se při dělení uplatňuje. Obecně by však kolony měly splňovat podmínku mechanické stability při pracovních tlacích do 30 – 40 MPa, měly by být vysoce účinné a poskytovat symetrické píky i při separaci polárních, kyselých, bazických nebo vysokomolekulárních látek a měly by mít co nejvyšší permeabilitu, aby bylo možno dosahovat rychlých separací. [18]

## Detektory

Úkolem detektorů je kontinuální monitorování vytékajícího eluentu z kolony. Je důležité, aby detektor rozeznal specifický signál eluentovaných látek od signálu rozpouštědel. Nejčastěji užívaným typem detektoru je UV/VIS detektor. Jelikož rozpouštědla používaná v HPLC obvykle neabsorbují v oblasti UV/VIS, je tento detektor použitelný k detekci mnohých látek. Může pracovat při vlnových délkách v rozsahu od 190 – 600 nm, přičemž její hodnota může být pevně stanovena nebo se postupně měnit. Citlivost UV detektoru je obvykle v rozsahu absorbancí 0,001 – 1. [18]

### **Spektrofotometrický detektor s diodovým polem** (angl. diode array detector, DAD)

Jedná se o typ detektoru, který umožňuje snímat absorpční spektrum v závislosti na čase. Detekuje 3D záznam absorpčních spekter všech eluovaných látek. Vzniklé diodové pole nám poskytuje jednodušší spektrum, než spektrum měřené v kyvetě, což nám komplikuje identifikaci látky ze vzniklého spektra. Tento typ detektoru je užíván především, pokud požadujeme kvalitní posouzení čistoty zaznamenaného píku analyzované látky. Citlivost je v porovnání s UV detektorem přibližně o 1 řád horší. [18]

### **Hmotnostní detektory** (MS detektory – angl. mass spectrum)

Vysoce účinný prostředek pro identifikaci látek obsažených ve vytékajícím eluentu. Detektory měří jejich hmotnostní spektrum, které je pro každou látku vysoce specifické. Z technických a finančních důvodů je však spojení HPLC s MS velmi náročné. Např. vzhledem k tomu, že HPLC analýza probíhá za vysokých tlaků a MS měření v hlubokém vakuu. Výstup z tohoto detektoru je obvykle napojen na počítač se softwarem, který za pomoci AD převodníku převádí analogový signál na digitální, dále jej zpracovává a ukládá. [18]

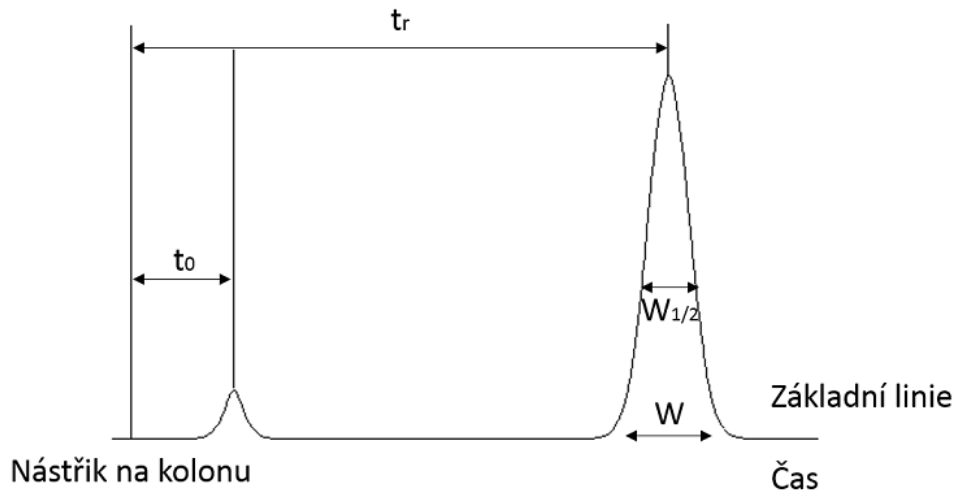
## 9.1.2. Vyhodnocení HPLC

Chromatografické detektory jsou umístěny na konci kolony a zaznamenávají chromatogram, což je odezva detektoru v čase. Jednotlivé separované látky jsou zobrazovány jako koncentrační profily neboli chromatografické píky. V ideálním případě má pík Gaussovský tvar a je symetrický. Plocha píku odpovídá množství daného analytu. Chromatogram nám poskytuje kvalitativní i kvantitativní informace o látkách obsažených ve vzorku (obr. 13). Pro určování přítomnosti či nepřítomnosti jednotlivých složek dané směsi slouží kvalitativní informace v podobě retenčního času. Kvantitu (množství) obsažených látek získáme srovnáním dvou nebo více sloupců měřeného vzorku se standardy. Hodnotí se výška nebo plocha píku. [17], [18]

### **Základní parametry separace v chromatografii**

- Retenční čas komponenty vzorku ( $t_r$ ) – čas, který látka potřebuje od vnesení do kolony, do doby kdy detektor zaznamená maximum píku.

- Mrtvý čas kolony ( $t_0$ ) – čas, který potřebuje jakákoliv látka na průchod kolonou mobilní fází.
- Šířka píku ( $W$ ) – odečítá se na úrovni základní linie, v polovině výšky píku ( $W_{1/2}$ ) nebo v inflexním bodu. Udává se v časových jednotkách.



Obr. č. 13: Základní parametry chromatogramu.

# 10. 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.

Principem spektrofotometrie je interakce elektronů umístěných v orbitalech molekuly s fotony UV – VIS záření (200 – 800 nm). Díky energii tohoto záření dochází k excitaci elektronů v orbitalech na vyšší excitační hladinu. Současně dochází 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. [20]

Ke spektrofotometrickému stanovení analytu dochází v případě, že alespoň část molekuly analytu absorbuje UV nebo VIS záření. Za tuto absorpci jsou odpovědny 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, například kovů. [20]

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. [20]

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

, kde  $\varepsilon$  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.

# 11. Experimentální protokol

Bylo prokázáno, že naftochinony juglon a plumbagin mají negativní účinky na růst a životaschopnost buněk a to v závislosti na jejich délce působení a na aplikované dávce.

Obdobně jsme postupovali při naší práci s rostlinným modelem *Zea mays* L. Jelikož byla měření provedena ve spolupráci s panem doc. Pharm.Dr. Petrem Babulou, Ph.D. na Veterinární a farmaceutické univerzitě Brno, neuvádím podrobnější metodiku.

10 denní rostliny *Zea mays*, byly hydroponicky kultivovány v Hoaglandově kultivačním roztoku, při teplotě 22 °C  $\pm$  2 °C, vlhkosti 60% a 150  $\mu$ mol (PAR) m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

## 11.1. Reaktivní formy kyslíku

Mezi reaktivní formy kyslíku řadíme radikály s nespárovaným elektronem (superoxidový anionový radikál O<sub>2</sub><sup>·-</sup> a hydroxylový radikál ·OH). Patří sem také peroxid vodíku, který však volným radikálem není. Nejtoxičtější formou ROS jsou hydroxylové radikály, které mohou iniciovat peroxidázu lipidů v membránách. ROS se tvoří ve všech aerobních organismech a to například v místech přenosu elektronů (mitochondriích a chloroplastech), ale také specifickými enzymy jako jsou různé oxidázy.[22]

ROS nemusí působit vždy jen negativně. Podílejí se na regulaci genové exprese, růstu buněčné stěny, interakci s patogeny a podobně. Jakmile však dojde vlivem stresových podmínek k jejich nárůstu a překročí kapacitu účinku antioxidantních enzymů, stávají se významnou příčinou poškození biomakromolekul a při dlouhodobém působení až smrti organismu.[22]

## 11.2. Metody určení viability

Viabilitu buněk se může stanovovat využitím barvicích technik. Tyto techniky nám umožňují zviditelnit nejrůznější strukturální a funkční změny uvnitř buňky. V závislosti na aktuálním stavu buňky dojde k jejímu obarvení, které se dají pozorovat pomocí fluorescenční mikroskopie a stanovovat poměr mezi živými a odumřelými buňkami. Barviva užívaná pro barvení rostlinných buněk se liší podle zkoumaného parametru. Mezi nejčastěji využívaná barviva patří fluorescein diacetát (FDA), propidium jodid (PI) a Calcein – AM, užívaná pro zkoumání integrity buněčné membrány, nově užívané barvivo JC-1 pro zkoumání mitochondriálních markerů, dále také barvivo užívané pro zkoumání struktury buněčné membrány YO-PRO®-1 a další. (tab. 4) [23]

Typ Barviva	Popis barviva
Fluorescein diacetát – FDA Propidium Jodid - PI	Životaschopnost buněk je testována kombinací FDA a PI. PI obarvuje nukleovou kyselinu buněk s poškozenou buněčnou membránou, což nám umožní určit množství mrtvých buněk, jelikož pouze ty budou obarveny. [7]
JC-1	Barvivo užívané ve fluorescenční mikroskopii pro stanovení mitochondriálních markerů. Fluorescenční emise se mění v závislosti na rostoucím potenciálu mitochondriální membrány. V případě vysokého potenciálu září červeně vzniklé agregáty barviva a naopak při nízkém potenciálu obsahují buňky monomery JC – 1 zářící zeleně. [24]
YO-PRO®-1	Jedná se o kyanidové barvivo excitované zdrojem záření o vlnové délce 488nm a emitující zelené fluorescenční záření. Dokáže snadno procházet membránou buněk, ze kterých je vypuzeno v, případě že se jedná o nepoškozenou buňku. [20]
2,7 - dichlorofluorescein diacetát – DCF - DA	Fluorescenční barvivo, které je využíváno v moderní zobrazovací metodě pro vizualizaci peroxidu vodíku (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) v pletivech. Barvivo vstupuje do buněk a užitím fluorescenčního mikroskopu vyhodnotíme obsah H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Nevýhodou je poměrně vysoká cena této látky. [22]
AmplexRed	Barvivo užívané pro kvantitativní určení obsahu H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Fluorescence se vždy detekuje snadněji na kořenech, jelikož u listů je potřeba eliminovat autofluorescenci chlorofylu. Vyhodnocení se provádí na základě intenzity zabarvení preparátu. [22]
4,5 - diaminofluorescein diacetát – DAF - 2DA	Nejběžněji používaná látka k detekci NO. Principem působení je reakce NO s tímto barvivem, za vzniku vysoce fluorescenčního „triazó“ produktu. [22]

*Tab. č. 4: Barviva užívaná pro testování životaschopnosti buněk.*

## 12. Výsledky

Cílem mé práce bylo sledovat účinky naftochinonů na zvolený rostlinný model. Ve spolupráci s panem doc. Pharm.Dr. Petrem Babulou, Ph.D., byla získána mikroskopická a spektrofotometrická data. Měření byla prováděna na rostlinném modelu kukuřice seté (*Zea mays* L.). Na tento rostlinný model působil naftochinon typu juglon, a to o koncentracích 1 a 10  $\mu\text{M}$ , přičemž navíc bylo ke každé z těchto koncentrací přidáno 100  $\mu\text{M}$  benzoátu sodného nebo 500  $\mu\text{M}$  peroxidu sodíku. Zvolený rostlinný model byl po dobu 10 dní kultivován v kultivačním médiu podle Hoaglanda s pravidelným doléváním deionizované vody. Tento kultivační roztok představuje ideální živnou půdu pro růst a vývoj rostliny (obsahuje potřebné živiny).

### 12.1. Spektrofotometrická vyhodnocení růstových faktorů

#### Měřené parametry

Měření bylo zaměřeno na zkoumání změn kořene jako celku (délka kořene), se kterou souvisí také jeho svěží hmotnost a hmotnost sušiny. Byl zkoumán také obsah vody kořene. Pro porovnání byly tyto parametry měřeny také pro nadzemní část experimentálních rostlin, je tedy možné porovnat vliv naftochinonů na jednotlivé rostlinné části. U nadzemních částí rostliny se dále vyhodnocoval měnící se obsah chlorofylů typu *a* i *b*, karotenoidů a aminokyseliny prolinu.

Název parametru	Popis
Chlorofyl	Jedná se o zelený pigment obsažený v zelených rostlinách, sinicích a některých řasách. V průběhu fotosyntézy absorbuje světelnou energii a užívá ji k syntéze sacharidů z oxidu uhličitého a vody. Molekuly chlorofylu jsou umístěny v chloroplastech, kde společně s proteiny a dalšími pigmenty tvoří základ fotosystému. Existují dva základní typy chlorofylů. Chlorofyl <i>a</i> a chlorofyl <i>b</i> . Obě tyto formy chlorofylu se liší pouze v substituci methylové skupiny ( <i>b</i> ) za aldehydovou ( <i>a</i> ) na třetím atomu uhlíku. Tyto dvě formy se v přírodě vyskytují v poměru 3:1 ( <i>a:b</i> ). [25]
Karotenoidy	Jedná se o barviva rostlin, hub, řas, mikroorganismů a živočichů. Dělí se na karoteny (červené barvivo) a xantofyly (žluté barvivo). Podobně jako chlorofyl patří mezi fotosyntetická barviva, vyskytující se běžně u většiny rostlin, mají však odlišnou barvu a absorbují tak energii z odlišného spektra viditelné světelné energie. Karotenoidní barviva tvoří skupinu žlutých, oranžových, červených a fialových pigmentů, doprovázejících chlorofyly

	v rostlinách. Jsou vázány v chloroplastech a funkčně se účastní fotosyntézy. [26]
Prolin	Prolin je aminokyselina, která neobsahuje primární aminoskupinu, ale postranní řetězec v podobě cyklu. Díky této zvláštnosti ve své chemické struktuře má specifické možnosti při vytváření prostorové struktury bílkovin. Prolin se hojně vyskytuje v kolagenu a je nezbytný pro jeho tvorbu.

Tab. č. 5: Popis vyhodnocovaných parametrů.

Pro ověření životaschopnosti buněk byly pro kořen i nadzemní část rostliny provedeny MTT a TTC testy.

Název testu	Popis
TTC	TTC test nebo také formazan test je užíván v buněčné biologii pro stanovení životaschopnosti nebo metabolické aktivity buněk. Může se používat také pro stanovení antibiotické citlivosti bakterií. Test je založen na reakci bezbarvého 2,3,5-trifenylnitro tetrazolium chloridu (TTC) s živými buňkami. Jedná se o redoxní reakci, při které se aktivují dehydrogenázy, které jsou po smrti buňky deaktivovány a tím pádem je pro ně test negativní. [27]
MTT	MTT test je vyspělejší verzí TTC testu. Tato metoda je založena na redukci žlutého solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan. K reakci dochází na mitochondriální membráně živých buněk. Hodnota výsledné absorbance odpovídá množství živých buněk. Čím je absorbance vyšší, tím je ve vzorku větší množství živých buněk. [28]

Tab. č. 6: Popis testů životaschopnosti buněk.

### 12.1.1. Vyhodnocení spektrofotometrických dat

Na základě získaných spektrofotometrických dat bylo provedeno jejich statistické vyhodnocení. Pomocí softwaru STATISTICA byly provedeny testy normality vyhodnocovaných dat. Bylo potřeba určit vhodný korelační test pro spojitá data. Pro porovnávání dvou skupin dat s normálním rozložením byl použit Pearsonův korelační test. Jestliže měla jedna skupina zkoumaných dat nenormální rozložení a druhá normální, byl použit Spearmanův korelační test. Pro zvolené měřené parametry si můžeme formulovat nulovou hypotézu  $H_0$ , která vyjadřuje žádný, neboli nulový rozdíl mezi testovanými soubory dat. V případě, že je nulová hypotéza  $H_0$  zamítnuta, platí tzv. alternativní hypotéza  $H_1$ , která popírá platnost nulové hypotézy  $H_0$  a testované soubory dat mají mezi sebou statisticky významný rozdíl. Pro zvolené, statisticky významné soubory dat byly sestrojeny grafy znázorňující měnící se hodnoty zkoumaných parametrů v závislosti na různých koncentracích látek ovlivňujících daný rostlinný model.

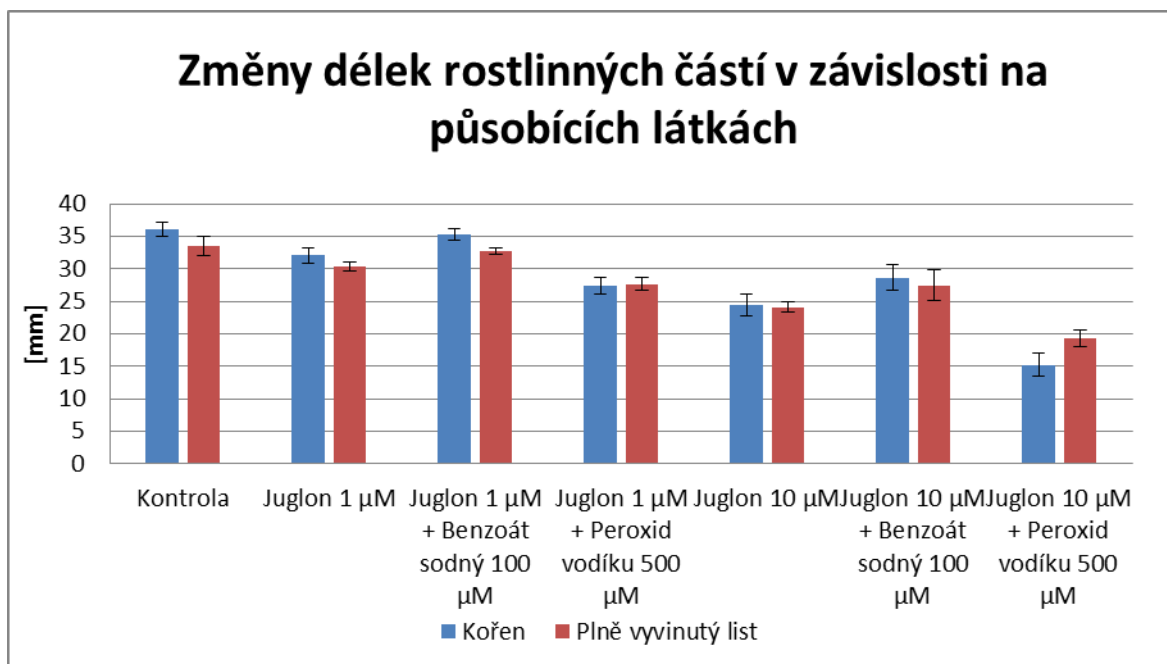
## Změny délek rostlinných částí

Měření délky kořene a 2. plně vyvinutého listu bylo provedeno pro každý vzorek šestkrát. Do grafu byla vynesena vždy průměrná hodnota s chybovou úsečkou reprezentující směrodatnou odchylku (graf 1). Bylo tedy získáno šest hodnot pro šest různých rostlin dané varianty a jedna hodnota zastupující kontrolní vzorek.

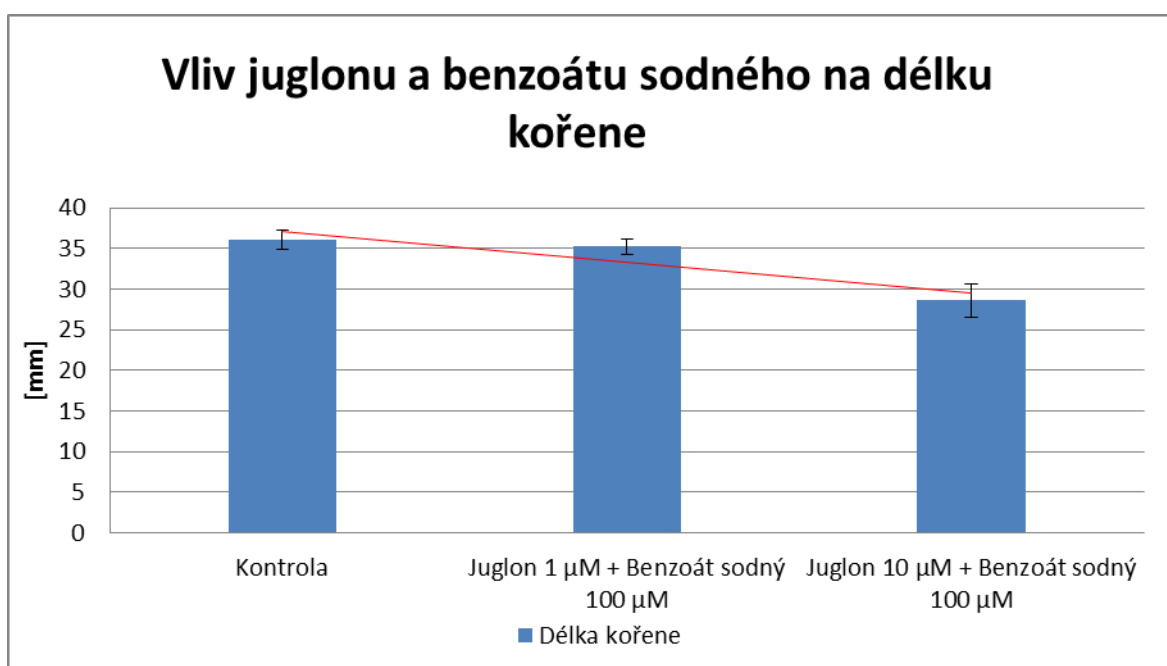
Typ vzorku	Délka kořene [mm]		Délka 2. plně vyvinutého listu [mm]	
	Průměr	Směrodatná odchylka	Průměr	Směrodatná odchylka
Kontrola	36,1	1,1	33,5	1,5
Juglon 1 $\mu$ M	32,1	1,1	30,3	0,7
Juglon 1 $\mu$ M + 100 $\mu$ M benzoátu sodného	35,3	0,9	32,7	0,6
Juglon 1 $\mu$ M + 500 $\mu$ M peroxidu vodíku	27,5	1,3	27,7	0,9
Juglon 10 $\mu$ M	24,4	1,6	24,1	0,8
Juglon 10 $\mu$ M + 100 $\mu$ M benzoátu sodného	28,6	2,0	27,5	2,3
Juglon 10 $\mu$ M + 500 $\mu$ M peroxidu vodíku	15,2	1,8	19,3	1,3

Tab. č. 7: Délky kořene a 2. plně vyvinutého listu.

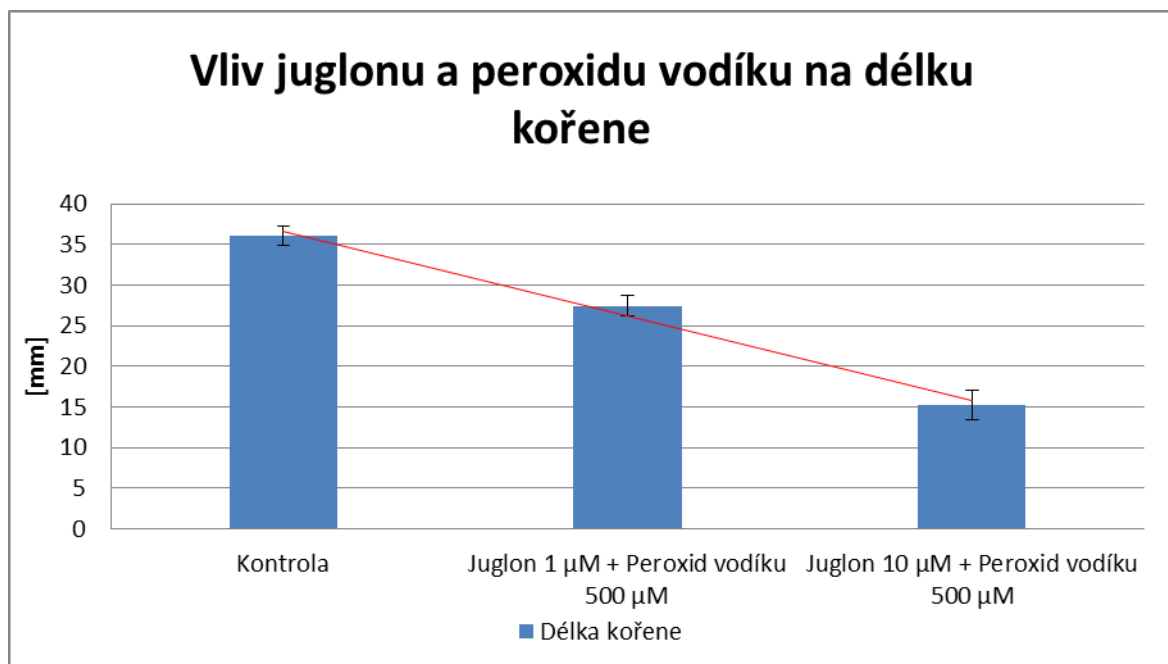
Je znatelné, že naftochinon juglon má již od nejnižší koncentrace 1  $\mu$ M negativní účinky na délku kořene i listu (graf 1). K této koncentraci juglonu byl přidán benzoát sodný o koncentraci 100  $\mu$ M, díky kterému nedocházelo k tak velké změně délky kořene a listu rostlinných vzorků, a můžeme tvrdit, že do jisté míry tlumí negativní účinky juglonu (graf 2). Naopak přidání peroxidu vodíku o koncentraci 500  $\mu$ M má za následek větší zkrácení kořene i listu než u vzorků pouze s juglonem (graf 3). Peroxid vodíku tedy negativní účinky naftochinonu prohlubuje. Podobně je tomu při koncentracích juglonu 10  $\mu$ M, kdy benzoát sodný i peroxid vodíku mají prakticky stejný vliv na délku vzorků, jako u koncentrace juglonu 1  $\mu$ M.



Graf č. 1: Změny délek rostlinných částí v závislosti na působících látkách.



Graf č. 2: Vliv juglonu a benzoátu sodného na délku kořene.



Graf č. 3: Vliv juglonu a peroxidu vodíku na délku kořene.

### Změny obsahu vody rostlinných částí

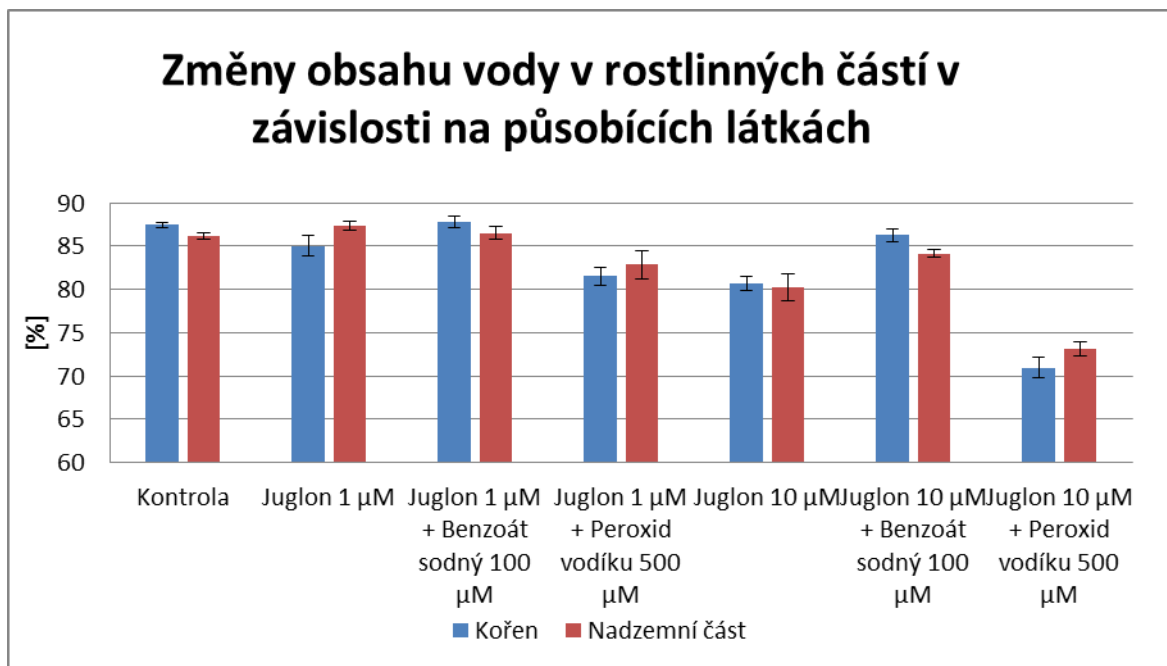
Obsah vody v kořeni a v nadzemní části rostlinného vzorku kukuřice seté byl měřen třikrát, přičemž hodnoty vynesené v grafu vznikly opět zprůměrováním těchto tří měření. Byla stanovena také směrodatná odchylka (graf 4).

Typ vzorku	Obsah vody - kořen [%]		Obsah vody – nadzemní část [%]	
	Průměr	Směrodatná odchylka	Průměr	Směrodatná odchylka
Kontrola	87,4	0,3	86,2	0,3
Juglon 1µM	85,0	1,2	87,4	0,5
Juglon 1µM + 100µM benzoátu sodného	87,8	0,7	86,5	0,8
Juglon 1µM + 500µM peroxidu vodíku	81,5	1,0	82,9	1,6
Juglon 10µM	80,7	0,8	80,2	1,5
Juglon 10µM + 100µM benzoátu sodného	86,2	0,7	84,2	0,4
Juglon 10µM + 500µM peroxidu vodíku	70,9	1,2	73,1	0,8

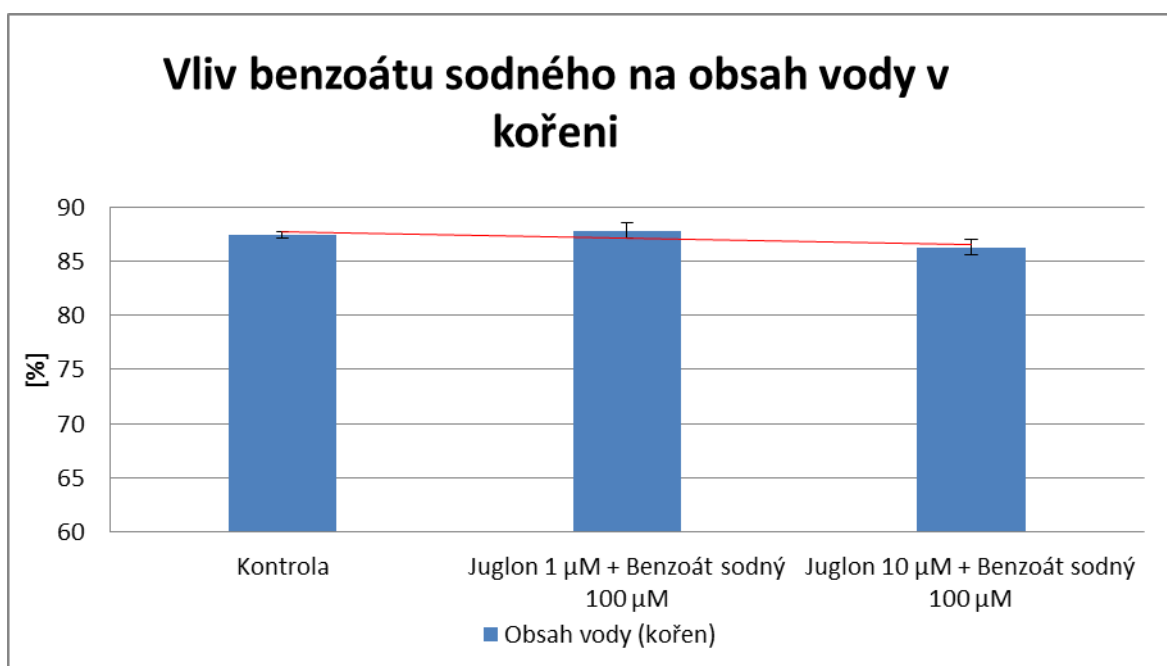
Tab. č. 8: Obsah vody kořene a nadzemní části.

Z grafu 4 je znatelné, že zvyšující se koncentrace juglonu mají také značný vliv na obsah vody v měřených vzorcích. Při koncentraci 1 µM se nejedná o příliš markantní rozdíly, ale i zde lze pozorovat pozvolný pokles obsahu vody a to především u vzorků ovlivněných

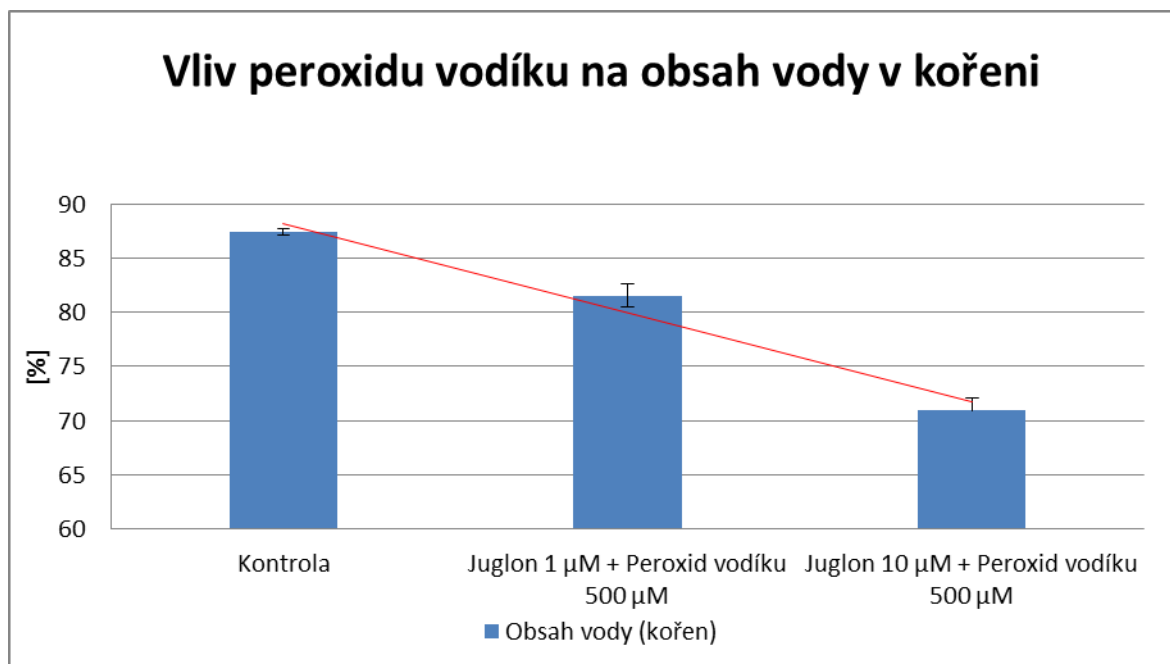
navíc ještě peroxidem vodíku o koncentraci 500  $\mu\text{M}$ . U koncentrace juglonu 10  $\mu\text{M}$  hraje důležitou roli benzoát sodný, který značně potlačuje negativní účinky juglonu a obsah vody ve vzorku je snížen jen nepatrně (graf 5). Peroxid vodíku naopak napomáhá k většímu úbytku vody ve vzorcích (graf 6). Ve výsledku můžeme říci, že benzoát sodný podobně jako v předchozím případě u délek rostlinných částí potlačuje účinek naftochinonu juglonu a peroxid vodíku tyto účinky prohlubuje (graf 4).



Graf č. 4: Změny obsahů vody rostlinných částí v závislosti na působících látkách.



Graf č. 5: Vliv benzoátu sodného na obsah vody v kořeni.



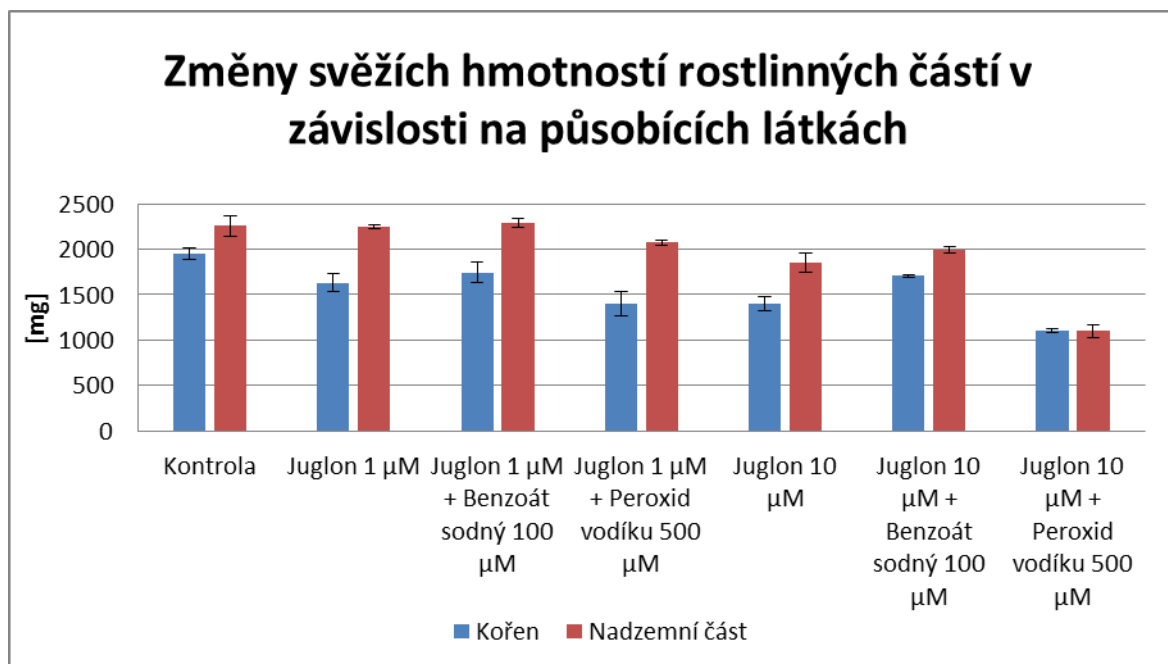
Graf č. 6: Vliv peroxidu vodíku na obsah vody v kořeni.

### Změny svěží hmotnosti rostlinných částí

Svěží hmotnost kořene a nadzemní části rostliny by se měla podle předpokladů odvíjet od jejich měnící se délky a obsahu vody. Tento předpoklad je ověřen na vyhotoveném grafu 7, ve kterém jsou opět zobrazeny průměrné hodnoty tří měření s vypočítanou směrodatnou odchylkou.

Typ vzorku	Hmotnost kořene [mg]		Hmotnost nadzemní části [mg]	
	Průměr	Směrodatná odchylka	Průměr	Směrodatná odchylka
Kontrola	1951,9	60,4	2257,9	112,0
Juglon 1 $\mu\text{M}$	1632,7	99,6	2247,1	25,4
Juglon 1 $\mu\text{M}$ + 100 $\mu\text{M}$ benzoátu sodného	1744,8	100,0	2291,7	50,2
Juglon 1 $\mu\text{M}$ + 500 $\mu\text{M}$ peroxidu vodíku	1396,6	136,0	2071,7	28,1
Juglon 10 $\mu\text{M}$	1403,3	81,5	1851,1	108,2
Juglon 10 $\mu\text{M}$ + 100 $\mu\text{M}$ benzoátu sodného	1708,1	16,9	1998,1	36,2
Juglon 10 $\mu\text{M}$ + 500 $\mu\text{M}$ peroxidu vodíku	1103,9	15,6	1098,3	66,0

Tab. č. 9: Svěží hmotnost kořene a nadzemní části.



Graf č. 7: Změny svěžích hmotností rostlinných částí v závislosti na působících látkách.

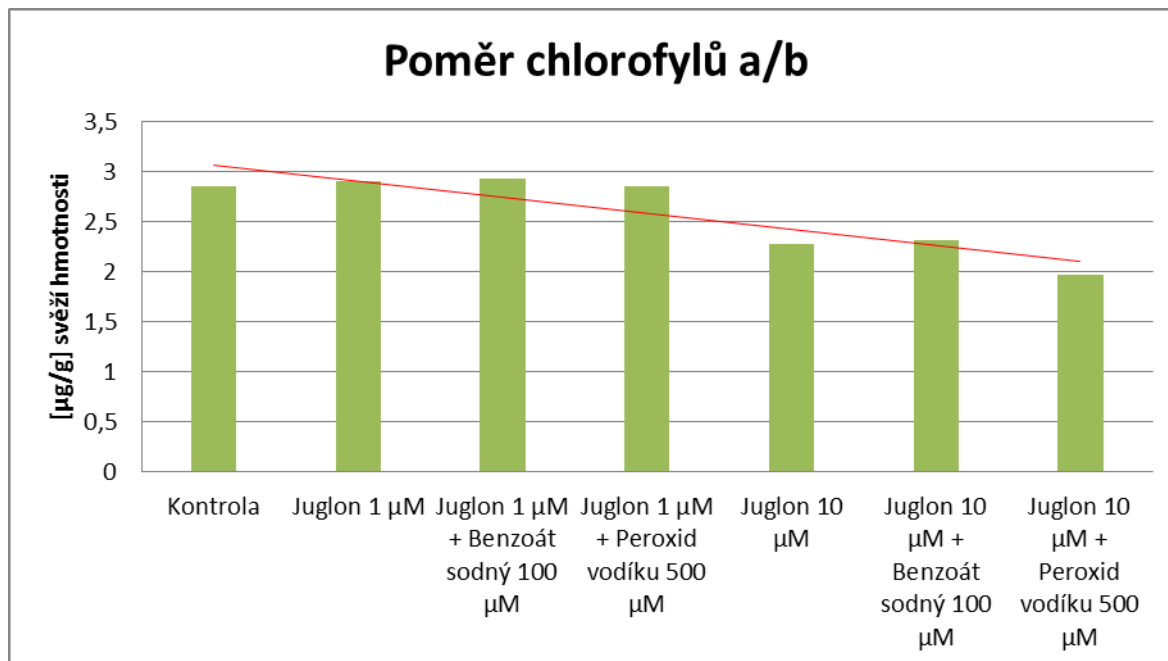
## Změny obsahu chlorofylů

Statisticky významným se ukázal být také vliv juglonu, benzoátu sodného a peroxidu vodíku na obsah chlorofylu v nadzemních částech rostlinného vzorku. Obsah chlorofylu *a* i *b* byl změřen třikrát a byla spočtena průměrná hodnota z těchto měření. Podle předpokladů by se měl chlorofyl *a* vyskytovat v poměru 3:1 s chlorofylem *b*. Tato skutečnost je potvrzena u kontrolních vzorků, kdy se poměr jednotlivých chlorofylů pohybuje těsně pod hranicí 3 mg/g svěží hmotnosti což odpovídá výše uvedenému poměru (tab. 10).

Typ vzorku	Chlorofyl <i>a</i> [µg/g]		Chlorofyl <i>b</i> [µg/g]		Poměr ( <i>a/b</i> )
	Průměr	Směrodatná odchylka	Průměr	Směrodatná odchylka	
Kontrola	3562,0	69,5	1246,1	24,3	2,9
Juglon 1µM	3274,7	33,0	1125,7	17,2	2,9
Juglon 1µM + 100µM benzoátu sodného	3557,3	49,1	1213,7	19,3	2,9
Juglon 1µM + 500µM peroxidu vodíku	3052,0	52,3	1067,3	10,5	2,9
Juglon 10µM	2295,3	51,5	1004,3	16,4	2,2
Juglon 10µM + 100µM benzoátu sodného	2689,3	56,0	1162,0	11,3	2,3
Juglon 10µM + 500µM peroxidu vodíku	1654,7	40,4	837,7	28,4	2,0

Tab. č. 10: Obsah jednotlivých chlorofylů.

Lze pozorovat, že vzorky ovlivněné juglonem o koncentraci 1  $\mu\text{M}$  a to i s přidáním benzoátem sodným a peroxidem vodíku, mají na oba typy chlorofylů obdobné účinky, jelikož poměrově se oba chlorofyly u prvních 4 vzorků téměř nemění. Pomocí spojnice trendů lze předpovědět, jak by se mohl poměr chlorofylů měnit s navyšující se koncentrací naftochinonu (graf 8).



Graf č. 8: Poměr chlorofylů a/b.

Se zvýšenou koncentrací juglonu dochází ke snížení poměru chlorofylů *a* a *b*. Hlavním důvodem tohoto poklesu je rozdílný vliv působících látek na oba chlorofyly. Zatímco u chlorofylu typu *a* je u koncentrace 10  $\mu\text{M}$  znatelný výrazný pokles, chlorofyl typu *b* se pohybuje téměř na stejné hodnotě jako při nižší koncentraci juglonu.

Jelikož se tyto dvě formy chlorofylů liší pouze v substituci methylové skupiny (*b*) za aldehydovou (*a*) na třetím atomu uhlíku, můžeme předpokládat, že je chlorofyl typu *b* odolnější vůči naftochinonům právě díky přítomnosti methylové skupiny ve své struktuře. Ve výsledku však dochází s rostoucími koncentracemi naftochinonu k celkovému poklesu obsahu chlorofylů, což má za následek sníženou fotosyntetickou schopnost rostliny.

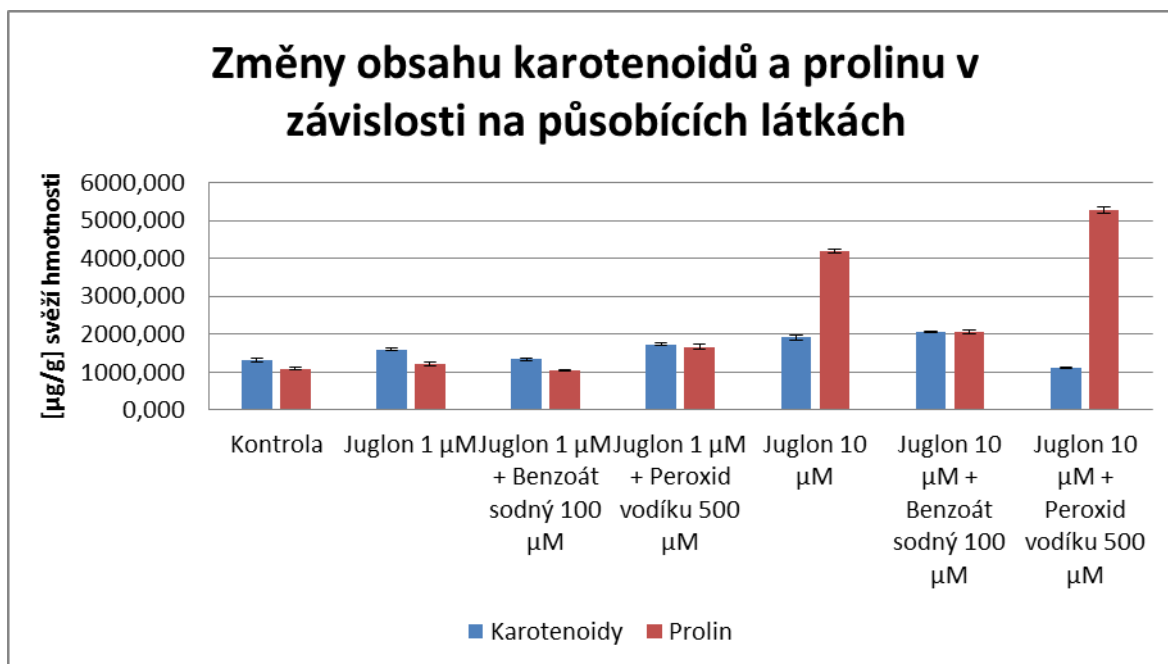
## Změny obsahu karotenoidů a prolinu

Typ vzorku	Karotenoidy [ $\mu\text{g/g}$ ] svěží hmotnosti		Prolin [ $\mu\text{g/g}$ ] svěží hmotnosti	
	Průměr	Směrodatná odchylka	Průměr	Směrodatná odchylka
Kontrola	1312,0	41,5	1087,3	24,9
Juglon $1\mu\text{M}$	1600,0	47,6	1204,0	42,5
Juglon $1\mu\text{M}$ + $100\mu\text{M}$ benzoátu sodného	1332,3	24,0	1056,0	17,2
Juglon $1\mu\text{M}$ + $500\mu\text{M}$ peroxidu vodíku	1724,7	35,1	1663,3	64,4
Juglon $10\mu\text{M}$	1905,7	56,6	4192,7	60,0
Juglon $10\mu\text{M}$ + $100\mu\text{M}$ benzoátu sodného	2058,1	32,5	2057,1	38,5
Juglon $10\mu\text{M}$ + $500\mu\text{M}$ peroxidu vodíku	1096,7	19,8	5271,3	71,8

Tab. č. 11: Obsah karotenoidů a prolinu.

Karotenoidy patří podobně jako chlorofyly mezi fotosyntetická barviva. Je tedy zajímavé pozorovat, že působící látky juglon, benzoát sodný a peroxid vodíku na ně mají poněkud jiný vliv než na chlorofyly. Již od nejnižší koncentrace juglonu můžeme sledovat zvýšení obsahu karotenoidů. S rostoucí koncentrací juglonu na  $10\ \mu\text{M}$  pozorujeme další pozvolné zvyšování obsahu karotenoidů ve vzorcích, až po koncentraci juglonu  $10\ \mu\text{M}$  s přidaným peroxidem vodíku o koncentraci  $500\ \mu\text{M}$ , kdy se obsah karotenoidů snížil přibližně na hodnotu naměřenou u kontrolního vzorku. Důvod odlišných účinků naftochinonu na karotenoidy a chlorofyly může být odlišná barva karotenoidů, které absorbují energii z odlišného spektra viditelné světelné energie (graf 9).

Druhá zkoumaná látka znázorňující změny obsahu prolinu nám až po koncentraci juglonu  $1\ \mu\text{M}$  s přidaným peroxidem vodíku o koncentraci  $500\ \mu\text{M}$  koreluje s hodnotami pro karotenoidy. Pro vzorek se zvýšenou koncentrací juglonu na  $10\ \mu\text{M}$  však dochází k rapidnímu nárůstu obsahu prolinu, který byl utlumen přidaným benzoátem sodným, ale naopak ještě navýšen peroxidem vodíku. Jelikož se prolin hojně vyskytuje v kolagenu a je důležitou složkou pro jeho tvorbu, lze předpokládat, že u vyšších koncentrací naftochinonu dojde k výraznému zvýšení produkce kolagenu (graf 9).



Graf č. 9: Změny obsahu karotenoidů a prolinu v závislosti na působících látkách.

## Vliv na viabilitu

Pro testování životaschopnosti buněk byl užit TTC test a jeho modifikovaná forma MTT test. Obě metody se vyhodnocují na základě změřených absorbancí, přičemž čím vyšší je hodnota absorpance, tím je více živých buněk v daném vzorku. Naměřené hodnoty absorpance byly vztaženy vždy ke kontrolnímu vzorku dané rostlinné části, kdy kontrola představovala 100%

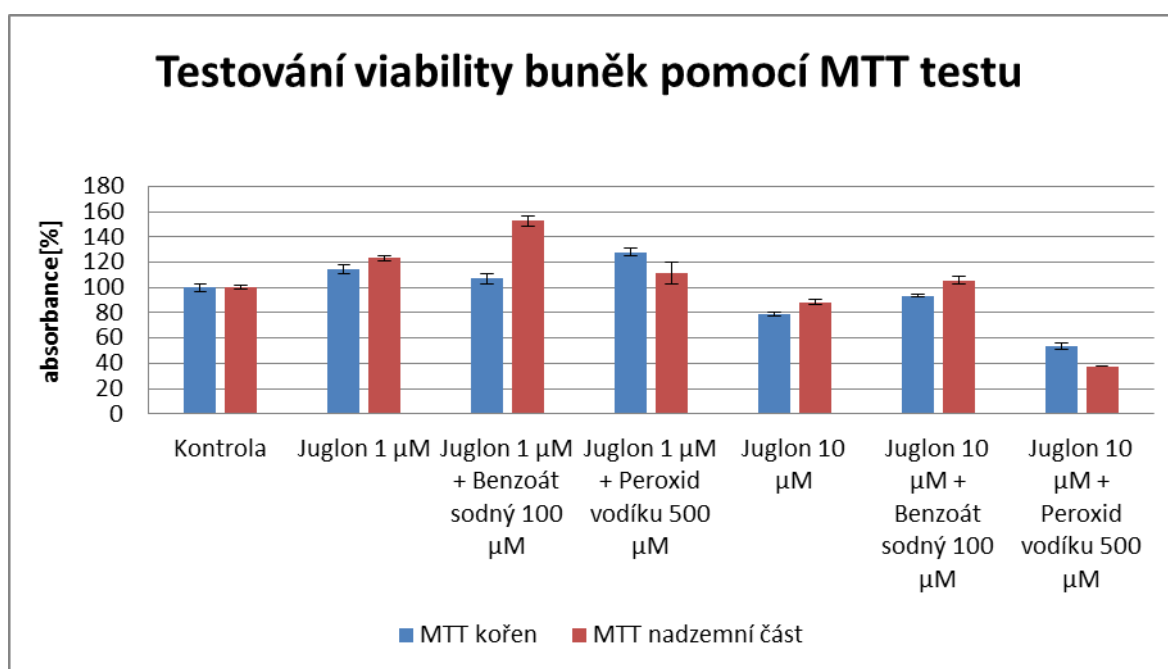
Typ vzorku	MTT – kořen [%]		MTT – nadzemní část [%]	
	Průměr	Směrodatná odchylka	Průměr	Směrodatná odchylka
Kontrola	100,0	3,0	100,0	1,7
Juglon 1µM	114,7	3,9	123,4	1,9
Juglon 1µM + 100µM benzoátu sodného	107,2	3,9	152,7	4,3
Juglon 1µM + 500µM peroxidu vodíku	128,2	3,1	111,7	8,9
Juglon 10µM	79,1	1,7	88,5	1,8
Juglon 10µM + 100µM benzoátu sodného	93,5	1,0	105,9	2,7
Juglon 10µM + 500µM peroxidu vodíku	53,4	2,6	37,9	0,4

Tab. č. 12: Data MTT test.

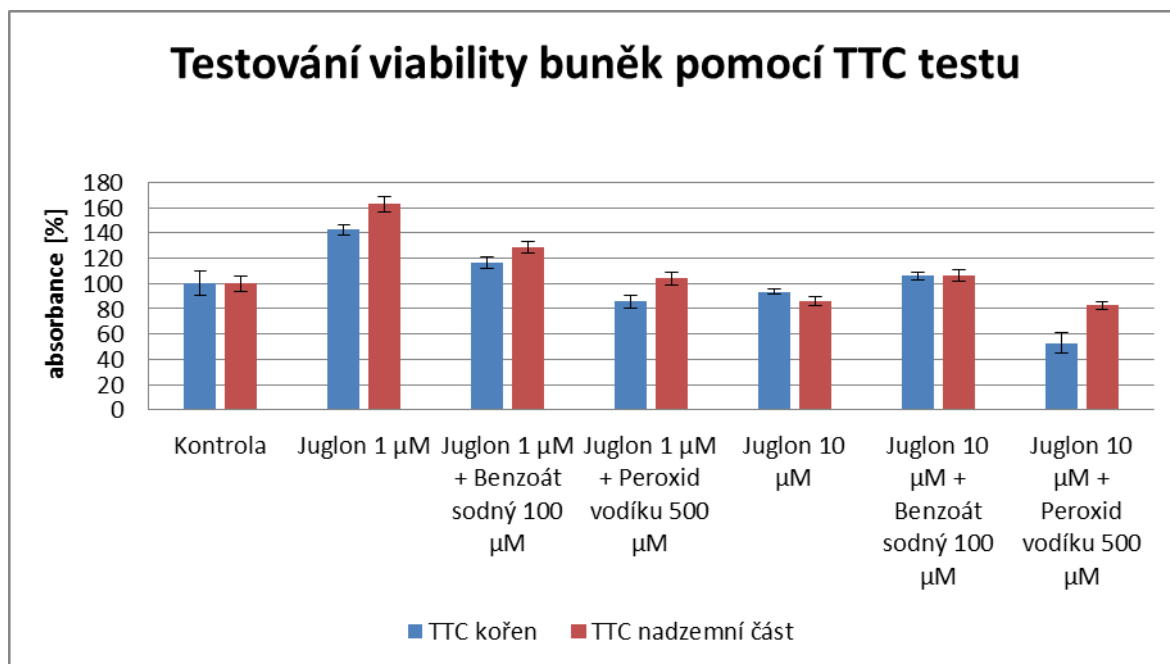
Typ vzorku	TTC – kořen [%]		TTC – nadzemní část [%]	
	Průměr	Směrodatná odchylka	Průměr	Směrodatná odchylka
Kontrola	100,0	9,7	100,0	6,0
Juglon 1μM	142,6	4,2	163,0	5,9
Juglon 1μM + 100μM benzoátu sodného	116,5	4,2	128,7	4,1
Juglon 1μM + 500μM peroxidu vodíku	85,6	5,1	104,0	4,9
Juglon 10μM	93,5	1,8	85,7	3,4
Juglon 10μM + 100μM benzoátu sodného	106,0	3,0	106,6	4,6
Juglon 10μM + 500μM peroxidu vodíku	52,9	8,2	82,6	2,7

Tab. č. 13: Data TTC test.

Testy MTT a TTC nám určují aktivitu oxidoreduktáz-dehydrogenáz. Z grafu 10 a grafu 11 je znatelné, že malá koncentrace naftochinonu by mohla stimulační účinky na jejich aktivitu. U obou typů testů a pro obě rostlinné části je zaznamenána zvýšená aktivita oxidoreduktáz-dehydrogenáz u koncentrace juglonu 1 μM. Pro koncentraci juglonu 10 μM se však již tato aktivita snížila pod úroveň kontrolních vzorků a lze tedy předpokládat, že pro zvyšující se koncentrace naftochinonu by byla aktivita buněk stále menší, až by docházelo k jejich postupnému odumírání.



Graf č. 10: Testování viability buněk pomocí MTT testu.



Graf č. 11: Testování viability buněk pomocí TTC testu.

# 13. Spektrofotometrické vyhodnocení syntézy sekundárních metabolitů

Po domluvě s vedoucím mé diplomové práce prof. Ing. Ivo Provazníkem, Ph.D. byla z technických důvodů místo HPLC analýzy vyhodnocována syntéza sekundárních metabolitů, to za využití spektrofotometrické analýzy. Jednalo se o celkové fenoly, flavonoidy, proanthokyanidiny a anthokyany kořene a nadzemní části rostliny (tab. 14).

Sekundární metabolit	Popis
Fenoly	Jedná se o sloučeniny, které ve své struktuře obsahují hydroxylovou funkční skupinu (-OH), která je navázána přímo na aromatické jádro. Fenoly a jejich deriváty jsou rozšířenou přírodní látkou, která je hojně produkována celou řadou rostlin. [29], [34]
Flavonoidy	Flavonoidy patří do skupiny rostlinných fenolických látek. Neúčastní se přímo fotosyntézy, ale napomáhají rostlinám reagovat na změny podmínek životního prostředí či účinky patogenů. [30], [34]
Proanthokyanidiny	Esenciální polymerní řetězce flavonoidů obsažené v mnohých rostlinách. Proanthokyanidiny vykazují silnou antioxidační aktivitu. [31], [34]
Anthokyany	Anthokyany patří podobně jako proanthokyanidiny do skupiny fenolických látek flavonoidů. V přírodě jsou značně rozšířeny a v rostlinách se vyskytují ve formě glykosidů. [32], [34]

Tab. č. 14: Vyhodnocované sekundární metabolity.

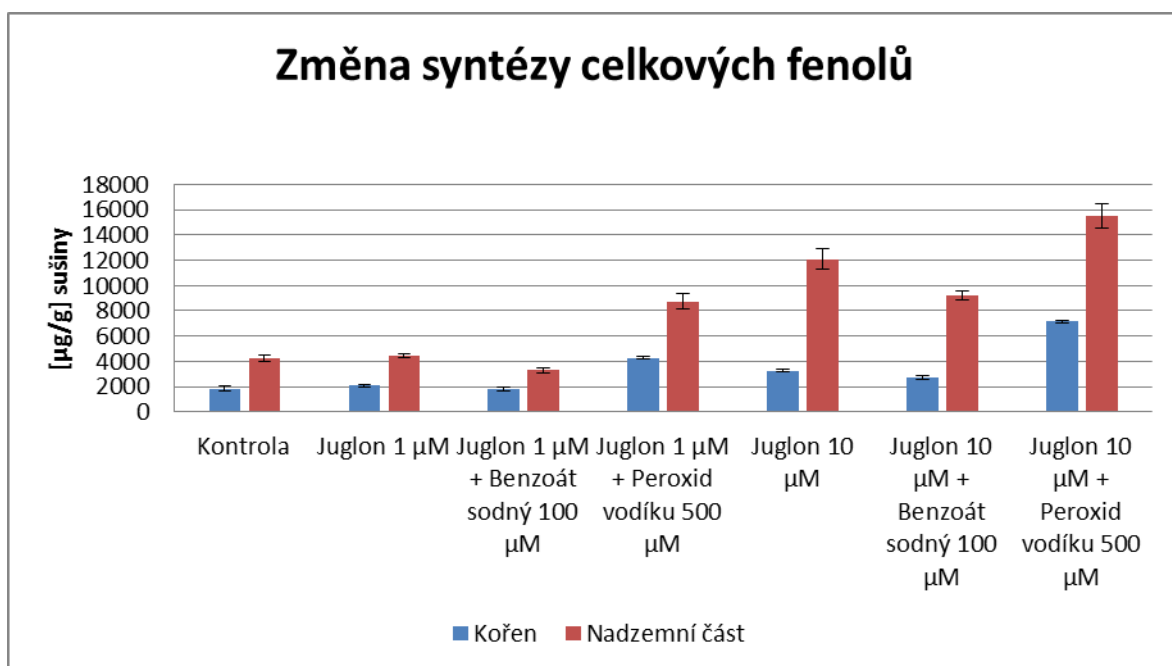
Měření byla prováděna na kořeni a nadzemních částech rostliny. Pro všechny zkoumané parametry byla vypočítána průměrná hodnota ze tří měření. Před samotnou analýzou získaných se provedly testy normality a na základě rozložení jednotlivých datových skupin se testovala statistická významnost užitím Pearsonova nebo Spearmanova korelačního testu.

## Změna syntézy celkových fenolů

Jelikož hodnoty celkových fenolů pro kořenovou i nadzemní část mají podle testu normality normální rozložení (tab. 15), pro zjištění statistické významnosti byl užit Pearsonův korelační test. U obou zkoumaných rostlinných částí je znatelná změna syntézy fenolů. Podle výšky jednotlivých sloupců v grafu 12 můžeme tvrdit, že větší množství celkových fenolů je syntetizováno v nadzemních částech rostliny.

Typ vzorku	Celkové fenoly – kořen [µg/g] sušiny		Celkové fenoly - nadzemní část [µg/g] sušiny	
	Průměr	Směrodatná odchylka	Průměr	Směrodatná odchylka
Kontrola	1843,3	190,1	4203,3	253,7
Juglon 1µM	2086,7	77,6	4473,3	165,8
Juglon 1µM + 100µM benzoátu sodného	1780,0	163,9	3300,0	196,5
Juglon 1µM + 500µM peroxidu vodíku	4290,0	109,8	8733,3	606,9
Juglon 10µM	3246,7	91,0	12106,7	834,9
Juglon 10µM + 100µM benzoátu sodného	2736,7	166,8	9246,7	335,3
Juglon 10µM + 500µM peroxidu vodíku	7153,3	75,9	15523,3	953,6

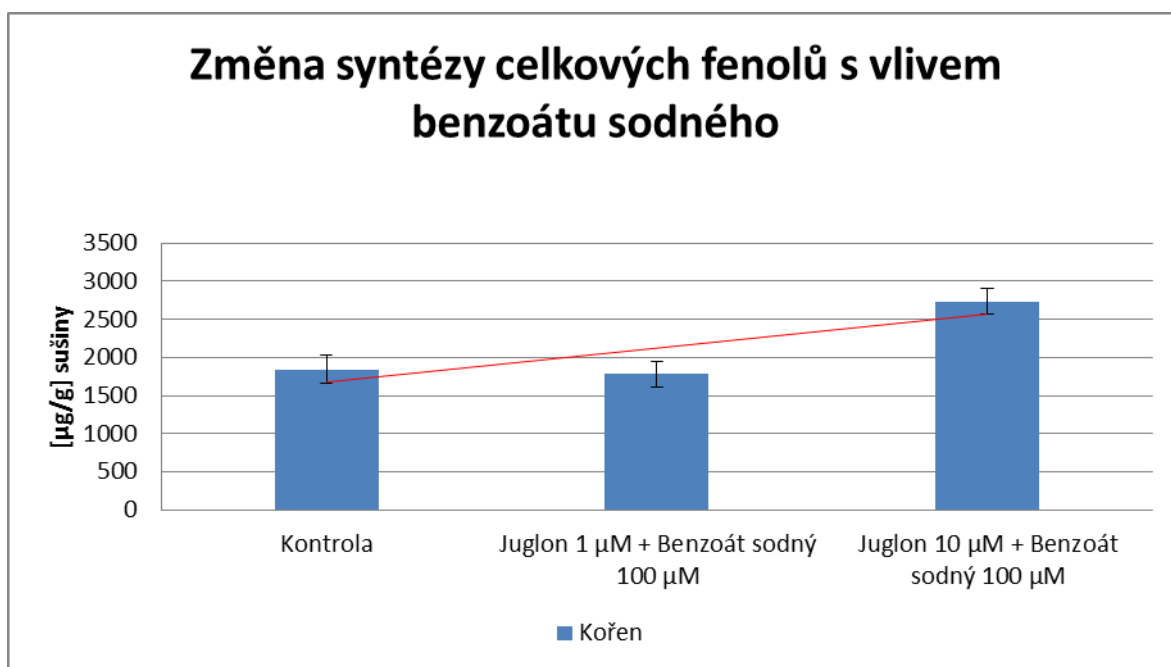
Tab. č. 15.: Syntéza celkových fenolů.



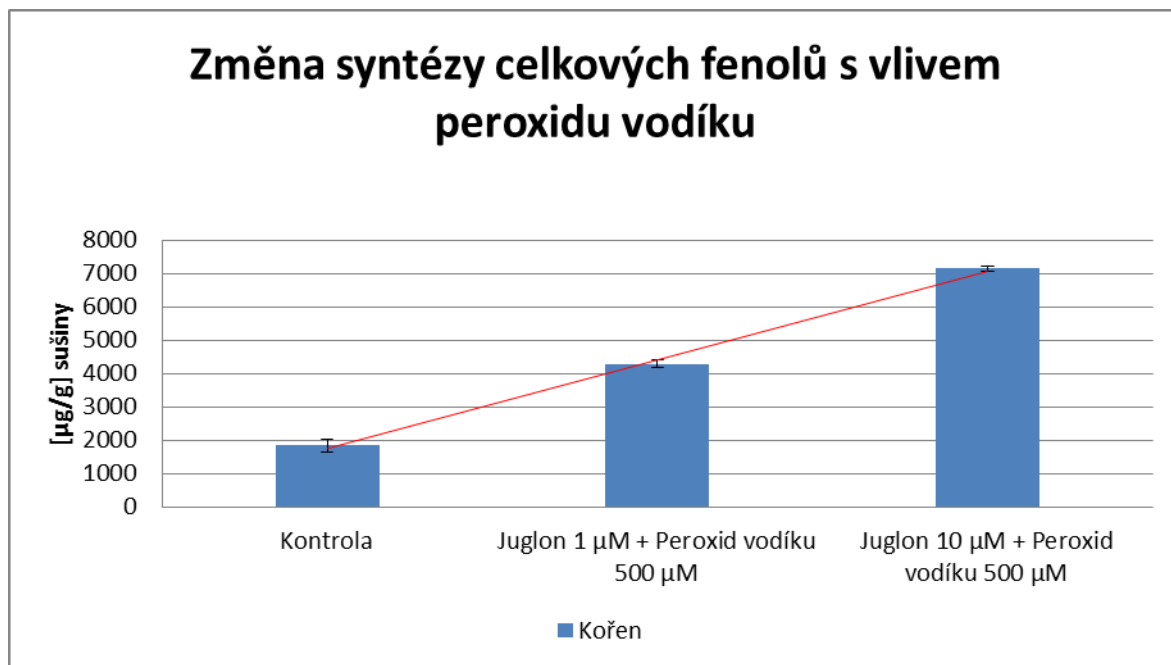
Graf č. 12: Změna syntézy celkových fenolů.

Při srovnávání rozdílného vlivu benzoátu sodného a peroxidu vodíku pozorujeme, jak tyto látky ovlivňují nárůst syntézy celkových fenolů. Zatímco benzoát sodný o koncentraci 100 µM syntézu fenolů poměrně tlumí (graf 13), peroxid vodíku ji velmi navyšuje (graf 14). Při koncentraci juglonu 10 µM se liší hodnoty pro vzorky ovlivněné benzoátem sodným a peroxidem vodíku o téměř 4500 µg/g sušiny. Také podle spojnice trendu dat můžeme předpovědět, jak by se syntéza pohybovala s rostoucími koncentracemi působících látek a její

strmost napovídá, že peroxid vodíku aktivně zvyšuje syntézu fenolů mnohem víc, než benzoát sodný (graf 14).



Graf č. 13: Změna syntézy celkových fenolů s vlivem benzoátu sodného.



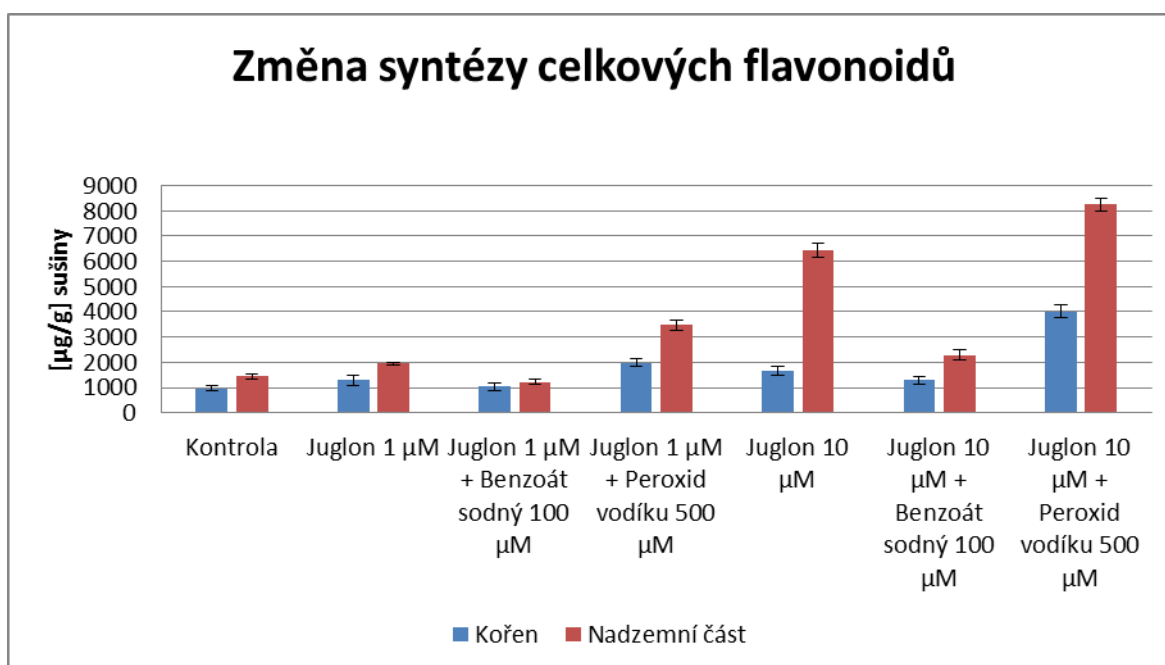
Graf č. 14: Změna syntézy celkových fenolů s vlivem peroxidu vodíku.

## Změna syntézy celkových flavonoidů

Typ vzorku	Celkové flavonoidy – kořen [μg/g] sušiny		Celkové flavonoidy - nadzemní část [μg/g] sušiny	
	Průměr	Směrodatná odchylka	Průměr	Směrodatná odchylka
Kontrola	972,7	93,7	1450,0	90,9
Juglon 1μM	1286,9	217,2	1950,0	64,8
Juglon 1μM + 100μM benzoátu sodného	1053,9	154,2	1226,7	114,7
Juglon 1μM + 500μM peroxidu vodíku	1976,0	152,5	3476,7	212,3
Juglon 10μM	1677,1	169,4	6436,7	301,4
Juglon 10μM + 100μM benzoátu sodného	1292,0	155,0	2296,7	189,3
Juglon 10μM + 500μM peroxidu vodíku	4017,9	263,4	8236,7	250,4

Tab. č. 16: Syntéza celkových flavonoidů.

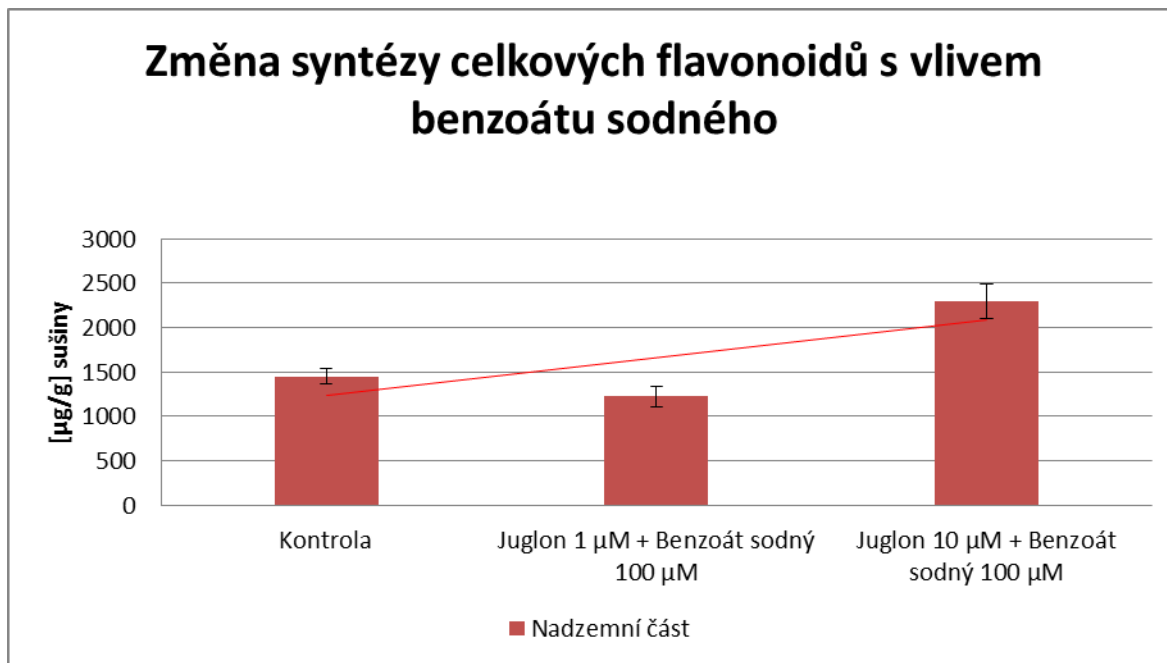
Skupina dat reprezentující syntézu celkových flavonoidů má podobně jako je tomu u celkových fenolů rostoucí charakter. Větší množství syntetizovaných flavonoidů můžeme pozorovat u nadzemních částí rostliny (graf 15).



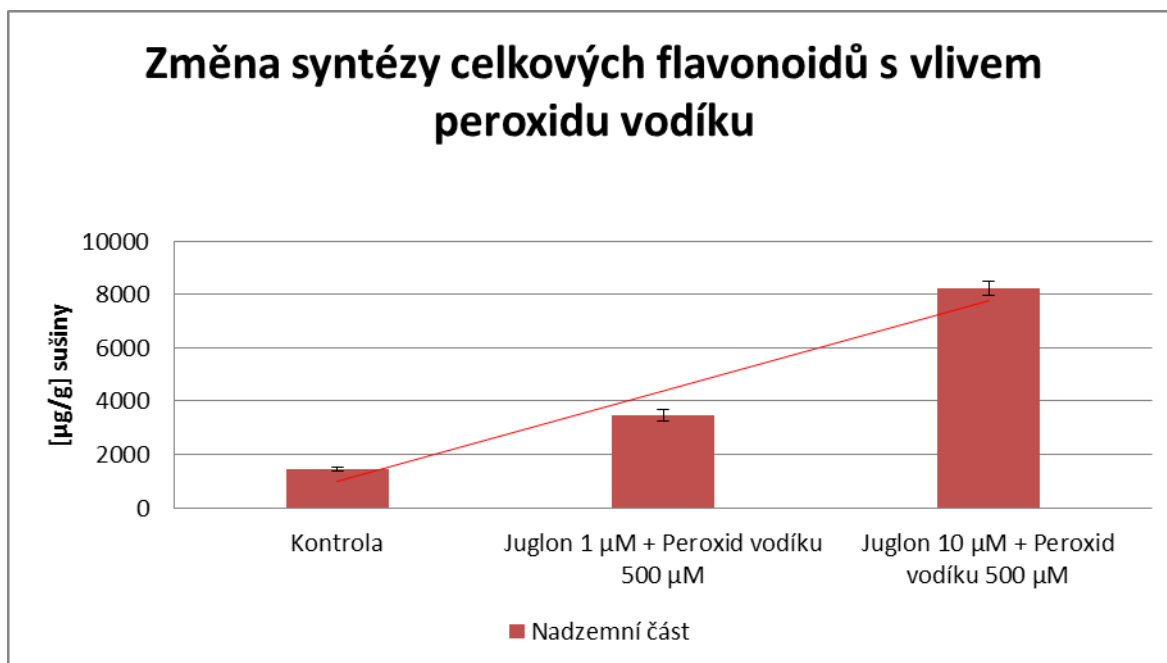
Graf č. 15: Změna syntézy celkových flavonoidů.

Pro zkoumání vlivu benzoátu sodného a peroxidu vodíku byla tentokrát vybrána data reprezentující nadzemní část rostlin. Podobně jako u celkových fenolů můžeme pozorovat, že

benzoát sodný nezvyšuje syntézu celkových flavonoidů v takové míře jako peroxid vodíku. Rozdíl těchto vzorků při koncentraci juglonu 10  $\mu\text{M}$  je přibližně 6000  $\mu\text{g/g}$  sušiny. Podle spojnice trendu dat můžeme opět předpovědět, že syntéza flavonoidů by se zvyšující koncentrací juglonu narůstala. (graf 16, graf 17).



Graf č. 16: Změna syntézy celkových flavonoidů s vlivem benzoátu sodného.



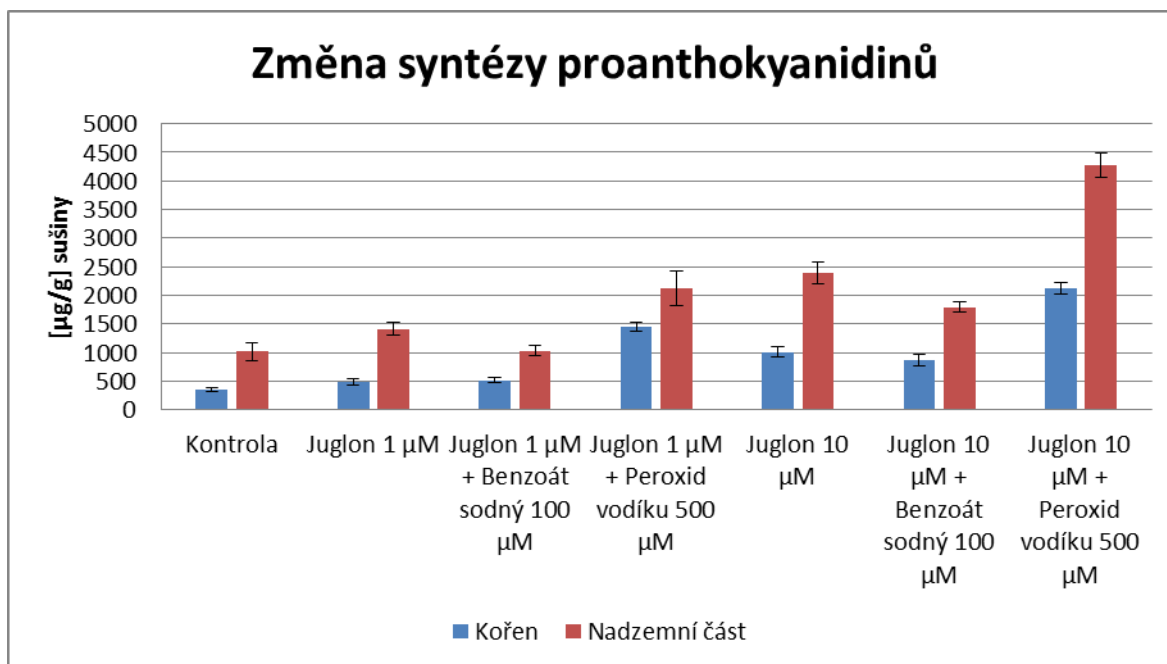
Graf č. 17: Změna syntézy celkových flavonoidů s vlivem peroxidu vodíku.

## Změna syntézy proanthokyanidinů

Typ vzorku	Proanthokyanidiny – kořen [μg/g] sušiny		Proanthokyanidiny - nadzemní část [μg/g] sušiny	
	Průměr	Směrodatná odchylka	Průměr	Směrodatná odchylka
Kontrola	353,3	40,3	1016,5	146,7
Juglon 1μM	493,3	60,2	1416,7	105,1
Juglon 1μM + 100μM benzoátu sodného	516,7	49,9	1037,5	98,5
Juglon 1μM + 500μM peroxidu vodíku	1443,3	79,3	2133,0	304,2
Juglon 10μM	1013,3	97,4	2396,3	188,9
Juglon 10μM + 100μM benzoátu sodného	870,0	110,5	1790,7	87,8
Juglon 10μM + 500μM peroxidu vodíku	2123,3	102,7	4276,5	213,7

Tab. č. 17: Syntéza proanthokyanidinů

Množství proanthokyanidinů v rostlinných vzorcích je ukazatelem míry antioxidační aktivity rostliny. Na grafu 18 můžeme pozorovat zvýšenou antioxidační aktivitu a to především u vzorků s přidaným peroxidem vodíku. Lze předpokládat, že u vzorků se zvýšenou antioxidační aktivitou dochází ke snaze bojovat s měnícími se nepříznivými podmínkami, způsobenými působícími látkami. Větší množství syntetizovaných proanthokyanidinů se nachází opět v nadzemních částech rostliny. Pro vzorek nadzemní části rostliny ovlivněný juglonem 1 μM a peroxidem vodíku 500 μM je pozorovatelná poměrně velká směrodatná odchylka. Jelikož jsou v grafu vyneseny průměrné hodnoty tří měření, tato směrodatná odchylka nám určuje rozdíl v jednotlivých měřeních. Čím vyšší je hodnota směrodatné odchylky, tím rozdílnější jednotlivá měření jsou a narůstá nám chyba měření (graf 18).



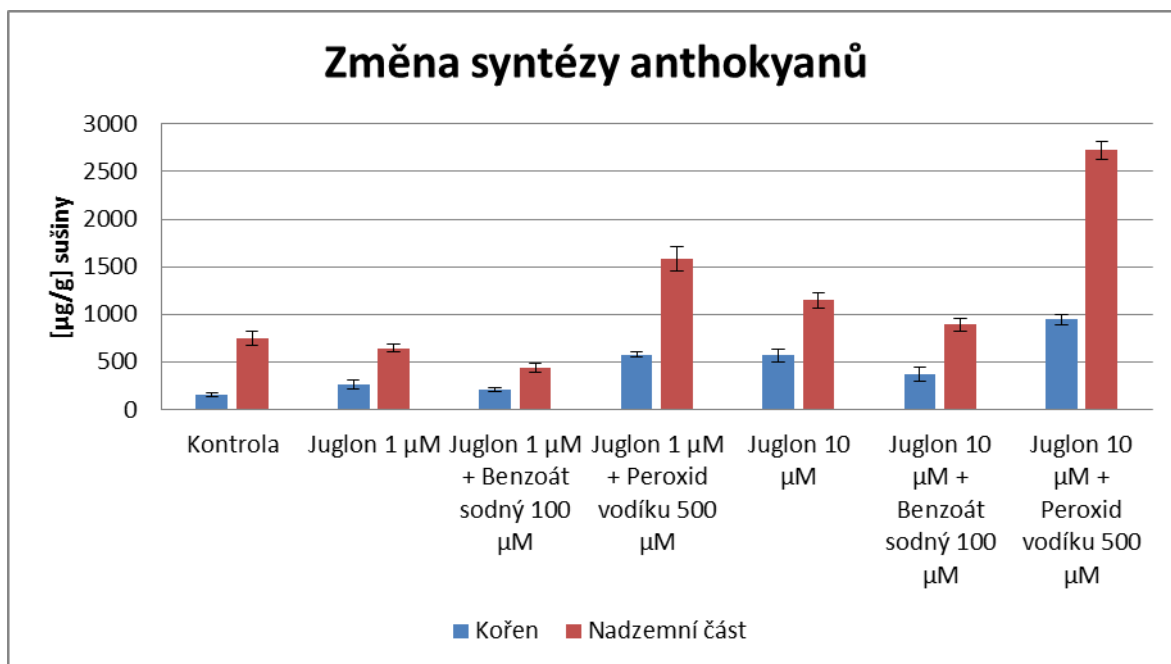
Graf č. 18: Změna syntézy proanthokyanidinů.

### Změna syntézy anthokyanů

Typ vzorku	Anthokyanany – kořen [µg/g] sušiny		Anthokyanany - nadzemní část [µg/g] sušiny	
	Průměr	Směrodatná odchylka	Průměr	Směrodatná odchylka
Kontrola	156,7	23,6	753,3	74,1
Juglon 1µM	263,3	49,9	648,5	43,5
Juglon 1µM + 100µM benzoátu sodného	216,7	20,5	439,5	43,5
Juglon 1µM + 500µM peroxidu vodíku	580,0	29,4	1587,2	131,0
Juglon 10µM	573,3	66,5	1147,7	85,1
Juglon 10µM + 100µM benzoátu sodného	373,3	68,5	896,0	65,3
Juglon 10µM + 500µM peroxidu vodíku	946,7	54,4	2722,1	94,3

Tab. č. 18: Syntéza anthokyanů.

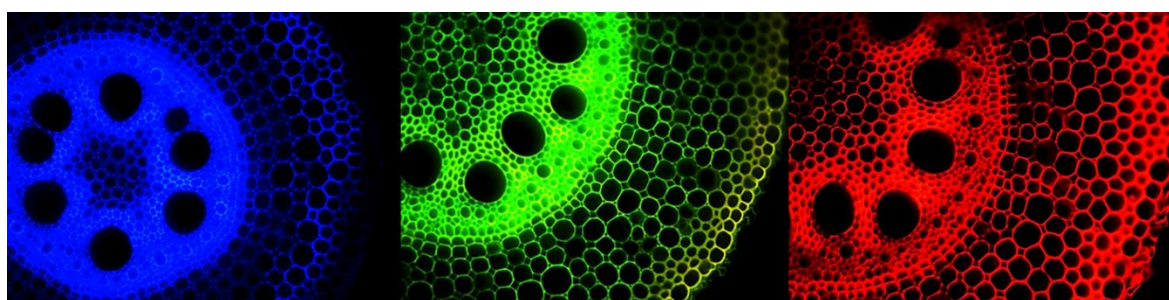
Syntéza anthokyanů podobně jako syntéza všech předešlých fenolických látek vykazuje rostoucí charakter s navyšujícími se koncentracemi působících látek. Největší syntéza je prokazatelná u vzorků s přidaným peroxidem vodíku a opět lze z grafu vyčíst, že anthokyanany jsou více syntetizovány nadzemními částmi rostliny (graf 19).



Graf č. 19: Změna syntézy anthokyanů.

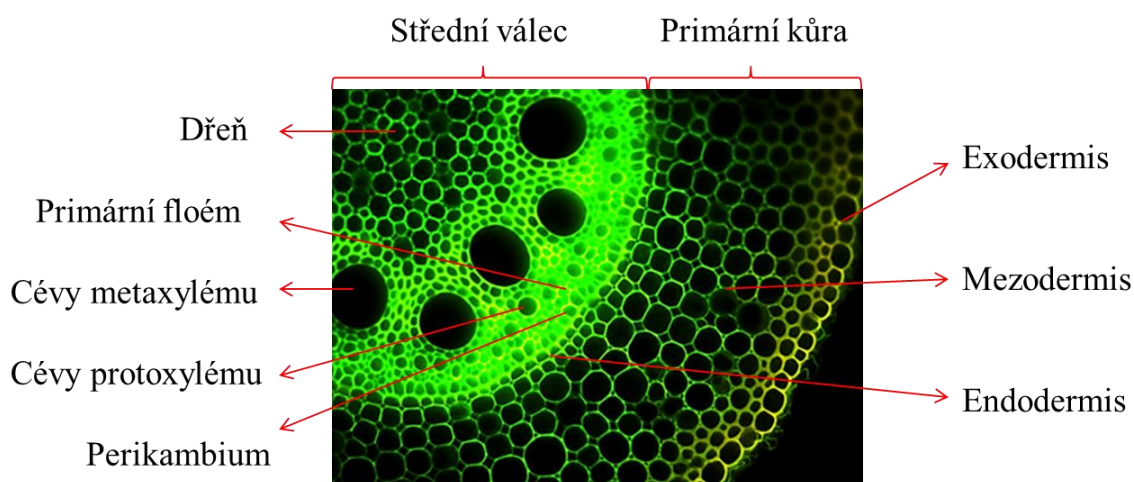
## 14. Vyhodnocení mikroskopických dat

Změna syntézy fenolických látek byla stanovována také užitím fluorescenční mikroskopie. Pro získání mikroskopických obrazů byly použity tři typy emisních filtrů, které absorbují záření o různých vlnových délkách. Jedná se o filtr DAPI, který má emisní spektrum kalibrováno pro látku DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol dihydrochloride). Tento typ filtru detekuje záření v modré oblasti na vlnových délkách od 358 – 461 nm. Druhým typem použitého filtru je FITC (fluorescein isokyanát), který detekuje na vlnových délkách 495 – 525 nm, což odpovídá zelené oblasti spektra. Posledním filtrem je filtr TRITC (tetramethylrhodamin isokyanát) o rozsahu vlnových délek 535 – 580 nm, díky kterému jsou získány červeně zbarvené mikroskopické obrazy (obr. 14). [33]



Obr. č. 14: Fluorescenční mikroskopické obrazy kořene získané s využitím DAPI, FITC a TRITC filtru.

Získané obrazy kořene můžeme rozdělit na dvě základní části. Vnější část neboli primární kůru, která se skládá z exodermis, mezodermis a endodermis a vnitřní část stéle, jinak též střední válec, který obsahuje perikambium, primární xylém (cévy protoxylému, cévy metaxylému), primární floém a dřev (obr. 15).

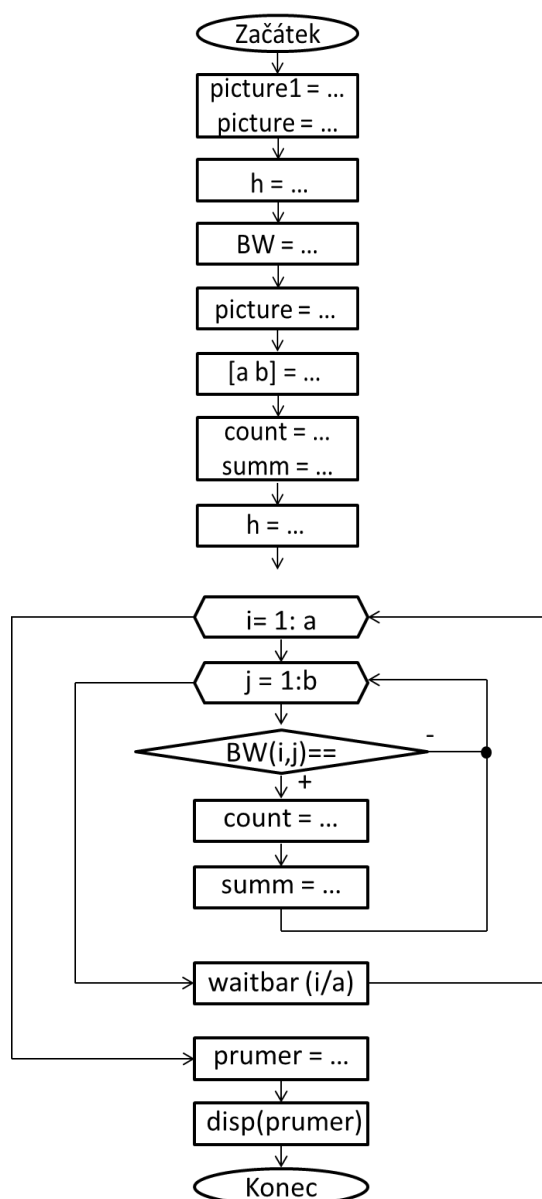


Obr. č. 15: Popis kořene.

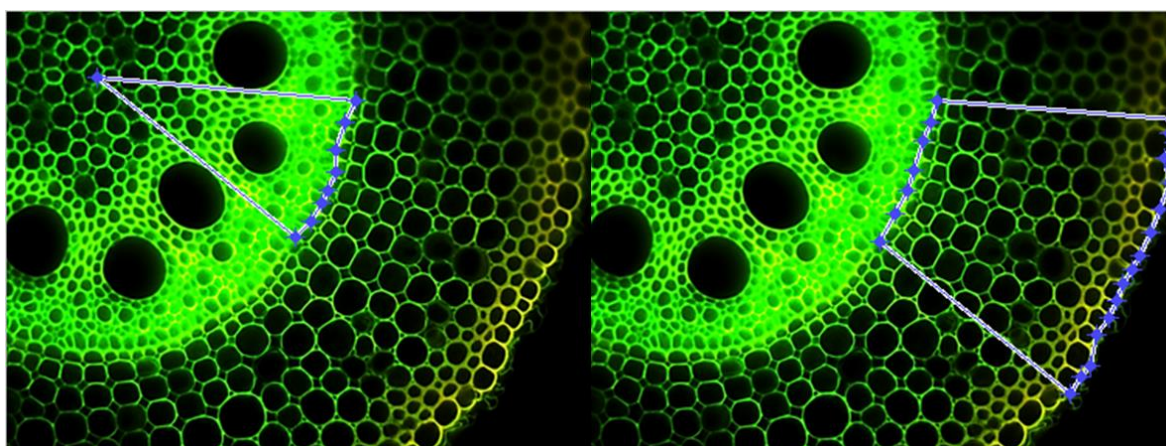
Zkoumané vzorky kořene byly stejně jako vzorky pro spektrofotometrickou analýzu ovlivněny naftochinonem juglon o koncentracích 1 a 10  $\mu\text{M}$ , benzoátem sodným

o koncentraci 100  $\mu\text{M}$  a peroxidem vodíku o koncentraci 500  $\mu\text{M}$ . Byla pozorována změna syntézy fenolických látek pro tři různé reagenty ( $\text{NH}_4\text{OH}$  – hydroxid amonný,  $\text{ZrCl}_4$  – chlorid zirkoničitý a NP).

Hlavním cílem analýzy mikroskopických obrazů bylo stanovit změny jejich intenzity při měnících se koncentracích působících látek. Tato změna intenzity byla různá pro primární kůru i pro střední válec a z tohoto důvodu se jasové hodnoty stanovovaly pro vnitřní i vnější část kořene zvlášť. Pomocí programového prostředí MATLAB je vytvořen skript, díky kterému si z každého analyzovaného obrazu kořene určíme výseč, pro kterou je vypočítána jasová hodnota každého pixelu (obr. 16). Získané hodnoty jsou poté zprůměrovány a každá výseč je reprezentována jedinou jasovou hodnotou. Pro zamezení zkreslení výsledků je skript opatřen příkazem pro počítání jasových hodnot pouze vyšších než 0, což znamená, že pixely odpovídající černé barvě s jasovou hodnotou 0 nejsou do průměru započítány (obr. 16).



Obr. č. 16: Vývojový diagram.



Obr. č. 17: Vybrané výseče středního válce a primární kůry pro analýzu intenzity v MATLABU.

Intenzita nabývající hodnot od 0 – 1 představuje míru koncentrace fenolických látek ve vzorku. Čím vyšší tato hodnota je, tím vyšší je také koncentrace fenolů ve vzorcích. Pro lepší vykreslení jsou jasové hodnoty vynásobeny 100.

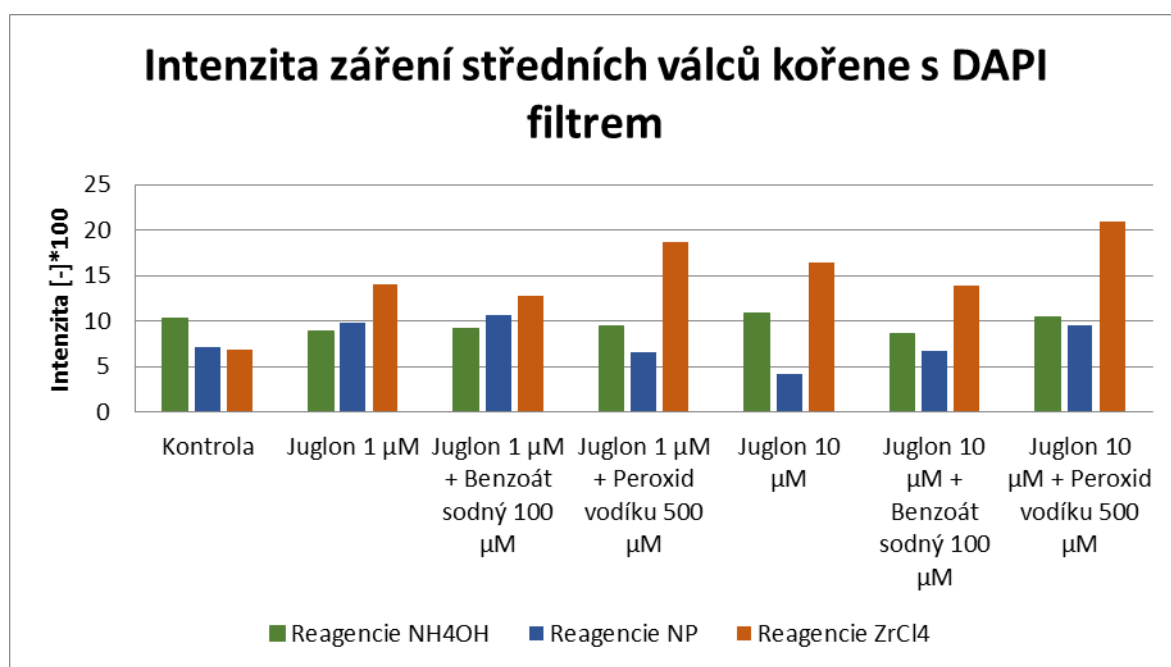
### Měření s DAPI filtrem

Jelikož bylo provedeno pro každý vzorek pouze jedno měření, není u vzorků vypočítána žádná směrodatná odchylka. Více měření nebylo potřeba, jelikož intenzita v dané výseči vycházela vždy téměř stejná a směrodatná odchylka nebyla téměř patrná.

Typ vzorku	Reagencie NH <sub>4</sub> OH		Reagencie NP		Reagencie ZrCl <sub>4</sub>	
	Střední válec	Primární kůra	Střední válec	Primární kůra	Střední válec	Primární kůra
Kontrola	10,37	3,87	7,13	2,86	6,92	3,96
Juglon 1 μM	8,97	5,19	9,89	3,63	14,04	3,98
Juglon 1 μM + Benzoát sodný 100 μM	9,15	3,77	10,63	8,84	12,82	4,04
Juglon 1 μM + Peroxid vodíku 500 μM	9,48	6,86	6,58	2,91	18,67	8,50
Juglon 10 μM	10,88	7,08	4,16	1,50	16,48	5,15
Juglon 10 μM + Benzoát sodný 100 μM	8,68	4,89	6,68	2,09	13,93	3,94
Juglon 10 μM + Peroxid vodíku 500 μM	10,49	4,83	9,50	5,72	21,04	9,40

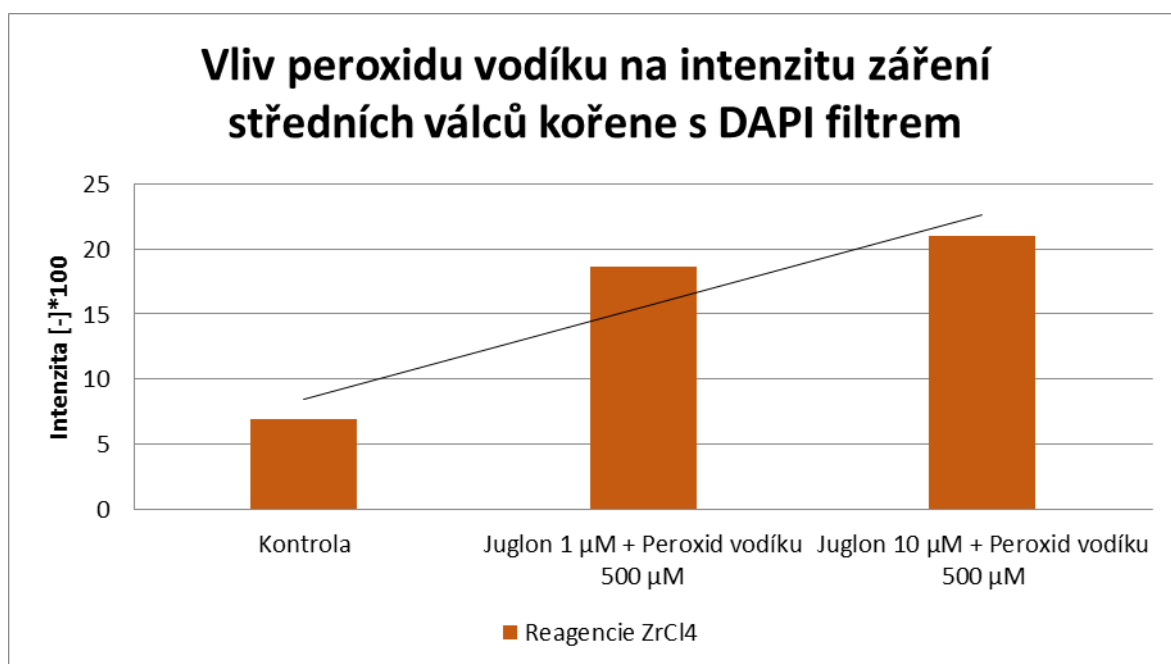
Tab. č. 19: Jasové hodnoty s použitím DAPI filtru.

S využitím DAPI filtru byly naměřeny nejvyšší hodnoty intenzity pro střední válec kořene. Na grafu 20, vyhodnoceném pro všechny tři typy reagensů, můžeme pozorovat změny syntézy fenolických látek. Pro první reagenii  $\text{NH}_4\text{OH}$  se syntéza fenolů pohybuje u všech vzorků kolem hranice intenzity 10. U těchto vzorků lze tvrdit, že měnící se koncentrace naftochinonu a ostatních působících látek neměla na syntézu fenolů velký vliv. Naopak u reagenie  $\text{ZrCl}_4$  vzrostla intenzita již u vzorku ovlivněného  $1 \mu\text{M}$  juglone, a až na vzorky ke kterým byl společně s juglonem přidán také benzoát sodný intenzita neustále narůstala. Jelikož koncentrace fenolických látek poukazuje na antioxidační aktivitu, můžeme tvrdit, že u vzorků se zvýšenou syntézou fenolů docházelo ke snaze eliminovat negativní účinky působících látek (graf 20).



Graf č. 20: Změny intenzity záření středních válců kořene s DAPI filtrem.

U reagenie  $\text{ZrCl}_4$  je zajímavé pozorovat vliv benzoátu sodného a peroxidu vodíku na dané vzorky. Zatímco benzoát sodný vždy u dané koncentrace juglonu ( $1$  nebo  $10 \mu\text{M}$ ) syntézu fenolů snížil, peroxid vodíku ji zvýšil (graf 21). Tato skutečnost nám potvrzuje vliv benzoátu sodného a peroxidu vodíku z předešlých spektrofotometrických měření syntézy fenolických látek (graf 14, graf 17).



Graf č. 21: Vliv peroxidu vodíku na intenzitu záření středních válců kořene s DAPI filtrem.

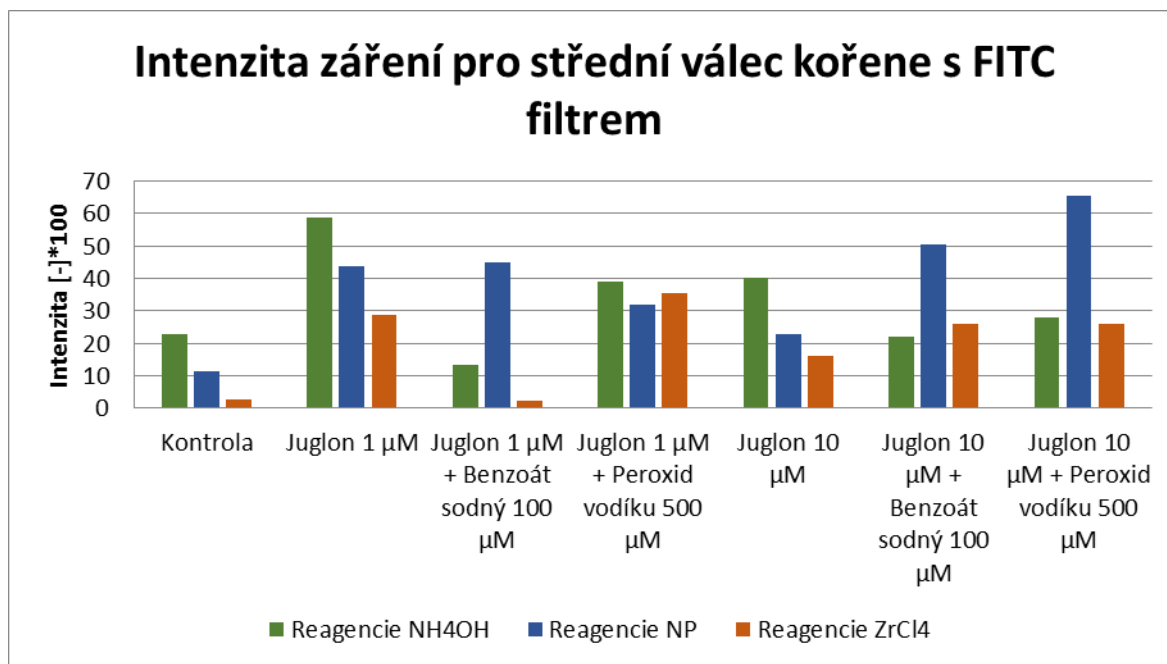
### Měření s FITC filtrem

Typ vzorku	Reagencie NH <sub>4</sub> OH		Reagencie NP		Reagencie ZrCl <sub>4</sub>	
	Střední válec	Primární kůra	Střední válec	Primární kůra	Střední válec	Primární kůra
Kontrola	22,95	5,45	11,54	11,17	2,54	8,52
Juglon 1 µM	58,57	8,88	43,62	34,14	28,82	32,25
Juglon 1 µM + Benzoát sodný 100 µM	13,26	6,53	44,86	62,01	2,44	10,98
Juglon 1 µM + Peroxid vodíku 500 µM	38,84	16,61	31,79	33,33	35,44	41,82
Juglon 10 µM	40,05	10,64	22,68	29,60	16,00	33,12
Juglon 10 µM + Benzoát sodný 100 µM	22,16	8,78	50,60	37,33	25,92	36,62
Juglon 10 µM + Peroxid vodíku 500 µM	28,07	15,68	65,59	58,42	25,87	44,41

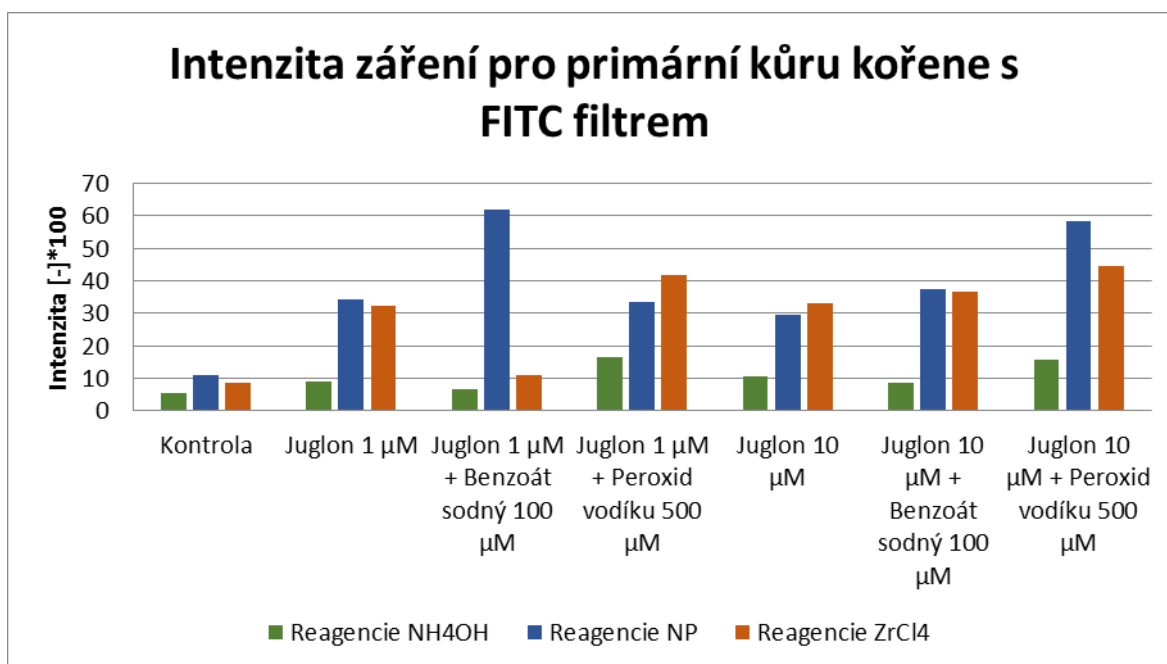
Tab. č. 20: Jasové hodnoty s použitím FITC filtru.

Z jasových hodnot naměřených použitím filtru FITC je zřejmé, jak docházelo ke zvýšení syntézy fenolických látek. Jak pro střední válec kořene, tak pro jeho primární kůru lze pozorovat téměř u všech vzorků, na které působil juglon, benzoát sodný nebo peroxid vodíku zvýšenou intenzitu, tedy syntézu fenolů (graf 22, graf 23). U některých vzorků, jako např. u vzorku ovlivněného juglonem 1 µM a benzoátem sodným o koncentraci 100 µM, pozorujeme u obou kořenových částí srovnatelnou hodnotu intenzity jako u kontrolního

vzorku. K této skutečnosti mohlo dojít z důvodu tlumících účinků benzoátu sodného (především v kombinaci s 1  $\mu\text{M}$  juglonem), jako tomu bylo již v předešlých měřeních. Vůbec nejvyšší hodnota intenzity byla naměřena pro vzorek středního válce kořene, který byl ovlivněn 10  $\mu\text{M}$  juglonem a 500  $\mu\text{M}$  peroxidem vodíku. Jedná se o vzorek, ve kterém fenolické sloučeniny reagovaly s reagentií NP. Hodnota intenzity se zde pohybuje kolem hodnoty 65, což svědčí o velkém množství syntetizovaných fenolických látek a vysoké antioxidační aktivitě.

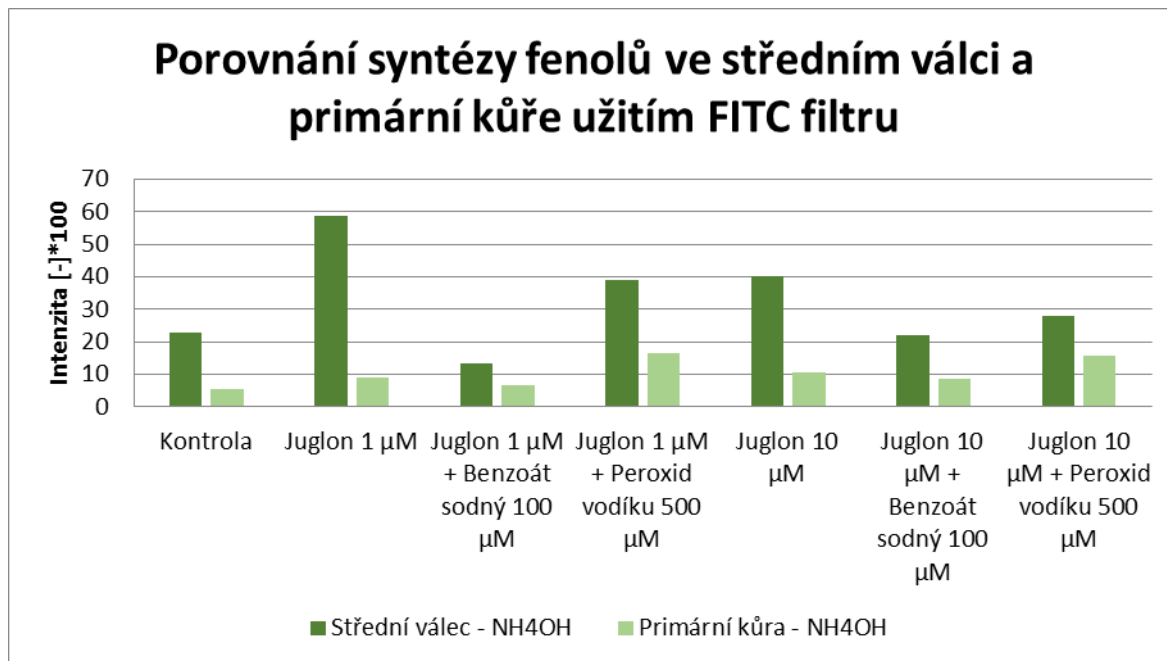


Graf č. 22: Intenzita záření pro střední válec kořene s FITC filtrem.



Graf č. 23: Intenzita záření pro primární kůru s FITC filtrem.

Na grafu 24 je znázorněna rozdílná intenzita pro vzorky středního válce a primární kůry, v nichž fenolické sloučeniny reagovaly s  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Je zřejmé, že syntéza fenolů probíhala ve zvýšené míře především ve středním válci, což vedlo ke zvýšené antioxidační aktivitě v této vnitřní struktuře kořene. Buňky primární kůry na působící látky příliš nereagovaly a nedá se říci, že by se zde nějak výrazně syntéza fenolických sloučenin zvýšila.



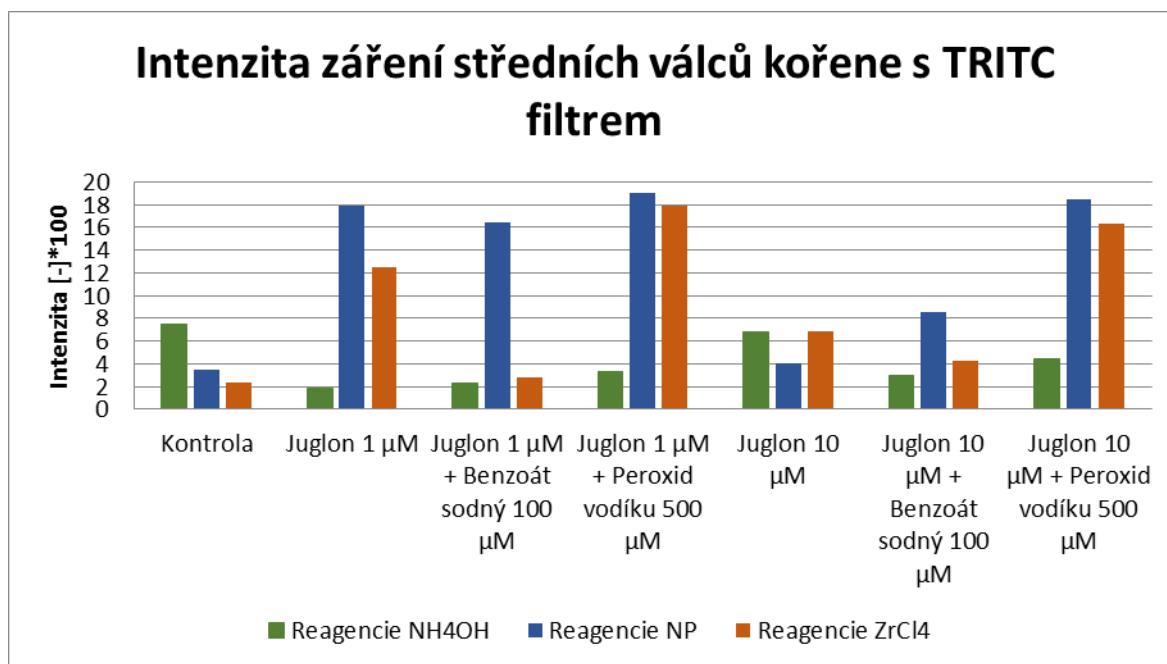
Graf č. 24: Porovnání syntézy fenolů ve středním válci a primární kůře užitím FITC filtru.

### Měření s TRITC filtrem

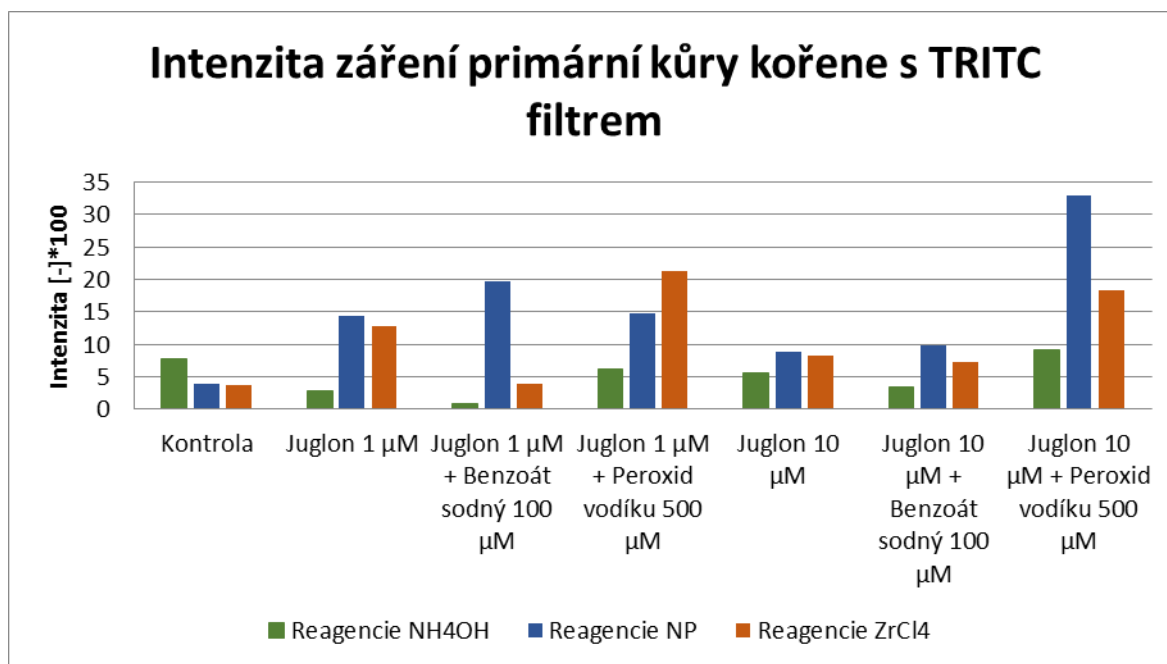
Typ vzorku	Reagencie $\text{NH}_4\text{OH}$		Reagencie NP		Reagencie $\text{ZrCl}_4$	
	Střední válec	Primární kůra	Střední válec	Primární kůra	Střední válec	Primární kůra
Kontrola	7,5,0	7,73	3,43	3,93	2,34	3,71
Juglon 1 $\mu\text{M}$	1,87	2,90	17,89	14,43	12,54	12,85
Juglon 1 $\mu\text{M}$ + Benzoát sodný 100 $\mu\text{M}$	2,31	0,95	16,44	19,70	2,82	3,92
Juglon 1 $\mu\text{M}$ + Peroxid vodíku 500 $\mu\text{M}$	3,30	6,27	19,01	14,68	17,92	21,36
Juglon 10 $\mu\text{M}$	6,78	5,52	4,02	8,89	6,81	8,35
Juglon 10 $\mu\text{M}$ + Benzoát sodný 100 $\mu\text{M}$	3,02	3,33	8,54	9,81	4,26	7,21
Juglon 10 $\mu\text{M}$ + Peroxid vodíku 500 $\mu\text{M}$	4,40	9,20	18,43	32,83	16,28	18,23

Tab. č. 21: Jasové hodnoty s použitím TRITC filtru.

S využitím TRITC filtru byly naměřeny nejvyšší intenzity při použití reagentů NP a  $ZrCl_4$  a to pro obě zkoumané kořenové části. U vzorků s reagenty  $NH_4OH$  byla prokázána nejvyšší syntéza fenolů u kontrolního vzorku, což nasvědčuje o tom, že syntéza fenolů ve vzorcích ovlivněných působícími látkami se snižovala a tedy nedocházelo ke zvyšování antioxidační aktivity, jako by se dalo předpokládat (graf 25, graf 26).

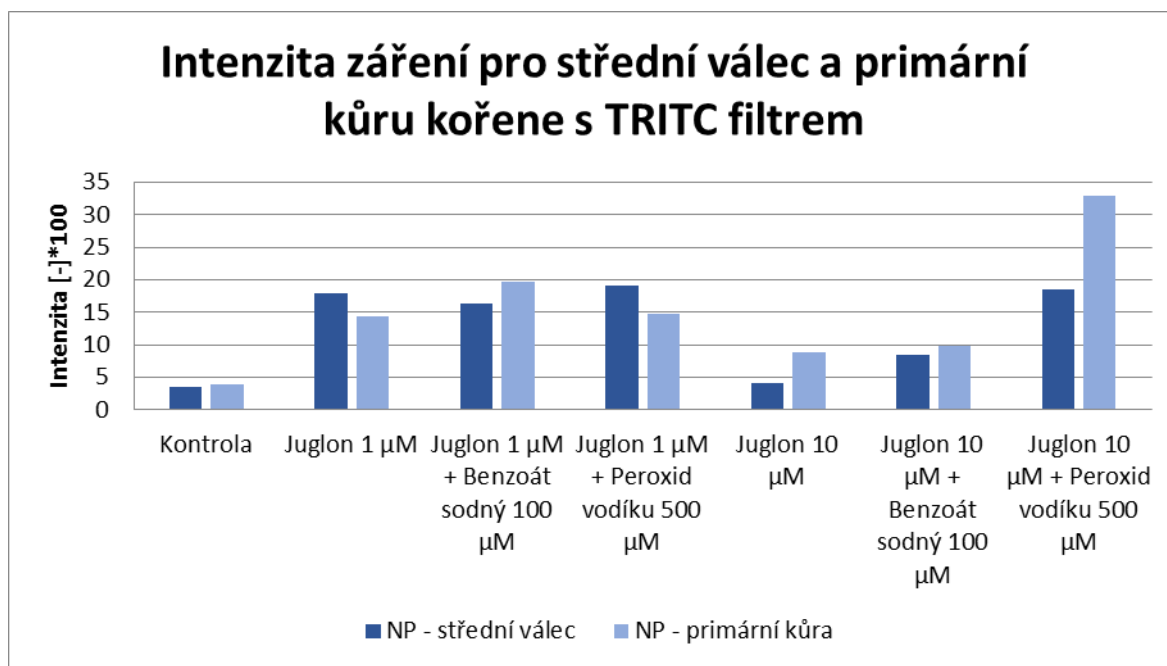


Graf č. 25: Intenzita záření středních válců kořene s TRITC filtrem.



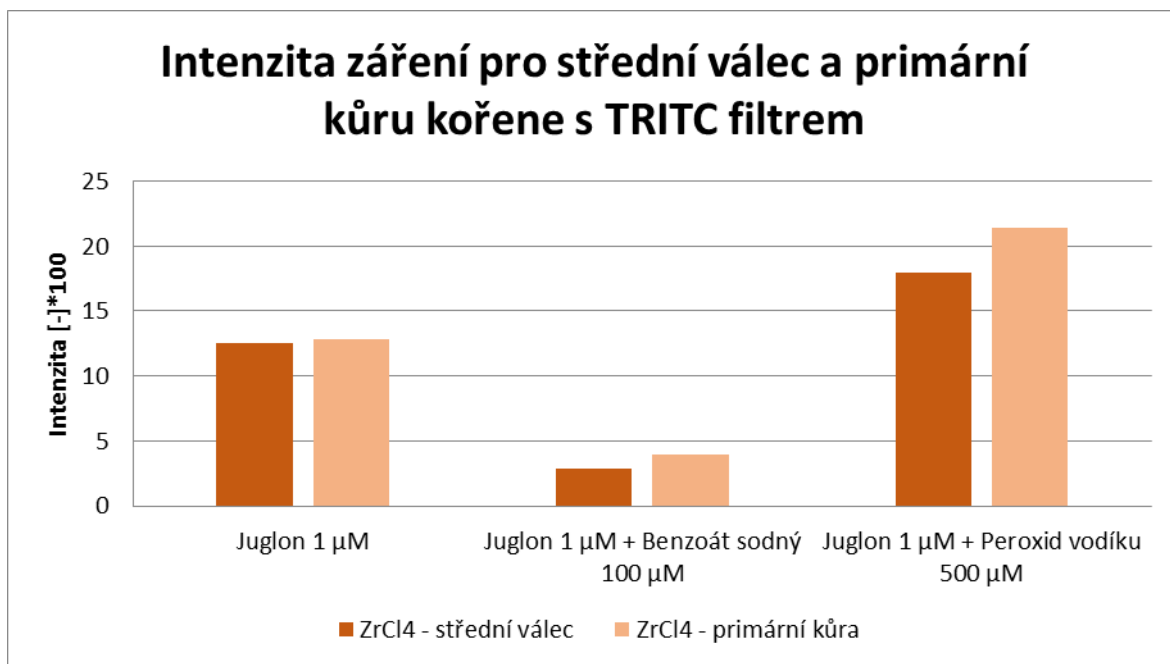
Graf č. 26: Intenzita záření primární kůry s TRITC filtrem.

Nejvyšší hodnoty intenzity záření byly naměřeny pro vzorky, v nichž fenolické sloučeniny reagovaly s reagentem NP. U všech vzorků pozorujeme zvýšenou syntézu fenolů v porovnání s kontrolou. Hodnoty intenzity pro vzorky ovlivněné 10  $\mu\text{M}$  juglonem jsou v porovnání se vzorky ovlivněnými 1  $\mu\text{M}$  juglonem poměrně nízké, což může být způsobeno sníženou antioxidační aktivitou těchto vzorků. Důvodem je již příliš vysoká koncentrace naftochinonu. Poté pro koncentraci juglonu 10  $\mu\text{M}$  s peroxidem vodíku o koncentraci 500  $\mu\text{M}$  však dojde k náhlému zvýšení intenzity a pozorujeme, jaký pozitivní vliv má na syntézu fenolů peroxid vodíku (graf 27).



Graf č. 27: Intenzita záření pro střední válec a primární kůru kořene s TRITC filtrem.

Na grafu 28 pozorujeme, jak ovlivnil benzoát sodný a peroxid vodíku syntézu fenolů ve středním válci a primární kůře kořene. Zatímco benzoát sodný způsobil její snížení a tím pádem také sníženou antioxidační aktivitu vzorků, díky peroxidu vodíku došlo k nárůstu intenzity neboli syntézy fenolických látek. Můžeme tedy tvrdit, že díky peroxidu vodíku mají buňky zvýšenou antioxidační aktivitu a tedy se lépe vypořádávají s účinky naftochinonu.



Graf č. 28: Intenzita záření pro střední válec a primární kůru kořene s TRITC filtrem.

## 15. Závěr

Cílem mé diplomové práce bylo prostudovat problematiku fytotoxicity vybraných naftochinonů na vybraném rostlinném modelu, se zaměřením na alelopatické působení těchto látek. Na zvoleném rostlinném modelu *Zea mays* L. – kukuřici seté, byla provedena spektrofotometrická a mikroskopická analýza.

Rostlinné vzorky byly ovlivněny naftochinonem juglon o koncentracích 1 a 10  $\mu\text{M}$ , přičemž navíc bylo ke každé z těchto koncentrací přidáno 100  $\mu\text{M}$  benzoátu sodného nebo 500  $\mu\text{M}$  peroxidu sodíku. S využitím spektrofotometrického měření byl stanovován vliv těchto látek na růstové faktory rostliny, změny v syntéze sekundárních metabolitů a celkové životaschopnosti rostlinných vzorků.

U všech zkoumaných růstových faktorů (délka rostlinných částí, obsah vody, hmotnost vzorku, poměr chlorofylu, obsah karotenoidů a prolinu) byl prokázán negativní vliv působících látek a to s jejich přibývajícimi koncentracemi. Délka kořene a 2. plně vyvinutého listu, obsah vody v kořeni a nadzemní části rostliny a také jejich svěží hmotnosti se měnily v závislosti na působících látkách prakticky stejně. Zatímco benzoát sodný, měl vždy poněkud tlumící účinky na negativní působení naftochinonu, peroxid vodíku jeho dopad naopak prohluboval. Vliv na poměr chlorofylů *a* a *b*, který se pohybuje za normálních podmínek kolem 3, měly působící látky až s vyšší koncentrací juglonu, kdy se jejich poměr snížil k hranici 2. Životaschopnost buněk v rostlinných vzorcích byla testována pomocí MTT a TTC testu. Obě tyto metody prokázaly, že se vzrůstající koncentrací naftochinonu klesá aktivita oxidoreduktáz-dehydrogenáz, což je důkazem snižující se životaschopnosti buněk ve vzorcích.

Pomocí spektrofotometrické analýzy byla měřena také změna v syntéze fenolických látek. U vzorků s 1  $\mu\text{M}$  koncentrací juglonu sice došlo k mírnému navýšení syntézy fenolů, nejednalo se však o významné navýšení. Jakmile se koncentrace naftochinonu dostala na 10  $\mu\text{M}$ , syntéza fenolických sloučenin téměř u všech vzorků rapidně narostla. Nejmarkantnější zvýšení syntézy je u vzorků ovlivněných juglonem společně s peroxidem vodíku. Jelikož fenolické sloučeniny vykazují vysokou antioxidační aktivitu, jejich zvýšená produkce je důkazem snahy rostliny bojovat s nepříznivými podmínkami a účinky působících látek.

Ze spektrofotometrické analýzy růstových faktorů, životaschopnosti buněk a změny v syntéze fenolů vyplývá, že naftochinony mají jednoznačně negativní dopad na rostlinné vzorky, kdy při kombinaci juglonu s peroxidem vodíku dochází dokonce k jeho prohloubení. Tento fakt je potvrzen rapidním snížením zkoumaných hodnot u růstových faktorů a zvýšenou syntézou fenolických látek.

Změna v syntéze fenolických látek byla provedena také na základě mikroskopických obrazů kořene kukuřice seté, pořízených s využitím fluorescenční mikroskopie. Na základě zkoumání intenzit záření jednotlivých snímků, které představovaly měřené vzorky, byla

s pomocí mikroskopické analýzy potvrzena předešlá spektrofotometrická měření. Jelikož se míra intenzity záření zvyšovala pro vzorky ovlivněné působícími látkami, můžeme tvrdit, že u těchto vzorků docházelo ke zvýšené syntéze fenolů. Záleželo také na vlivu benzoátu sodného a peroxidu vodíku. Nejviditelnější je jejich rozdílný účinek při využití filtru TRITC, kdy benzoát sodný tlumí negativní dopad naftochinonu a proto je syntéza fenolů nízká, naopak peroxid vodíku jeho účinky umocňuje a současně s tím také syntézu fenolických sloučenin.

# Přílohy A

## Seznam zkratek

DNA – Deoxiribonukleová kyselina

RNA – Ribonukleová kyselina

ROS – Reactive oxygen species

$O_2\cdot^-$  - Superoxidový anionový radikál

$\cdot OH$  - Hydroxylový radikál

FDA – Fluorescein diacetát

PI – Propidium jodid

JC-1 – Fluorescenční barvivo

YO-PRO®-1 – Kyanidové barvivo

DCF – DA - 2,7-Dichlorofluorescein diacetát

DAF - 2DA - 4,5-Diaminofluorescein diacetát

$H_2O_2$  – Peroxid vodíku

NO – Oxid dusnatý

HPLC – High performance liquid chromatography (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

MTT - 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylyl tetrazolium bromid

TTC - 2,3,5-trifenylyl tetrazolium chlorid

UV – ultrafialové spektrum

VIS – viditelné spektrum

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid

FITC – tetramethylrhodamin isokyanát

TRITC – fluorescein isokyanát

$NH_4OH$  – hydroxid amonný

$ZrCl_4$  – chlorid zirkoničitý

# Příloha B

## Obsah CD:

- text diplomové práce
- program vytvořený v programovém prostředí MATLAB pro výpočet jasových hodnot výsečí v mikroskopických obrazech
- zpracovávané mikroskopické obrazy kořene

## 16. Seznam literatury

- [1] WWW stránky: Dostupné z: <http://www.herbarium.usu.edu/treatments/Zea.htm>, [cit. 2013-05-11].
- [2] WWW stránky: Dostupné z: <http://www.kew.org/data/grasses-db/www/imp10873.htm>, [cit. 2013-05-11].
- [3] Babula, P.; Mikelová, R.; Potěšil, D.; Kizek, R.; Havel, L.; Sladký, Z.; *Napthoquinones – appearance in nature, biological properties*. Dostupné z: <http://mnet.mendelu.cz/mendelnet2004/obsahy/biorost/babula.pdf>, [cit. 2012-11-14].
- [4] Wagner, H.; Pharmaceutische Biologie. Drogen und ihre Inhaltsstoffe. HJP Wissenschaftl. Versandbuchhandlung, 1993, ISBN: 343-720-341-X.
- [5] Medentsev, A. G.; Akimenko, V. M.; *Phytochemistry*. 1998, ISBN 3-517-28850-3.
- [6] Tomko, J. et al.; *Farmakognózia*. 1999, Osveta, ISBN 80-217-0083-1.
- [7] Babula, P.; Vojtěch, A.; Kizek, R.; Sladký, Z.; Havel, L.; *Napthoquinones as allelochemical triggers of programmed cell death*. 2009, ISBN 0098-8472.
- [8] Dalcorso, G.; Farinati, S.; Maistri, S.; Furini, A., *How plants cope with cadmium: Staking all on metabolism and gene expression*. Journal of Integrative Plant Biology, 2008, s. 1268-1280.
- [9] Gloser, J.; Havel, L.; Kerkule, J.; Macháčková, I.; Nátr, L.; Prášil, I.; Procházka, S.; Sladký, Z.; Šantrůček, J.; Šebánek, J.; Tesařová, M.; Vyskot, B.; *Fyziologie rostlin*. 1998, Academia, Praha, 484 s., ISBN 80-200-0586-2.
- [10] Procházka, S.; Macháčková, I.; Kerkule, J.; Šebánek, J.; *Fyziologie rostlin*. 2003, Academia, Praha, 261 s., ISBN 80-246-0563-5.
- [11] Tlustoš, P.; Pavlíkov, D.; Balík, J.; *Mechanismus příjmu rizikových prvků rostlinami a jejich hromadění v biomase*. Dostupné z: [http://www.phytopsanitary.org/projekty/2005/VVF\\_05\\_2005.pdf](http://www.phytopsanitary.org/projekty/2005/VVF_05_2005.pdf), [cit. 2012-10-05].
- [12] Diopan, V.; Shestivska, V.; Zitka, O.; Galliova, M.; Adam, V.; Kaiser, J.; Horna, A.; Novotny, K.; Liska, M.; Havel, L.; Zehnalek, J.; Kizek, R.; *Determination of Plant Thiols by Liquid Chromatography Coupled with Coulometric and Amperometric Detection in Lettuce Treated by Lead(II) Ions. Electroanalysis*. 2010, s. 1248-1259., ISBN: 978-80-7395-282- 2.
- [13] WWW stránky: *Fluorescenční mikroskopie*. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/fluorescenci.htm>, [cit. 2013-03-30].

- [14] Černý, J.: *Fluorescenční mikroskopie*. Přírodovědecká fakulta UK v Praze, 2011. Dostupné z: <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/Biolog/3cerny.pdf>, [cit. 2013-03-30].
- [15] WWW stránky: Dostupné z: <http://flowcyt.salk.edu/fluo.html>, [cit. 2013-03-30].
- [16] Černý, J.: *Fluorescenční mikroskopie*. Přírodovědecká fakulta UK v Praze, 2011. Dostupné z: <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/Biolog/3cerny.pdf>, [cit. 2013-03-30].
- [17] Kolářová, J.: *Chromatografie*. Přednášky předmětu FLAB magisterského studia BTBIO-F, FEKT, VUT Brno.
- [18] Táborská, E.: *Chromatografické metody*. Studijní materiál předmětu ABCH bakalářského studi BTBIO-A, FEKT, VUT Brno.
- [19] Kolářová, J.: *Kapalinová chromatografie*. Přednášky předmětu FLAB magisterského studia BTBIO-F, FEKT, VUT Brno.
- [20] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. 2003, ISBN 80-86369-07-2.
- [21] Nooden, D. L.: *Plant cell death processes*. 2004, Academic Press, ISBN 978-0-12-520915-1.
- [22] Kováčik, J.: *Stresová fyziologie rostlin*. 2012, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, ISBN 978-80-7097-941-9.
- [23] Kováčik, J.; Klejdus, B.; Hedbavny, J.; Štork, F.; Grúz, J.: *Modulation of Copper Uptake and Toxicity by Abiotic Stresses in Matricaria chamomilla Plants*. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf3013426>, [cit. 2012-11-02].
- [24] WWW stránky: *Sigma – Aldrich*. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com>, [cit. 2012-10-22].
- [25] WWW stránky: Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/content/329/5997/1318.abstract>, [cit. 2013-04-27].
- [26] WWW stránky: Dostupné z: [http://hplc1.sweb.cz/Carotenoids/ch\\_karotenoids.htm](http://hplc1.sweb.cz/Carotenoids/ch_karotenoids.htm), [cit. 2013-04-27].
- [27] WWW stránky: Dostupné z: <http://flowcyt.salk.edu/fluo.html>, [cit. 2013-03-30].
- [28] WWW stránky: Dostupné z: <http://lem.ocol.cz/cs/info/mtt-test>, [cit. 2013-04-27].
- [29] WWW stránky: Dostupné z: <http://www.irz.cz/node/37>, [cit. 2013-05-16].
- [30] Buer, Ch.; Muday, G. K.: *The transparent testa4 mutation prevents flavonoid synthesis and alter auxin transport and the response of Arabidopsis roots to gravity and light*. - *Plant Cell*. 2004, s. 1191 – 1205.

- [31] WWW stránky: Dostupné z: <http://www.reflexnutrition.cz/zpravy?nid=60>, [cit. 2013-05-16].
- [32] WWW stránky: Dostupné z: <http://www.madsci.org/FAQs/anthocyanins.html>, [cit. 2013-05-16].
- [33] Klouda, P.; *Moderní analytické metody*. 2003, ISBN 80-86369-07-2.
- [34] Hajlaoui, H.; Denden, M.; El Ayeb, N.; *Differential responses of two maize (Zea mays L.) varieties to salt stress: Changes on polyphenols composition of foliage and oxidative damages*. 2009, s. 144 – 151.