

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ  
UNIVERZITY**  
České Budějovice

Katedra fyziologie

**Vliv oxidativního stresu na antioxidační  
enzymy u *Drosophila melanogaster***

**Bakalářská práce**

**Klára Szakosová**

Vedoucí práce: **Mgr. Radmila Čapková Frydrychová, Ph.D.**

Rok vypracování: **2013**

Szakosová K., 2013: Vliv oxidativního stresu na antioxidační enzymy u *Drosophila melanogaster*. [Effect of oxidative stress on antioxidant enzymes in *Drosophila melanogaster*. Bc.Thesis, in Czech] – 45 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation**

Oxidative stress reflects an imbalance between reactive oxygen species and antioxidant defense, which can result in cellular damage. The reactive radicals can interact with cell components, including proteins, lipids and nucleic acid. Antioxidant enzymes are the main defense against oxidative stress, representing by two the most important enzymes, catalase and superoxide dismutase. In this thesis I studied the effect of oxidative stress on activity of antioxidant enzymes in *Drosophila melanogaster* and *Locusta migratoria*, after exposure to the herbicide paraquat.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 26. dubna 2013

.....

Klára Szakosová

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování své školitelce Radmile Čapkové Frydrychové, za pomoc a odborné vedení při vypracování bakalářské práce. Rovněž bych chtěla poděkovat všem členům laborky a Františku Marecovi za jejich vstřícnost a pomoc. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a příteli, za podporu během celého mého studia.

## Obsah:

1	Úvod.....	3
1.1	Oxidativní stres .....	3
1.2	Reaktivní kyslíkové radikály.....	4
1.3	Reaktivní dusíkaté radikály .....	6
1.4	Oxidativní poškození a jeho role ve vztahu k onemocnění.....	6
1.5	Antioxidační enzymy .....	7
1.5.1	Superoxiddismutáza .....	8
1.5.2	Kataláza.....	10
1.6	Parakvat.....	11
2	Cíle práce .....	13
3	Materiál a metody.....	14
3.1	Pokusné organismy .....	14
3.2	Indukce oxidativního stresu .....	14
3.3	Příprava vzorků .....	14
3.4	Izolace celkové RNA .....	15
3.5	Syntéza cDNA SMARTScribe TM reverzní transkriptázou .....	15
3.6	Real-time PCR .....	15
3.7	Vyhodnocení enzymatické aktivity katalázy.....	16
3.8	Vyhodnocení enzymatické aktivity superoxiddismutázy (SOD) .....	17
3.9	Vyhodnocení vodných hydroperoxidů.....	18
3.10	Měření celkových proteinů.....	18
3.11	Statistická analýza .....	19
4	Výsledky .....	20
4.1	<i>D. melanogaster</i> .....	20
4.1.1	Vyhodnocení enzymatické aktivity SOD .....	20
4.1.2	Vyhodnocení enzymatické aktivity SOD mezi pohlavími .....	21
4.1.3	Vyhodnocení enzymatické aktivity katalázy.....	22
4.1.4	Vyhodnocení enzymatické aktivity katalázy mezi pohlavími.....	23
4.1.5	Vyhodnocení transkripční aktivity superoxiddismutázy a katalázy mezi pohlavími ..	25
4.1.6	Vyhodnocení vlivu pohlaví na mortalitu.....	27
4.1.7	Vyhodnocení přítomnosti vodných hydroperoxidů po působení parakvatu.....	30
4.2	<i>L. migratoria</i> .....	30
4.2.1	Vyhodnocení antioxidační aktivity .....	30

4.3	Statistické vypracování výsledků .....	33
5	Diskuse .....	35
6	Závěr a perspektiva výzkumu .....	38
7	Použitá literatura .....	39
8	Přílohy .....	45

# 1 Úvod

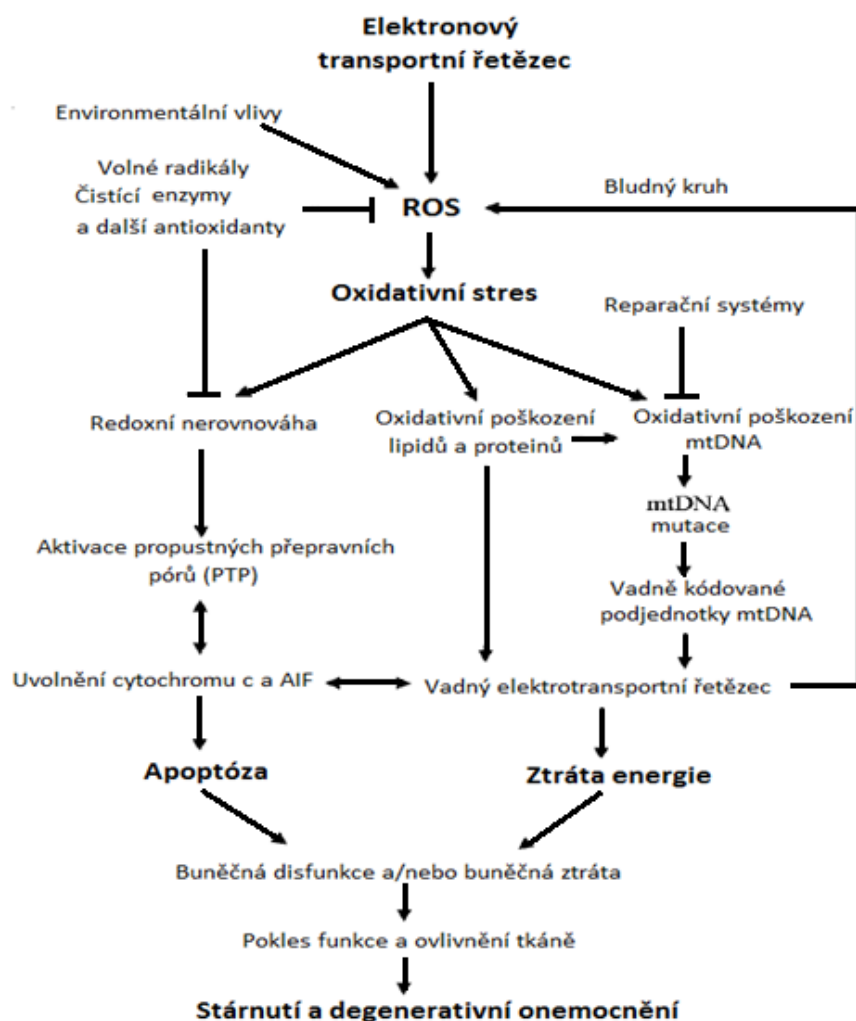
## 1.1 Oxidativní stres

Problematicke vlivu oxidativního stresu a antioxidačních enzymů je v posledních letech věnována značná pozornost. Za normálních podmínek existuje rovnováha mezi tvorbou volných radikálů a jejich následným odstraněním pomocí antioxidačních mechanismů. Pokud však dojde k narušení této rovnováhy, dochází ke vzniku oxidativního stresu. Toto pojetí „oxidativního stresu“ jako buněčné nerovnováhy zformuloval Helmut Sies (1997). Oxidativní stres může vést k fyziologickým změnám organismu, zahrnujícím změny buněčných funkcí, až signál pro apoptózu.

Mezi buněčné oxidanty, vedoucí ke vzniku oxidativního stresu, řadíme reaktivní formy kyslíku (ROS reactive oxygen species) a dusíku (RNS reactive nitrogen species) (Miwa et al., 2008; Drew a Leeuwenburgh, 2002).

Jako volné radikály označujeme látky, jejichž základním rysem je přítomnost alespoň jednoho nepárového elektronu ve valenční vrstvě (Jones, 2008). Radikály mohou vzniknout přijmutím, či ztrátou jednoho nebo více elektronů, nebo štěpením vazeb molekul. Snahou těchto radikálů je doplnit chybějící elektron, a proto ochotně reagují s okolními molekulami. Oxidanty jsou tvořeny, jako běžné produkty aerobního mechanismu (Sies, 1997) a jejich škodlivost záleží na množství, ve kterém jsou produkovány. Oxidanty se například účastní řady transdukčních buněčných signálů (Hensley a Floyd, 2002). Jako důkaz fyziologické role ROS můžeme uvést peroxid vodíku, který plní funkci signální molekuly při fosforylaci PDGF receptorů v buňkách svalů (Sundaresan et al., 1995). Dále můžeme nalézt jeho zvýšenou hladinu v leukocytech při bakteriální infekci, stejně jako superoxidu nebo hydroxylového radikálu.

Díky svému vysoce reaktivnímu potenciálu mohou ROS ochotně oxidovat tuky, bílkoviny nebo nukleové kyseliny (Miwa et al., 2008), pokud jsou v jejich bezprostřední blízkosti. Tato vlastnost může mít vliv na normální průběh metabolismu a vést ke změně buněčné funkce, narušení růstu a vyvrcholit smrtí buňky.



Obr. 1: Tvorba a mechanismus působení oxidativního stresu.

## 1.2 Reaktivní kyslíkové radikály

Reaktivní formy kyslíku vznikají redukcí molekulárního kyslíku. Řadíme k nim volné radikály, jako je superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ) hydroxylový radikál ( $HO^{\cdot}$ ), peroxy ( $ROO^{\cdot}$ ), alkoxy ( $RO^{\cdot}$ ) či hydroperoxy ( $HO_2^{\cdot}$ ), ale také látky jako peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ), ozón ( $O_3$ ) nebo singletový kyslík ( $^1O_2$ ), které volnými radikály nejsou (Berlett a Stadtman, 1997). Reaktivní formy kyslíku můžeme rozdělit na endogenní a exogenní. Endogenní ROS pocházejí především z mitochondriálního dopravního řetězce (ETC) při neúplné redukcí kyslíku (Wei a Lee, 2002; Miwa et al., 2008). Na vzniku ROS v mitochondriích se podílí zejména komplex I (NADH – ubichinonreduktáza) a komplex III (ubichinol: cytochrom c- reduktáza) (Miwa a Brand, 2005; Muller et al., 2004). Mitochondrie však nejsou jediné organely vytvářející ROS. Peroxizóm je další organelou, která při procesu beta oxidace vytváří peroxid vodíku (Reddy et al., 1986). K exogenním faktorům vyvolávajícím vznik ROS

řadíme chemické a toxické látky, herbicidy, pesticidy, těžké kovy, léky nebo ionizační či UV záření.

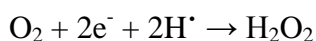
### **Superoxid ( $O_2^{\bullet -}$ )**

Superoxid je primární kyslíkový radikál, který je schopen interagovat s jinými molekulami a tvořit sekundární ROS. Hlavním endogenním zdrojem tohoto radikálu je mitochondriální ETC a endoplasmatické retikulum a v neposlední řadě k jeho vzniku přispívají i fagocytující buňky jako neutrofilů, makrofágy a lymfocyty (Liu et al., 2002; Johnston et al., 1975). Ke vzniku tohoto radikálu dochází reakcí  $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$ , a to přeměnou kyslíku ionizujícím zářením či ultrazvukem, enzymatickými reakcemi nebo autooxidací organických látek (Marounek, 2006). Může projít skrze biomembrány, ale pouze anionovým kanálem (Ikebuchi et al., 1991). Ve vodném prostředí je superoxidový radikál hydratován a vzniká hydroperoxylový radikál ( $HOO^{\bullet}$ ). Působením superoxidodismutázy (SOD) je přeměněn na peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) reakcí  $O_2^{\bullet -} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ .

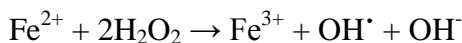
### **Peroxid vodíku ( $H_2O_2$ )**

Dalším ROS je peroxid vodíku, který je oproti ostatním méně reaktivní. Jeho důležitost však spočívá v několika zásadních vlastnostech, mezi které patří stabilita, ovlivnění vzniku dalších kyslíkových radikálů, či jeho schopnost volně procházet skrze biologické membrány (Storey, 2004). Peroxid vodíku také podmiňuje vznik velkého množství hydroxylového radikálu, který je vytvořen jeho rozkladem za přítomnosti iontů kovů ( $Fe^{2+}$  či  $Cu^+$ ) ve Fentonově reakci (Fenton, 1894). Peroxid vodíku je degradován antioxidačním enzymem katalázou na molekulární kyslík a vodu nebo askorbát peroxidázou na kyselinu dehydroaskorbovou a dvě molekuly vody.

Reakce vzniku peroxidu vodíku:



Fentonova reakce peroxidu vodíku s mědí/železem:



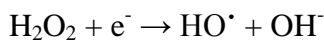
### **Hydroxylový radikál ( $OH^{\bullet}$ )**

Velmi silným ROS je hydroxylový radikál, který ochotně reaguje se všemi molekulami ve své blízkosti, a proto je považován za nejnebezpečnější formu ROS. Snadno například hydroxyluje purinové a pyrimidinové báze nukleových kyselin, čímž způsobuje jejich poškození a mutace (Marounek, 2006). Vznik hydroxylového radikálu může být zapříčiněn

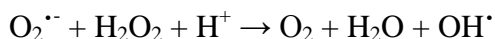


Fentonovou reakcí peroxidu vodíku (Lloyd et al., 1997), ionizujícím zářením nebo reakcí superoxidového radikálu s peroxidem vodíku (Marounek, 2006).

Rozpad peroxidu vodíku:



Reakce superoxidového radikálu s peroxidem vodíku:



### 1.3 Reaktivní dusíkaté radikály

Dalším typem buněčných oxidantů jsou reaktivní druhy dusíku (RNS) odvozené od oxidu dusného (Drew a Leeuwenburgh, 2002). Mezi RNS patří radikály oxid dusnatý (NO) a oxid dusičitý (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>) a neradikálové látky nitrosyl (NO<sup>+</sup>), nitroxid (NO), peroxyinitrit (ONOO) či alkylperoxyinitrit (ROONO). Úkolem oxidu dusnatého v buňce je jeho signalizační funkce (Alderton et al., 2001).

### 1.4 Oxidativní poškození a jeho role ve vztahu k onemocnění

Volné radikály, bez ohledu na původ, mohou interagovat s buněčnými biomolekulami, jako jsou lipidy, proteiny, nukleové kyseliny či glycidy. Oxidační poškození vedou k postupné akumulaci modifikovaných makromolekul a zapříčiňují tak postupnou ztrátu buněčných funkcí, urychlení procesu stárnutí a vrcholí buněčnou smrtí (Bandyopadhyay et al., 1999; Tower, 1996).

DNA a RNA patří mezi biomolekuly, jejichž struktura a funkce může být pozměněna útokem volných radikálů. Poškození DNA může způsobit mutace, poruchy replikace a transkripce a tyto změny vedou ke genomické nestabilitě buňky (Miwa et al., 2008). Oxidací purinových a pyrimidinových bází vznikají jejich modifikace. Tyto báze nejsou často přítomny za normálního metabolismu (Fisher-Wellman a Bloomer, 2009), a proto je můžeme označit za marker oxidačního stresu. Typickým příkladem je 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) (Fisher-Wellman a Bloomer, 2009).

Díky své hojnosti v biologických systémech patří bílkoviny mezi nejčastější cíle volných radikálů. K poškození proteinů dochází buď přímou interakcí s radikály, nebo nepřímo interakcí s vedlejším produktem, vytvořeným radikálem (Dalle-Donne et al., 2006). Většina poškození je nevratná, což má za následek ztrátu funkce a bílkoviny musí být degradovány.

Poškození lipidů volnými radikály probíhá při procesu lipoperoxidace, za vzniku hydroperoxidů či aldehydů. Lipoperoxidace postihuje zejména polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) a fosfolipidy buněčných membrán, u kterých dochází ke změně jejich propustnosti. Poškození lipidů většinou vede k jejich špatné funkci či narušení membrán a dochází tak k narušení homeostázy a k lýze buňky (Klaunig et al., 1998).

V neposlední řadě vyvolávají ROS oxidativní poškození, jejichž následkem je zkracování telomer (Chen et al., 1998; von Zglinicki, 2000) nebo buněčné a organismální stárnutí (Harman, 1956). Během života dochází k akumulaci buněčných poškození a klesá schopnost antioxidační obrany a opravných mechanismů (Holeček a Rokyta, 2005).

Zjištění role ROS v patologii má velký význam zejména v medicíně, při zjišťování významu radikálů u závažných onemocnění, a také jejich vliv na fyziologii stárnutí. Oxidativní stres může přispívat k řadě onemocnění jako je Alzheimerova choroba, Downův syndrom, Parkinsonova nemoc či kardiovaskulární choroby (Markesbery, 1997; Ovanovic et al., 1998; Jenner, 2003; Vijaya Kumar et al., 2010).

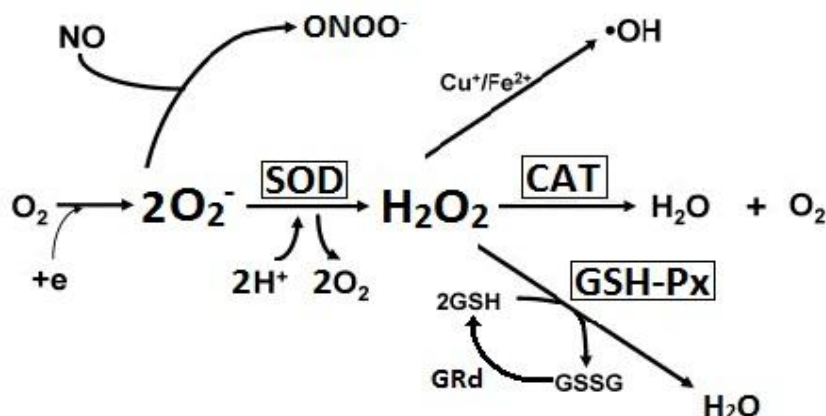
## **1.5 Antioxidační enzymy**

Schopnost využívat kyslík, kterou v průběhu evoluce organismy získaly, představovala energetickou výhodu. Ale tato přednost aerobních organismů si také žádala vytvořit speciální ochranné antioxidační mechanismy, chránící před toxicitou kyslíku a jeho radikálů. Dokonce některé anaerobní bakterie, které nejsou obvykle vystaveny kyslíku, mají vyvinuté obranné mechanismy (Storey, 2004). Antioxidant je podle Halliwella a Gutteridge „jakákoliv látka, která v nízkých koncentracích ve srovnání s účinností oxidovatelného substrátu výrazně zbrzdí či inhibuje oxidaci tohoto substrátu“ (1989). Poločasy hlavních reaktivních forem kyslíku jsou naprosto odlišné, a proto nastává nutnost různých typů obranných mechanismů (Sies, 1997). Podle způsobu účinku rozdělujeme antioxidanty na enzymatické a neenzymatické povahy (Marounek, 2006). Mezi trojici enzymatických antioxidantů řadíme superoxidismutázu (SOD), katalázu (CAT) a glutationperoxidázu (GPx) (Suman et al., 2009). Do skupiny neenzymatických látek patří (vitamin E, C, karoteny, flavonoidy, kyselina močová, kyselina fytová, glutathion, kyselina ferulová) a také prvky jako je selen, zinek či měď (Marounek, 2006). Antioxidanty neenzymatické povahy musí být přijímány v potravě (Storey, 2004). Důležitá je také rovnováha mezi jednotlivými enzymy, likvidující volné radikály v boji proti oxidačnímu stresu (Wei a Lee, 2002). Dalším důkazem důležitosti

antioxidačních systémů je jejich vysoká konzervovanost v rámci celé fylogeneze (Storey, 2004).

Antioxidační systém můžeme dále rozdělit do čtyř podoblastí (Storey, 2004):

1. primární antioxidační obrana enzymatického/neenzymatického charakteru, která je v přímém kontaktu s ROS
2. podpůrná obrana, která napomáhá funkci primárního antioxidačního systému (recyklace/syntéza substrátů a antioxidačních enzymů)
3. kov-komplexotvorné proteiny/enzymy (ferritin, transferin, ceruloplasmin, metallothionein) a nízkomolekulární složky, které chrání nebo minimalizují účast železa a zinku při tvorbě radikálů
4. enzymatický opravný systém



**Obr. 2:** Antioxidanty enzymatické povahy - superoxidismutáza (SOD), kataláza (CAT) a glutationperoxidáza (GPx).

### 1.5.1 Superoxidismutáza

Superoxidismutáza je jedním z klíčových enzymů metabolismu kyslíku, jejíž vývoj souvisel s vývojem organismů a organel, které ji syntetizují (Miller, 2012). Funkcí superoxidismutázy je obrana proti kyslíkovým radikálům (Fridovich, 1997), čímž zabraňuje vytvoření ještě nebezpečnějších forem ROS, například hydroxylového radikálu. Superoxidismutáza byla objevena již před 70 lety Mannem a Keilinem (1938), ale k popsání její skutečné funkce došlo až v roce 1968 McCordem a Fridovichem a teprve tento objev pomohl porozumět oxidativním procesům (1988). SOD se vyskytuje u aerobních organismů od mikrobů až po člověka. Je to enzym, z jehož názvu je zřejmé, že u něj dochází k reakci dismutaci. SOD katalyzuje dvě molekuly superoxidu na kyslík a peroxid vodíku za spotřeby dvou iontů vodíku:  $2O_2^{\cdot-} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + 2O_2$  a urychluje tím dismutaci superoxidu o čtyři řády (Racek a Holeček, 1999).

SOD přemístí elektron z jednoho superoxidu na druhý, a tak z prvního superoxidu vzniká normální kyslík. K druhému peroxidu jsou přidány dva vodíkové ionty a vzniká peroxidu vodíku. Pokud se zvýší hladina  $H_2O_2$ , může peroxid vodíku inhibovat SOD (Blum a Fridovich, 1985). Vzniklý peroxid vodíku je poté odstraněn pomocí enzymu katalázy či peroxidázami.

Superoxiddismutáza představuje rodinu metaloenzymů, které se liší obsahem iontu kovu (katalytický účinek) a bílkovinnou strukturou. A právě podle různých druhů kofaktorů je můžeme rozdělit do tří skupin na Fe a Mn SOD, Cu/Zn SOD a Ni SOD (McCord a Fridovich, 1988).

U savců byla nejvyšší aktivita SOD prokázána v játrech a dále v ledvinách, mozku, nadledvinách a srdci (Halliwell a Gutteridge, 1989).

### **Mn a Fe SOD**

Do první skupiny superoxiddismutáz patří  $Fe^{2+}$  SOD a  $Mn^{2+}$  SOD, které vykazují podobnou strukturu, vyskytují se u všech prokaryot a jejich podjednotky mají molekulovou hmotnost 23 kDa (Racek a Holeček, 1998). Dimer Fe SOD, který byl stejně jako Mn SOD poprvé objeven v buněčné matrix bakterie *E. coli*. S vývojem oxidace prostředí klesla výhodnost Fe SOD, a proto se dnes tato forma SOD vyskytuje pouze u primitivních organismů a v chloroplastech, zatímco u hub, rostlin či živočichů se nevyskytuje (Miller, 2012). Naopak převážil vývoj Mn SOD, což je velký, dimerický či tetramerický enzym (Racek a Holeček, 1998), který se nachází v mitochondriální matrix blízko ETC a hraje klíčovou roli v jeho ochraně. Další funkcí Mn SOD je regulace intramitochondriálního superoxidu. MnSOD je široce rozšířený enzym, který můžeme nalézt u bakterií, kvasinek, rostlin a živočichů.

### **Cu/Zn SOD**

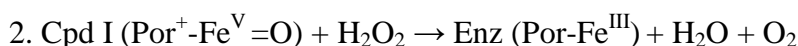
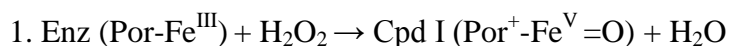
Cu/Zn SOD je dimer o hmotnosti 320 kDa, který se primárně nachází v cytoplasmě a lysozomech (Crapo et al., 1992; Keller et al., 1991) a jeho malá část se nachází v prostoru vnitřní membrány mitochondrie. Cu/Zn SOD můžeme nalézt v eukaryotických buňkách kvasinek, rostlin a živočichů, a také v omezené míře u prokaryot jako jsou bakterie a řasy. Ačkoliv je pro vznik Cu/Zn SOD důležitá přítomnost iontu mědi i zinku, pouze měď plní aktivní roli při dismutaci. Iont zinku ( $Zn^{2+}$ ) přispívá ke stabilizaci enzymu. Existuje několik izoform Cu/Zn SOD. Savci například obsahují také extracelulární Ec SOD, která patří do rodiny Cu/Zn SOD.

## Ni SOD

Superoxiddismutáza, která obsahuje ve svém aktivním místě iont niklu, byla objevena teprve nedávno (Youn et al., 1996). Tato Ni SOD je homohexamer, jež se nachází u některých gram-pozitivních bakterií a její mechanismus je stejný jako u Mn SOD či Cu/Zn SOD.

### 1.5.2 Kataláza

Enzym kataláza (peroxid vodíku oxidoreduktáza, hyperoxoperoxidáza) je jedním z klíčových enzymů buněčného systému antioxidační obrany, jehož aktivita byla zjištěna již v roce 1811 L. J. Thénardem během objevu  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Mueller et al., 2009), ale pojmenována byla až v roce 1900 (Loew, 1900). Kataláza je tetramerní homoprotein, jehož celková molekulární hmotnost je 240 kDa (Racek a Holeček, 1998) a je tvořený ze čtyř podjednotek (každá 60 kDa) se čtyřmi hemovými (nebo manganovými) skupinami (Kirkman a Gaetani, 1984). Hlavní funkcí tohoto enzymu je katalytické heterolytické štěpení dvou molekul peroxidu vodíku za vzniku kyslíku a vody ( $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ). Reakce je rozdělena do dvou etap. V první fázi dojde k oxidaci hemu peroxidem vodíku jako substrátu pro vznik sloučeniny I (oxoferyl) a vody. V druhé fázi je vzniklá sloučenina I redukována peroxidem vodíku (elektronový donor) do výchozího stavu za vzniku kyslíku a vody.



Kataláza patří mezi enzymy s největší rychlostí přeměny substrátu, avšak její aktivita je zahájena až při koncentracích  $\text{H}_2\text{O}_2$  vyšších než  $10^{-6}$  M (Cohen a Hochstein, 1963). Katalázu můžeme nalézt u téměř všech živých organismů. Kataláza také slouží v buňkách jako přirozený marker subcelulárních organel peroxizómů, ve kterých při oxidaci mastných kyselin vzniká velké množství peroxidu vodíku (Zámocký, 1998). Kataláza je také zvláštní v tom, že je schopna nejen redukce, ale i oxidace peroxidu vodíku, čímž se podstatně liší od peroxidáz, které mohou pouze redukovat  $\text{H}_2\text{O}_2$  za současné oxidace sekundárního substrátu (Zámocký, 1998). Katalázy můžeme rozdělit do tří skupin na základě reakčních schopností a evolučních vztahů (Zámocký, 1998).

### Monofunkční katalázy

Do první kategorie patří monofunkční katalázy (dříve také typické katalázy), které se řadí mezi nejvíce rozšířené katalázy obsahující hem a disponují vysokou katalytickou aktivitou. Patří mezi tetramerické molekuly s jedním protohemem v každé podjednotce

(Zámocký, 1998). Tyto katalázy jsou odolné vůči degradaci a proteolýze, což vyplývá ze studií katalázy u *E. coli* a dalších střevních bakterií (Goldberg a Hochman, 1989).

Monofunkční katalázy můžeme rozdělit do tří kladů (Sykes, 2001), které se od sebe oddělily duplikací genu a ztrátou části sekvence (Zámocký, 1998). Mezi katalázami je značný rozdíl ve vlastnostech a sekvencích, které jsou odpovědné za jejich reakční rychlost a afinitu k substrátu. Katalázy kladu III. obsahují kofaktor NADPH, který má za úkol zabránit vzniku neaktivní sloučeniny II a regeneraci katalázy.

### **Katalázy-peroxidázy**

Druhá, méně rozšířená třída, se skládá z bifunkčních, hem obsahujících kataláz-peroxidáz. Skupina je pojmenována podle své peroxidázové aktivity a má dimerickou/tetramerickou strukturu (Passardi et al., 2007). Tyto katalázy jsou navzdory rozdílné sekvenci a struktuře podobné monofunkčním katalázám, protože obsahují hem v aktivním centru (ten je umístěn hlouběji ve struktuře) a disponují vysokou katalázovou aktivitou (Peschek et al., 2011). Na rozdíl od předchozí skupiny katalázy-peroxidázy využívají organických donorů (dárců) elektronů, které redukují sloučeninu I přes dva jedno-elektronové transfery s nižší katalázovou a zvýšenou peroxidázovou aktivitou.

### **Katalázy obsahující mangan (katalázy neobsahující hem)**

Tyto katalázy byly zjištěny pouze u mikroorganismů. Můžeme je rozdělit na dvě skupiny, v jejichž katalytickém centru se nachází dimanganová skupina. Enzym se skládá z homohexamerů, přičemž každý monomer tvoří čtyři šroubovice a rozdíl mezi jednotlivými nehemovými katalázami je způsoben rozdílnými C-terminálními konci (Zámocký, 1998). V dimanganovém centru dochází ke sdílení atomů Mn s rezidenty. Rozdíly mezi jednotlivými katalázami této skupiny se liší ve výskytu glutamátu, který váže vodu. Reakce nonhematických kataláz se také rozděluje do dvou fází. V aktivním centru dochází k odstranění elektronu, ale nevzniká reaktivní meziprodukt, takže dojde v druhé reakci pouze k transferu elektronů na kyslík.

## **1.6 Parakvat**

I přes snahu omezit používání pesticidů a herbicidů v zemědělské výrobě, jsou tyto látky stále hojně využívány, a to především v rozvojových zemích. Na základě řady studií byly potvrzeny jejich toxické vlastnosti a schopnost vyvolat oxidativní stres. Parakvat-dichlorid  $C_9H_{13}N_5O$  (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridin-1,1'-dium-dichlorid), toxický neselektivní bipyridinový herbicid, patří právě mezi tyto chemické prostředky. Jedná se o

pevnou krystalickou látku bezbarvé, bílé nebo světle žluté barvy. Je hygroskopická a bez zápachu. V České republice a v celé EU je používání parakvatu od roku 2007 zakázáno. Podle klasifikace IPCS-WHO je parakvat řazen mezi látky středně toxické (Wesseling et al., 2005).

Parakvat se používá k hubení plevele, kdy je několik minut po ošetření rostlin rychle a kontaktně absorbován. Jeho vstřebání způsobí zničení rostlinné tkáně, narušení procesu fotosyntézy a dojde k protrhnutí buněčných membrán a úniku vody, což způsobí, že rostlina rychle vadne (Dinis-Olivera et al., 2006).

Parakvat generuje volné radikály při metabolických procesech a tím dochází ke zvýšení hladiny volných kyslíkových radikálů (ROS), způsobujících oxidativní stres (Arking et al., 1991), se všemi jeho následky. Změny v antioxidačních systémech mohou být použity jako biomarkery intoxikace parakvatem (Rey et al., 2007).

Pro člověka je parakvat nebezpečný hlavně při perorálním použití, ale i kontakt s poškozenou kůží či vdechnutí může vyvolat zdraví-ohrožující následky. Mnoho důkazů také naznačuje, že parakvat může urychlit nebo způsobit Parkinsonovu chorobu (McCormack et al., 2002). Nejnižší naměřená smrtelná dávka u dospělého člověka je 17 mg/kg (Wesseling et al., 2001).

## 2 Cíle práce

Práce je součástí širšího projektu, zaměřeného na studium vlivu oxidativního stresu na telomericou homeostázi u hmyzu a její hlavní náplní byla optimalizace působení parakvatu pro indukci oxidativního stresu a sledování odezvy na antioxidační úrovni u *D. melanogaster* a *L. migratoria*.

Konkrétní cíle zahrnovaly (1) optimalizaci protokolu pro přípravu testovaných vzorků, (2) stanovení optimální dávky parakvatu pro sledování antioxidační odezvy, (3) vyhodnocení transkripční a enzymatické aktivity katalázy a superoxiddismutázy při působení parakvatu, (4) sledování antioxidační odezvy v závislosti na pohlaví u *D. melanogaster*, (5) vyhodnocení hladiny peroxidů.



### 3 Materiál a metody

#### 3.1 Pokusné organismy

*Drosophila melanogaster*. K práci jsem používala divoký kmen Oregon R, jehož chov byl udržován při 25° C na běžném kukuřično-melasovém médiu (163 g kukuřičného šrotu, 33 g sušených kvasnic, 16 g agaru, 200 ml melasy, 2,6 l vody) spolu s desinfekčním roztokem (240 ml denaturovaného etylalkoholu, 12 g kyseliny benzoové, 2,5 g kyseliny sorbové).

*Saranče Locusta migratoria*. Sarančata byla pořízena od společnosti Acheta farm (Mšené Lázně) a dále chována v insektáriu při teplotě 30° C při 12-ti hodinové fotoperiodě. Sarančata byla krmena především zelím a senem, s přidavkem šrotu a další zeleniny či ovoce.

#### 3.2 Indukce oxidativního stresu

K vyvolání oxidativního stresu byl použit parakvat dichlorid (Sigma – Aldrich, katalogové číslo 36541). Pokusy na drozofile byly prováděny na adultních jedincích o stáří dva až sedm dnů od vylíhnutí. Parakvat byl připraven v roztoku 1% sacharózy. Pokusným jedincům byl roztok, o objemu 400 µl, aplikován na buničitou vatu, umístěnou na dně skleněné vialky. Vzorek negativní kontroly obsahoval roztok 1% sacharózy. Inkubace probíhala po dobu 12 – 14 hodin, během které byly vzorky chráněny před přímým světlem. Sarančatům byl parakvat aplikován pomocí mikroinjekční stříkačky (Hamilton syringe, Sigma), a to v 5-ti µl roztoku s vodou. Vpich byl umístěn do druhého zadečkového článku a byl veden podél tělní stěny. U jedinců negativní kontroly bylo injikováno 5 µl vody. Inkubace probíhala 16 - 18 hodin.

#### 3.3 Příprava vzorků

K přípravě jednotlivých vzorků drozofily bylo použito 20 jedinců. U sarančete byla vypitvana tkáň mozku adultní samice. Tkáň byla homogenizována umělohmotným tloučkem v 50 mM draselno-fosfátovém pufru o pH 7,8. Homogenizace byla prováděna na ledu. Po homogenizaci byly vzorky centrifugovány při 10 000 otáčkách/min, 10 min, při teplotě 4 °C. Po centrifugaci byl odebrán supernatant a opětovně centrifugován při 20 000 otáčkách/min, 10 min, při 4 °C. Odebraný supernatant byl před použitím uchováván na ledu a bezprostředně před použitím důkladně promíchán vortexem.

### 3.4 Izolace celkové RNA

K izolaci celkové RNA bylo u drozofily použito 20 dospělých jedinců a u sarančete tkáň mozku. Izolace RNA byla provedena pomocí kitu NucleoSpin RNA II (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, katalogové číslo 740955.50), a to dle postupu doporučeného výrobcem. Přesná koncentrace získané celkové RNA byla vyhodnocena spektrofotometricky.

### 3.5 Syntéza cDNA SMARTScribe TM reverzní transkriptázou

K syntéze cDNA byl použit kit Super Script III First-Strand (Invitrogen, katalogové číslo 18080-051). Reakce byla prováděna dle doporučení výrobce. Tzn., k provedení reakce o jejím celkovém objemu 10  $\mu$ l bylo použito 0,2 – 2  $\mu$ g celkové RNA, 0,5  $\mu$ l (50  $\mu$ M) oligo dT, 1  $\mu$ l DTP, 100 U reverzní transkriptázy SmartScribe RT. Reakce byla prováděna při 42 °C, 90 minut a závěr reakce proběhl při 70 °C po dobu 15 minut.

### 3.6 Real-time PCR

Pro vyhodnocování hladiny transkripce genu pro katalázu a superoxiddismutázu bylo využito kvantitativní real-time PCR. Jako vnitřní kontrola u drozofily sloužil gen pro ribozomální protein RpL 32 a u sarančete gen pro protein aktin. Primery navržené ke kódujícím sekvencím daných genů jsou uvedeny v tabulce 1 a 2.

**Tab. 1:** Sekvence použitých primerů u *D.melanogaster*.

Gen	Název primeru	Velikost produktu	Sekvence primeru
<i>Kataláza</i>	Cat2174F	63pb	5'-AAGCAAAATGGCTGGACGCG-3'
	Cat5822R	63pb	5'-CAGGATAGGTCCTCGCGGA-3'
<i>Superoxiddismutáza</i>	Sod2095F	875pb	5'-TCGAAATGGTGGTTAAAGCTG-3'
	Sod2970R	875pb	5'-AACTCGTGCACGTGGAATCC-3'
<i>Rpl32</i>	RpL32F/RpL32B	146pb	5'-GGACAGTATCTGATGCCCAAC-3'
	RpL32B/RpL32B	146pb	5'-ATCTCGCCGCAGTAAACGC-3'

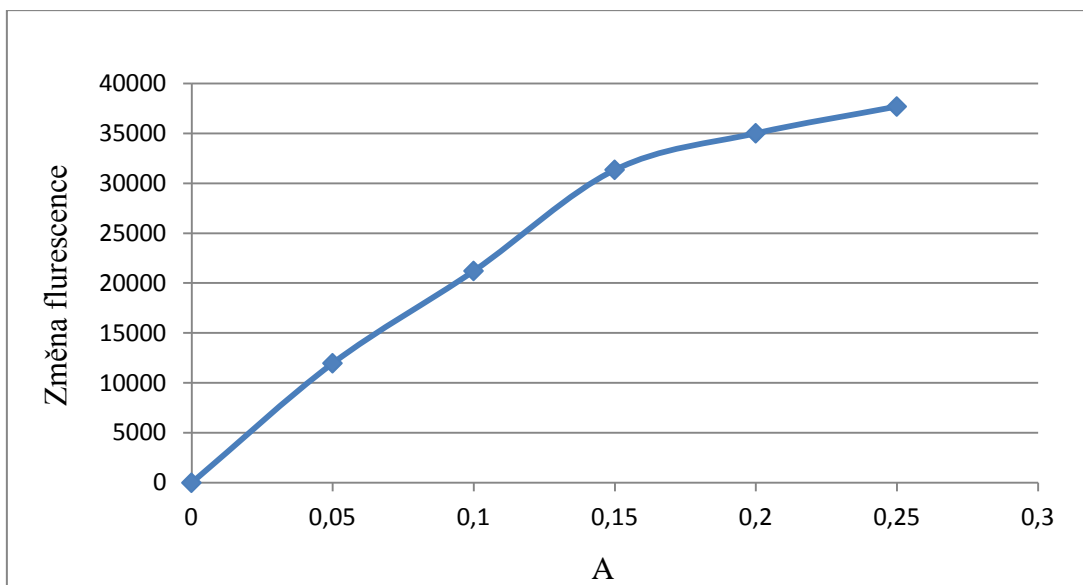
**Tab. 2:** Sekvence použitých primerů u *L. migratoria*.

Gen	Název primeru	Velikost produktu	Sekvence primeru
<i>Kataláza</i>	Cat50F	138pb	5'-TCGGCAAAGTAATTCTTGGGG-3'
	Cat209R	138pb	5'-ATTGCAACAGGAAACTTCCCC-3'
<i>Superoxiddismutáza</i>	Sod49F	143pb	5'-ATTCGGTGACAACACTAACGG-3'
	Sod207R	143pb	5'-TCTCCAGTCAGAGAGATAACC-3'
<i>Actin</i>	Act79PO_F	171pb	5'-TGTATGCCAACAAATGTGCTG-3'
	Act79PO_B	171pb	5'-ACAACGAAGCCAGGATGGAG-3'

Pro reakci byl využit Syber Premix Ex Taq II (Takara, katalogové číslo RR081A) a reakce byla prováděna na BioRad CFX96 Real-time System. Každá reakce byla připravována v duplikátech, v objemu o 25  $\mu$ l, s primery o koncentraci 0,2 pmol/ $\mu$ l a s 1  $\mu$ l cDNA. Průběh reakcí byl 3min, 95 °C - (95 °C, 30 s - 58 °C, 30 s - 72 °C, 20 s) 30x. U každé reakce byla získána hodnota  $c_t$  („cycle threshold“), která definuje cyklus amplifikace, kde hodnota fluorescence v reakci překoná prahovou fluorescenci („threshold“). Čím je hodnota  $c_t$  menší, tím vyšší je výchozí množství amplifikované DNA. Získané hodnoty  $c_t$  byly přepočítány na základě komparativní metody podle vztahu  $R = \text{Eff}_{\text{Ref}}^{c_t^{\text{Ref}}} / \text{Eff}_{\text{Target}}^{c_t^{\text{Target}}}$ , kde Eff je účinnost reakce, Ref je referenční gen,  $c_t$  je získaná hodnota  $c_t$ , target je cílový gen.

### 3.7 Vyhodnocení enzymatické aktivity katalázy

Ke stanovení enzymatické aktivity katalázy byl použit Amplex Red Catalase Assay Kit (Invitrogen, katalogové číslo A22180) a bylo postupováno podle protokolu uvedeným výrobcem. K testovanému vzorku je přidán peroxid vodíku, který je přítomnou katalázou rozkládán na vodu a kyslík. Nezreagovaný peroxid vodíku je detekován reakcí s fluorogenním substrátem Amplex Red, a to za přítomnosti křenové peroxidázy, která tuto reakci katalyzuje. Reakcí vzniká vysoce fluorescenční produkt resorufin, jehož přítomnost je detekována fluorimetricky při 571-585 nm. Čím vyšší je katalázová aktivita, tím nižší je fluorescence. Hodnoty fluorescence jsou odečítány od hodnot fluorescence slepého vzorku, tj. vzorku, který obsahuje homogenizační roztok, jako tzv. změna fluorescence. Vedle reakcí testovaných vzorků jsou paralelně prováděny reakce standardní křivky, tj. reakce s definovaným množstvím katalázy, což umožňuje výpočet množství jednotek katalázy přítomných v testovaných vzorcích (Obr. 3). Údaj o množství jednotek katalázy je výsledně vztážen k množství proteinů v daných vzorcích.



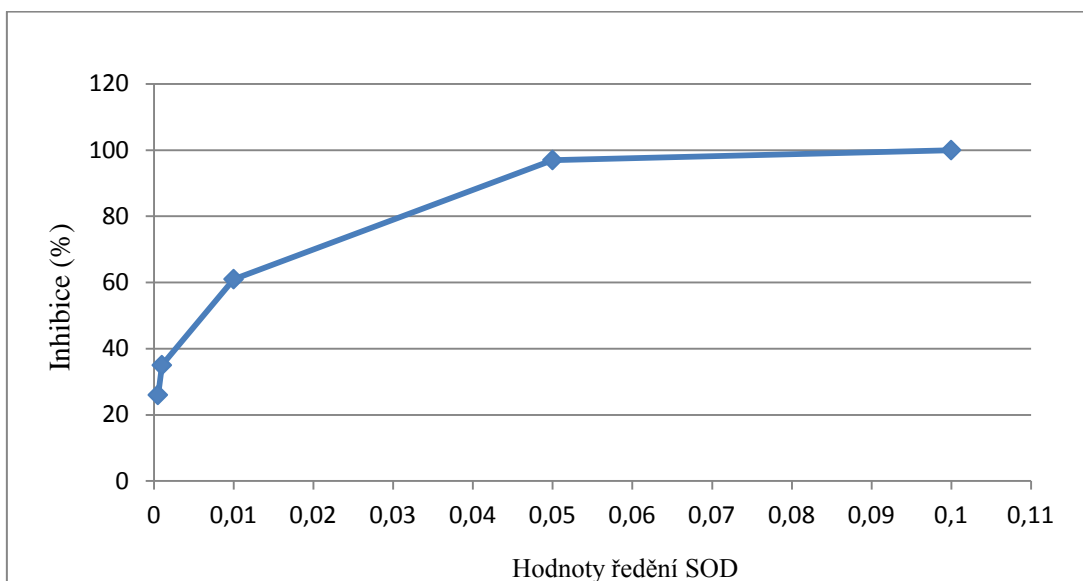
**Obr. 3:** Standardní křivka pro měření aktivity katalázy získaná v jednom z experimentů. Na ose  $y$  jsou zaznamenány hodnoty změny fluorescence a osa  $x$  určuje počet jednotek (U) na 1 ml roztoku.

### 3.8 Vyhodnocení enzymatické aktivity superoxidodismutázy (SOD)

Enzymatická aktivita superoxidodismutázy byla vyhodnocována pomocí SOD determination kit (Sigma – Aldrich, katalogové číslo 19160), kdy bylo postupováno podle protokolu uvedeného výrobcem. Princip metody spočívá ve vytvoření červeného barviva formazanu, a to po redukci tetrazoliové soli superoxidovým aniontem, produkovaným na základě aktivity xantin oxidázy. Vznik superoxidových radikálů je inhibován přítomností superoxidodismutázy, která superoxidový radikál rozkládá na kyslík a peroxid vodíku. Tzn., že se snižující se aktivitou SOD v testovaném vzorku vzrůstá přítomnost formazanu. 50% inhibice vzniku superoxidových radikálů odpovídá aktivitě 1U SOD v reakci. Přítomnost formazanu je vyhodnocována spektrofotometricky při 440 nm.

Rekce byla prováděna s 20  $\mu$ l 5x, 10x a 20x ředěného vzorku. Pro každé ředění byla vypočítaná procentuelní míra inhibice reakce, a to dle vztahu inhibice (%) =  $\{[(A_{\text{blank 1}} - A_{\text{blank 3}}) - (A_{\text{vzorku}} - A_{\text{blank 2}})] / (A_{\text{blank 1}} - A_{\text{blank 3}})\} * 100$ , kde  $A$  je absorbance. Blank neboli slepý roztok je identický roztok, který neobsahuje analyzovanou látku. Při přípravě blanku 1 a 3 jsem namísto vzorku použila  $H_2O$  a blank 3 navíc neobsahoval enzymatický roztok, nýbrž roztok ředící. Ze získaných hodnot byla vytvořena kalibrační křivka, která sledovala míru inhibice v závislosti na ředění (Obr. 4). Z údajů ředění a míry inhibice byla pomocí programu Excell vypočítána funkce „slope“ a „intercept“, kde „slope“ je směrnice přímky a „intercept“ je průsečík s osou  $y$ . Ředění, které vykazovalo 50% inhibici reakce, tj. obsahovalo 1U SOD, bylo vypočítáno jako  $50x (\text{slope}) - (\text{intercept})$ . Ze zjištěného ředění bylo vypočteno množství jednotek SOD v testovaném

vzorku a toto množství bylo vztaženo na množství celkových proteinů. Měření bylo opakováno 3 - 7x.



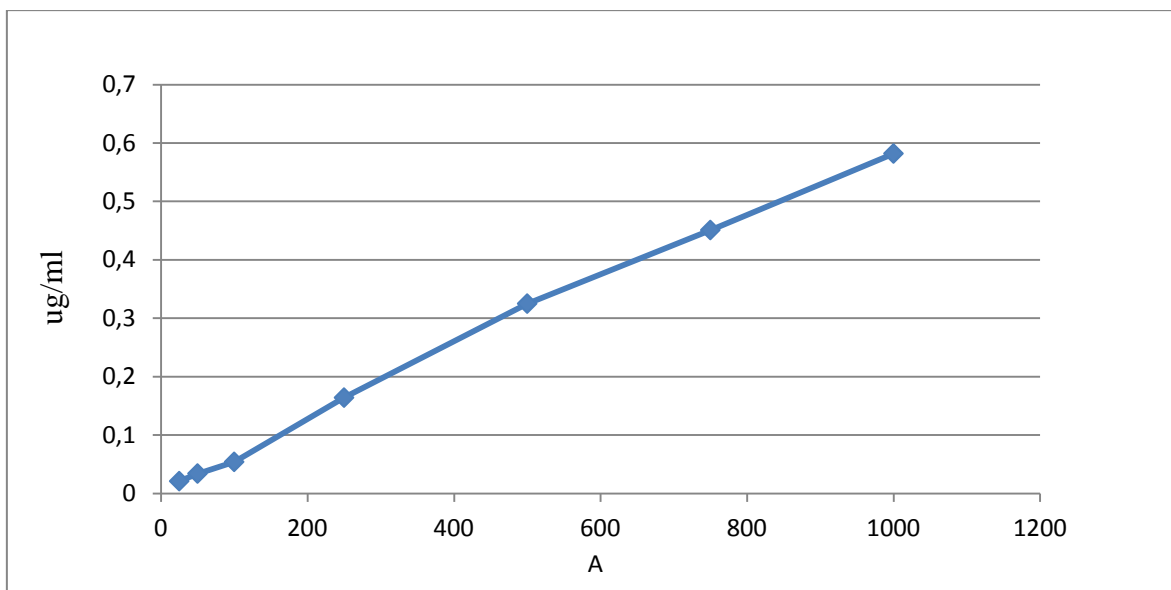
**Obr. 4:** Standardní křivka pro měření aktivity superoxidodismutázy. Na ose y jsou zaznamenány hodnoty ředění enzymu superoxidodismutázy a osa x určuje inhibici reakce. 50% inhibice se vyskytuje v ředění cca. 0,01, což odpovídá 1 U SOD v neředěném roztoku.

### 3.9 Vyhodnocení vodných hydroperoxidů

Vyhodnocení peroxidů bylo stanoveno pomocí PeroxiDetect kit (Sigma – Aldrich, katalogové číslo PD1-1KT). Při pokusu bylo postupováno podle protokolu výrobce. Princip vyhodnocení peroxidů je založen na faktu, že peroxidy oxidují  $Fe^{2+}$  ionty na  $Fe^{3+}$ .  $Fe^{3+}$  vytvářejí barevný adukt s xylenolou oranž, jehož přítomnost je vyhodnocována spektrofotricky při 560 nm. Barevnost produktu je zesílena obohacením reakční směsi o sorbitol. Nejprve je sorbitol přeměněn peroxidem vodíku na peroxidový radikál a poté tento radikál iniciuje oxidaci  $Fe^{2+}$  iontu na iont  $Fe^{3+}$  a formuje barevný adukt s xylenolovou oranží.

### 3.10 Měření celkových proteinů

Ke stanovení celkových proteinů byl použit BCA Protein Macro Assay Kit (Serva, katalogové číslo 39228) a bylo postupováno dle protokolu výrobce. Pro měření celkových proteinů byly použity 10x ředěné vzorky. Metoda měření celkových proteinů využívá alkalické redukce měďnatého iontu na měďný protein a následné chelatace kyseliny bicinchoninové, za vzniku červeného barviva, jehož absorbance je spektrofotricky vyhodnocena při 562 nm. Množství proteinů je kalibrováno dle paralelně připravovaných reakcí standardní křivky s BSA (bovine serum albumin) (Obr. 5).



**Obr. 5.** Kalibrační křivka BCA, kde osa x udává hodnoty absorbance kalibrační křivka a osa y vyjadřuje množství standardu na 1 ml.

### 3.11 Statistická analýza

Statistické analýzy dat byly provedeny pomocí GraphPad Prism 3.01 softwaru. Z naměřených dat byla zjišťována závislost výsledků testů na zvýšení/snížení antioxidantních enzymů. Analýzou byly srovnány hodnoty jednotlivých koncentrací spolu s kontrolou. Pro vyhodnocení enzymatické aktivity katalázy a superoxiddismutázy byl použit jednocestný párový t-test na hladině 5% významnosti. Párový t-test je metoda založená na shodě průměrů pro dva závislé výběry. Transkripční aktivita enzymů byla vyhodnocena jednocestným nepárovým t-testem na hladině 5% významnosti. Průměrné hodnoty nacházející se ve výsledkové části, jsou uvedeny společně se směrodatnou odchylkou.

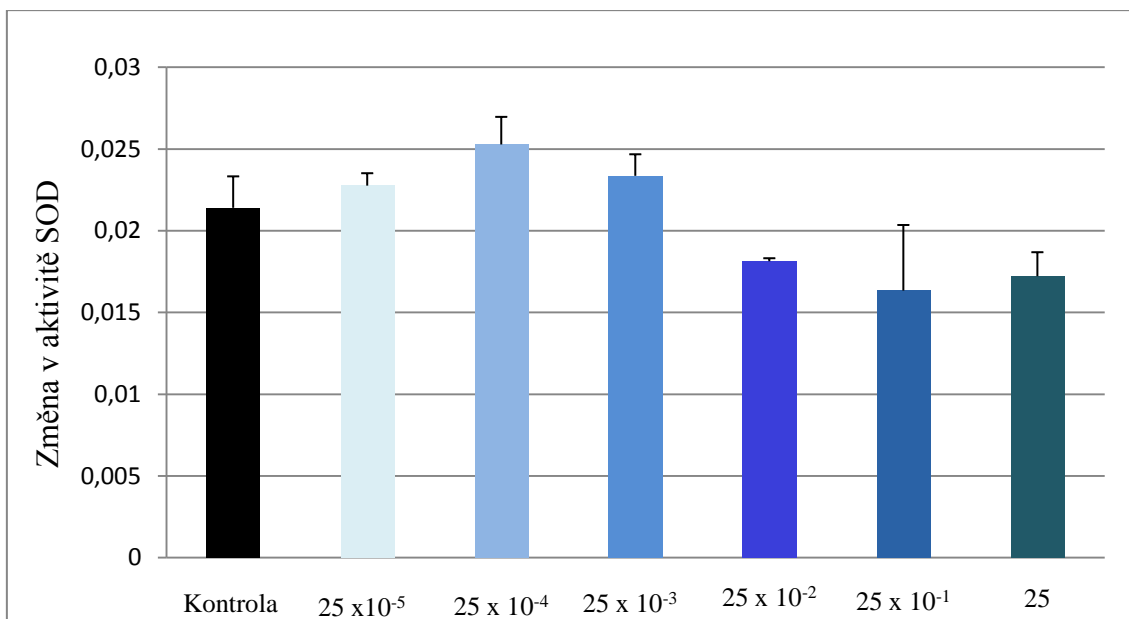
## 4 Výsledky

### 4.1 *D. melanogaster*

#### 4.1.1 Vyhodnocení enzymatické aktivity SOD

Při vyhodnocování enzymatické aktivity SOD byl oxidativní stres indukován parakvatem o koncentracích použitých v některých z dříve publikovaných studií (Rzezniczak et al., 2011; Vettraino et al., 2001; Wang et al., 2001). Koncentrace tedy byly  $25 \times 10^{-2}$ ,  $25 \times 10^{-1}$  a 25 mM s dobou působení 12 - 14 hodin. Navzdory očekávání jsem i při opakovaných pokusech u těchto koncentrací ve srovnání s kontrolou našla pokles aktivity SOD. Jedním z možných vysvětlení byla nevhodnost protokolu, který byl pro přípravu vzorků použit. Proto jsem v další fázi práce testovala možné varianty protokolů. Byl testován vliv anestezie much, kdy byly mouchy uspávány buď pomocí CO<sub>2</sub> nebo chladem, a také bylo testováno stáří much. Dále byla optimalizována příprava homogenátu. Homogenizace tkáně byla prováděna plastovým tloučkem v 0,2 mM fosfátovém pufru o pH 7,8 nebo 50 mM draselno-fosfátovém pufru o pH 7,8. Rovněž byl testován vliv sonikace homogenizovaných vzorků, vortexování vzorků či různé rychlosti centrifugace. Pokusy byly prováděny u skupiny dospělců, ve které byla obě pohlaví zastoupena rovnoměrně s tím, že mouchy byly nejdéle den po vylíhnutí roztríděny podle pohlaví a uchovávány odděleně, aby nedošlo k vzájemné interakci obou pohlaví. Nicméně při testování uvedených postupů nebyl při použití daných koncentrací parakvatu v aktivitě SOD žádný nárůst nalezen (data neukázána).

To vedlo k mému dalšímu předpokladu, že tyto koncentrace parakvatu mohou být příliš vysoké a také, že toxický vliv parakvatu při těchto koncentracích vede k možnému kolapsu antioxidační obrany. Proto jsem přistoupila na testování koncentrací parakvatu od  $25 \times 10^{-5}$  až  $25 \times 10^{-3}$  mM. V souladu s předpokladem jsem skutečně při těchto koncentracích začala opakovaně získávat signifikantní nárůst antioxidační aktivity (Obr. 6). Výsledkem měření u každého vzorku bylo množství jednotek SOD v jednom  $\mu\text{g}$  celkových proteinů. Z naměřených hodnot aktivity SOD ze všech koncentrací je patrné, že maximální aktivita SOD je dosažena při koncentraci parakvatu  $25 \times 10^{-4}$  mM a při vyšších koncentracích parakvatu aktivita SOD klesá.

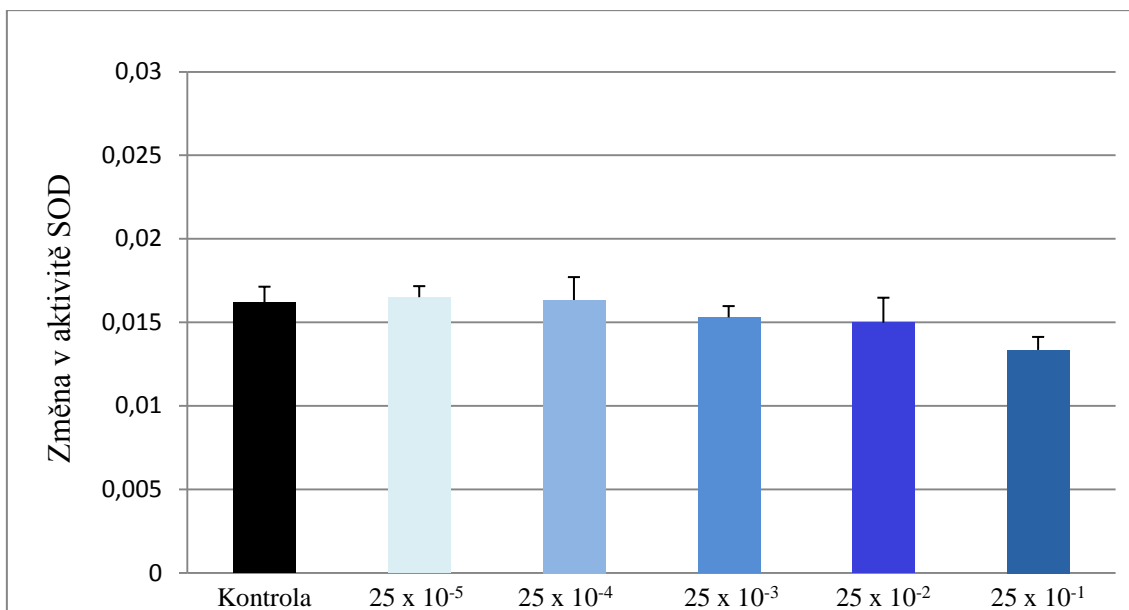


**Obr. 6:** Změny aktivity superoxiddismutázy *D. melanogaster* po působení parakvatu. Hodnoty koncentrace jsou uvedeny v jednotkách mM.

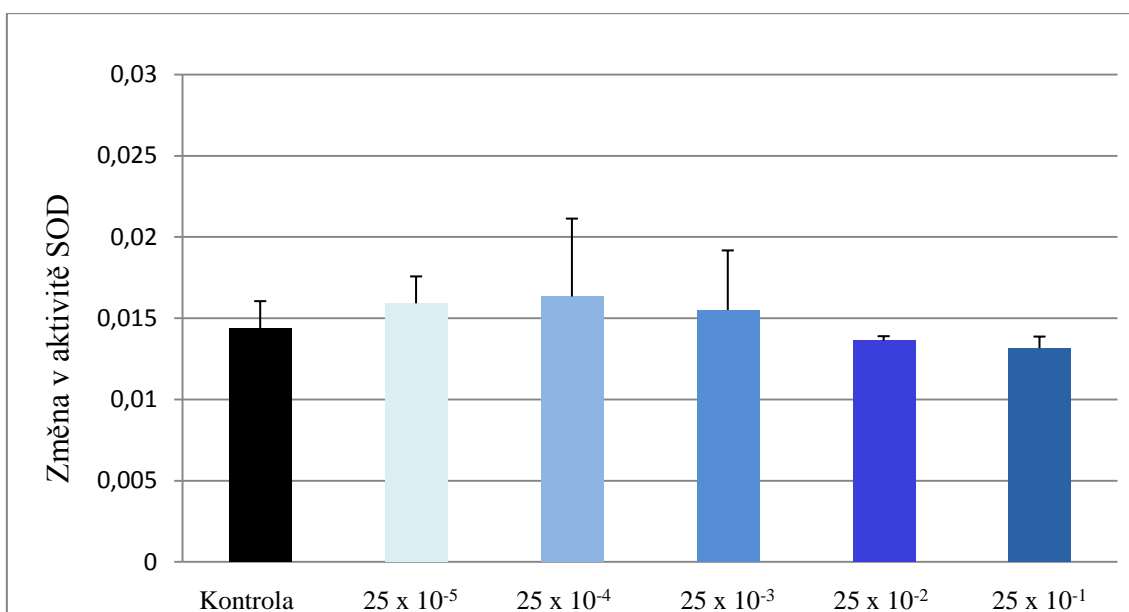
#### 4.1.2 Vyhodnocení enzymatické aktivity SOD mezi pohlavími

Po zjištění, že ke změně aktivity superoxiddismutázy dochází již při relativně nízkých koncentracích, se nabízelo rozvinout sérii pokusů odděleně u obou pohlaví, protože je obecně předpokládáno, že funkce antioxidantních enzymů může být ovlivněna pohlavím. Průměrné množství jednotek SOD v 1  $\mu\text{g}$  celkových proteinů ve vzorcích kontroly se lišilo nepatrně. U samic průměrné množství U SOD/  $\mu\text{g}$  celkových proteinů bylo  $0,014 \pm 0,0017$  a u samců to bylo  $0,0161 \pm 0,0009$ . Avšak bylo zajímavé, že při testování homogenátu připraveného z obou pohlaví, kdy rovněž byla obě pohlaví při působení parakvatu držena dohromady, se toto množství pohybovalo průměrně kolem  $0,0206 \pm 0,0019$  U SOD v 1  $\mu\text{g}$  celkových proteinů. K maximálnímu nárůstu aktivity SOD u obou pohlaví dochází při koncentraci  $25 \times 10^{-4}$  mM (Obr. 7 a 8). Pokud porovnáme nárůst změny aktivity SOD, zjistíme, že hladina aktivity je u všech koncentrací u pohlaví držených spolu mnohem vyšší, než u jednotlivých pohlaví držených zvlášť (Obr. 6,7 a 8).





**Obr. 7:** Změny aktivity superoxiddismutázy samců *D. melanogaster* po působení parakvatu. Hodnoty koncentrace jsou uvedeny v jednotkách mM.

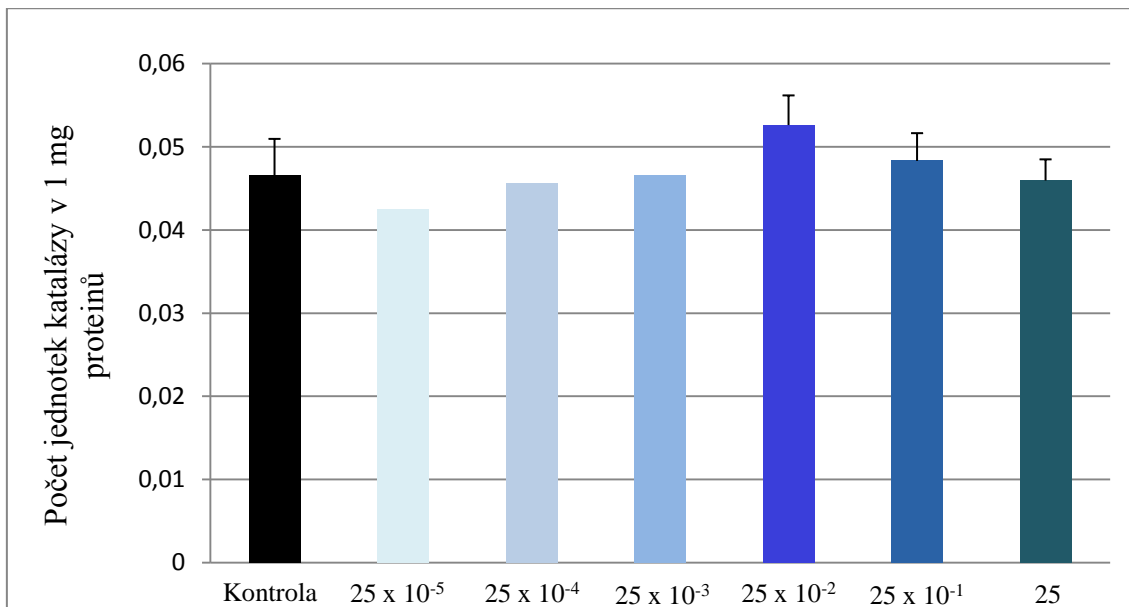


**Obr. 8:** Změny aktivity superoxiddismutázy samic *D. melanogaster* po působení parakvatu. Hodnoty koncentrace jsou uvedeny v jednotkách mM.

#### 4.1.3 Vyhodnocení enzymatické aktivity katalázy

Aktivita katalázy byla vyhodnocována při koncentracích parakvatu  $25 \times 10^{-5}$ ,  $25 \times 10^{-4}$ ,  $25 \times 10^{-3}$ ,  $25 \times 10^{-2}$ ,  $25 \times 10^{-1}$  a 25 mM. Výsledkem měření u každého vzorku bylo množství jednotek CAT v jednom  $\mu\text{g}$  celkových proteinů. Průměrné množství jednotek CAT v 1  $\mu\text{g}$  celkových proteinů kontroly bylo ze všech osmi opakování  $0,000953 \pm 0,0002$ . Z výsledků je patrný narůstající trend, který vrcholí u koncentrace  $25 \times 10^{-2}$  mM a dále se aktivita

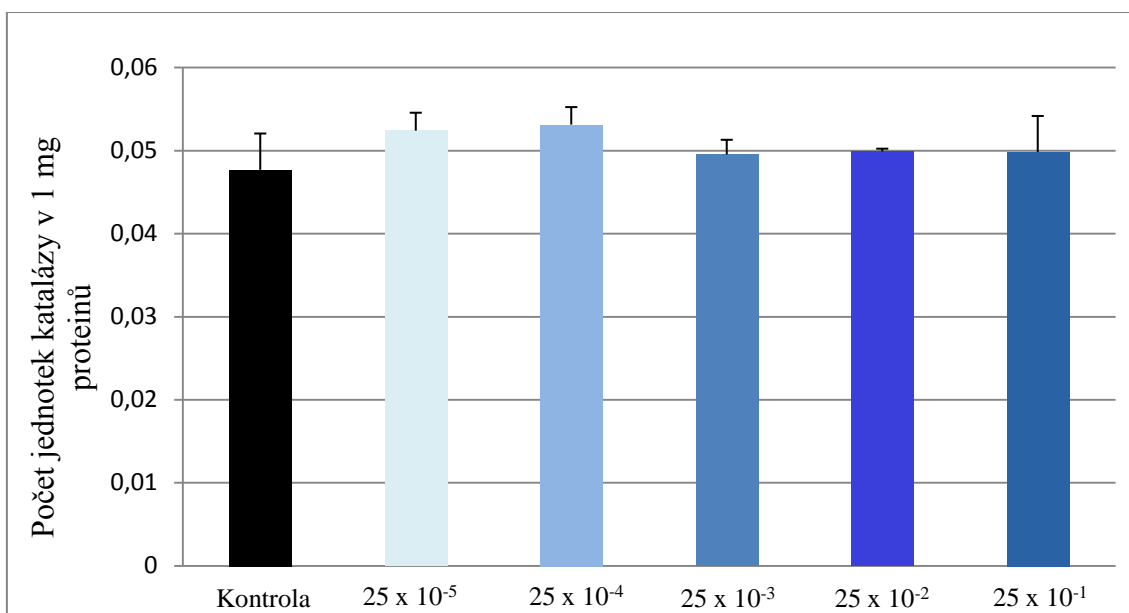
katalázy snižuje (Obr. 8). Dávky parakvatu u koncentrací  $25 \times 10^{-1}$  a 25 mM zřejmě již přesahují kritickou koncentraci, za kterou je aktivita katalázy utlumena (Obr. 9).



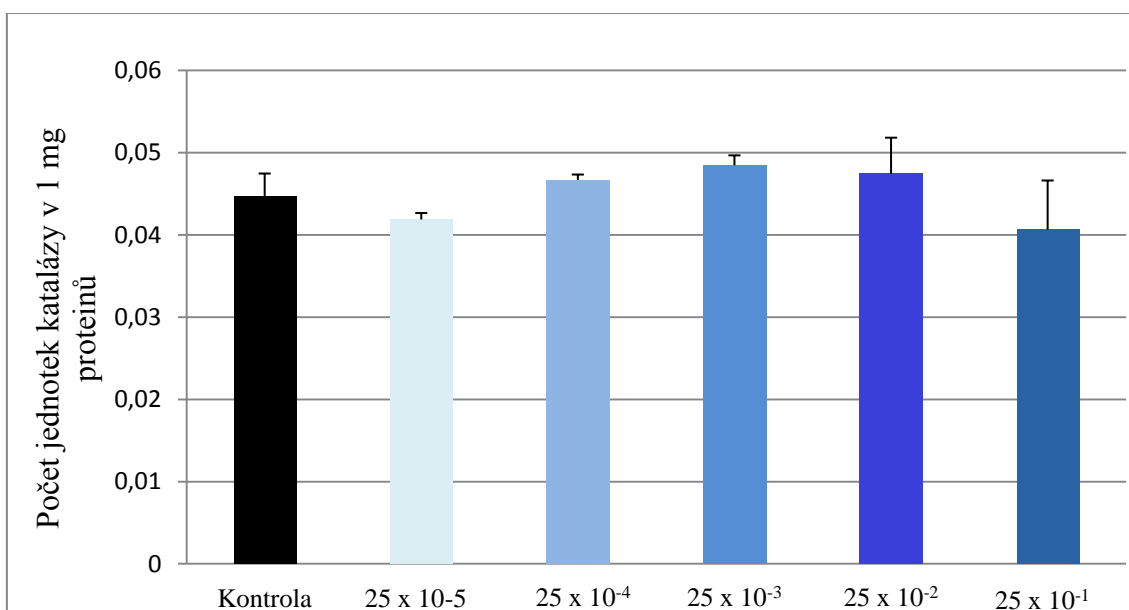
**Obr. 9:** Změny aktivity katalázy dospělců *D. melanogaster* po působení parakvatu. Hodnoty koncentrace jsou uvedeny v jednotkách mM.

#### 4.1.4 Vyhodnocení enzymatické aktivity katalázy mezi pohlavími

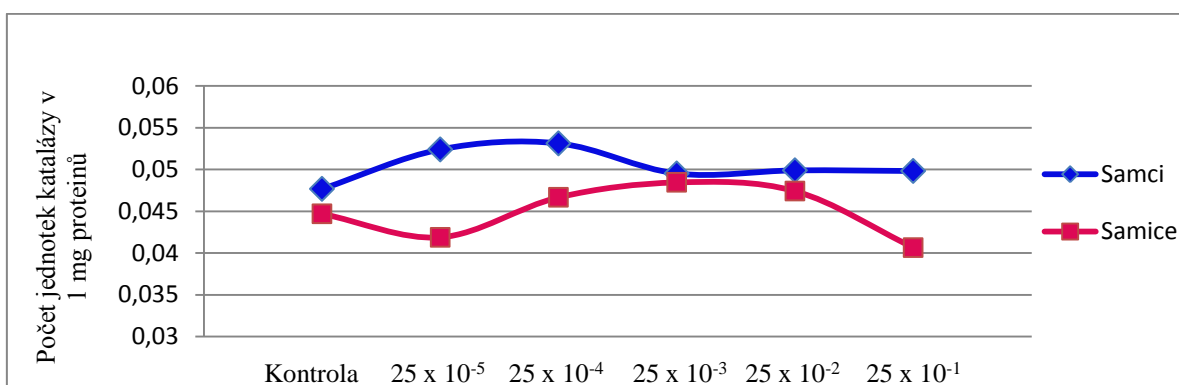
Dalším cílem bylo porovnat zvýšení funkce katalázy mezi pohlavími. Průměrné množství U CAT/ mg celkových proteinů u samic v kontrolním vzorku bylo  $0,0447 \pm 0,0028$  a u samců v kontrolním vzorku to bylo průměrné množství  $0,048 \pm 0,0044$  (Obr. 10 a 11). Při testování obou pohlaví dohromady se toto množství pohybovalo průměrně kolem  $0,046 \pm 0,0045$  U CAT v 1  $\mu$ g celkových proteinů (Obr. 9). Srovnáním aktivity CAT mezi pohlavími byl dále pozorován posun maximální aktivity (Obr. 10, 11 a 12). Zatímco u samic dochází ke zvýšení nárůstu aktivity katalázy již u koncentrací  $25 \times 10^{-5}$  a  $25 \times 10^{-4}$  mM, reakce samic na parakvat je opožděná a dochází k ní až při koncentracích  $25 \times 10^{-3}$  mM.



**Obr. 10:** Změny aktivity katalázy samců *D. melanogaster* po působení parakvatu. Hodnoty koncentrace jsou uvedeny v jednotkách mM.



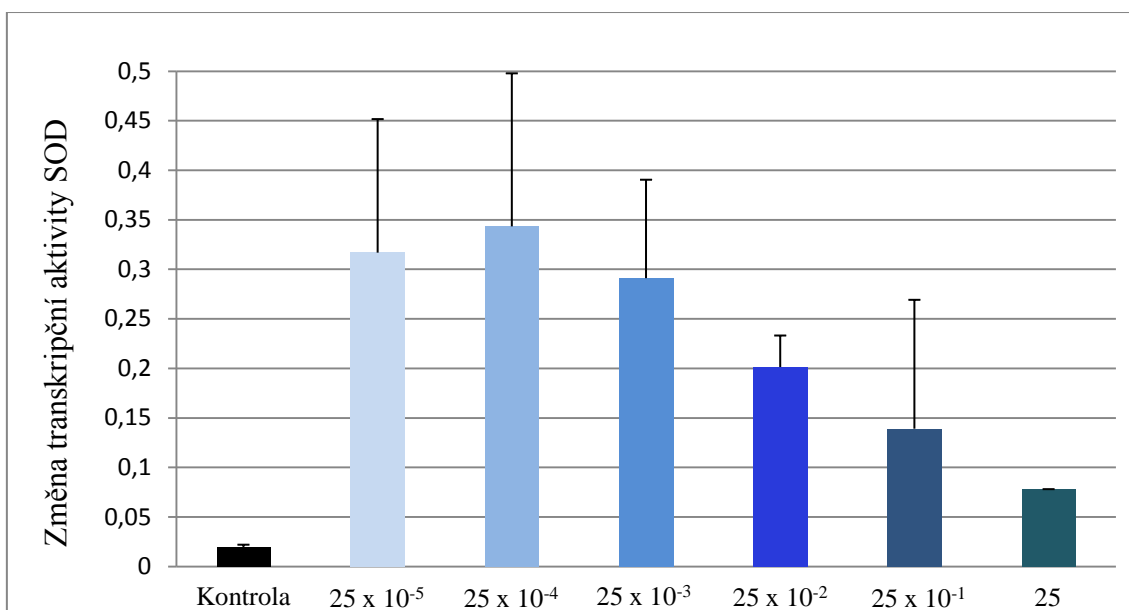
**Obr. 11:** Změny aktivity katalázy samic *D. melanogaster* po působení parakvatu. Hodnoty koncentrace jsou uvedeny v jednotkách mM.



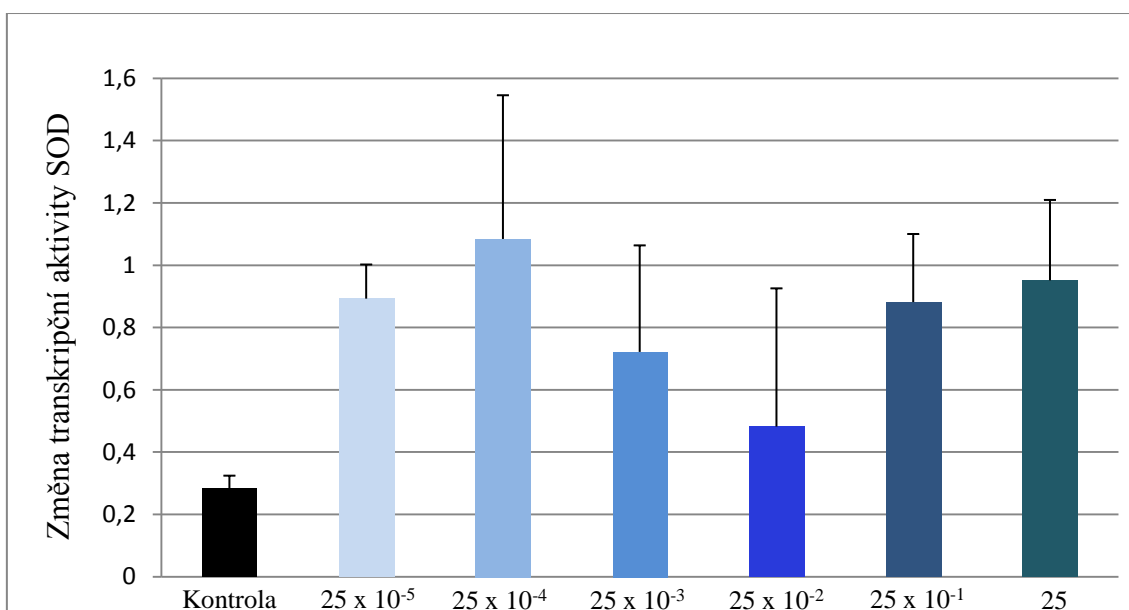
**Obr. 12:** Změny aktivity katalázy mezi pohlavími u *D. melanogaster* po působení parakvatu. Hodnoty koncentrace jsou uvedeny v jednotkách mM.

#### 4.1.5 Vyhodnocení transkripční aktivity superoxiddismutázy a katalázy mezi pohlavími

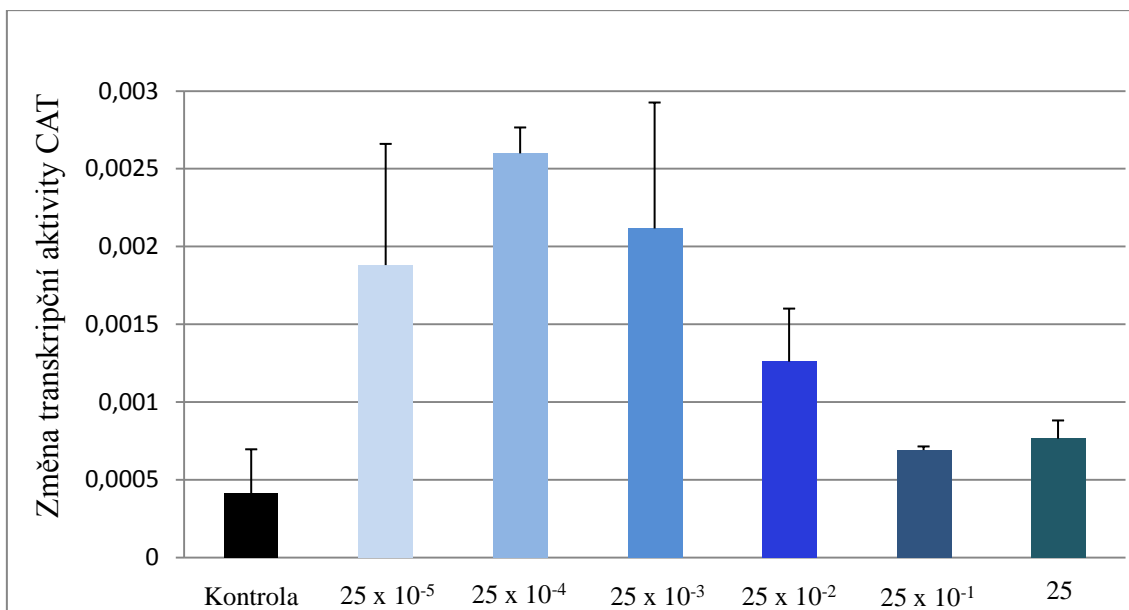
Dalším důkazem oxidativního stresu je hladina transkripce antioxidantních enzymů. Téměř u všech vzorků obou pohlaví je zřejmý nárůst transkripce vzhledem ke kontrole (Obr. 13-16). U samic je také patrný jasný trend nárůstu/poklesu aktivity s měnící se koncentrací parakvatu. U SOD transkripční aktivita vrcholí u koncentrace  $25 \times 10^{-4}$  nmol a od této hodnoty dále klesá (Obr. 13), u CAT je maximální nárůst při koncentraci  $25 \times 10^{-4}$  nmol (Obr. 15).



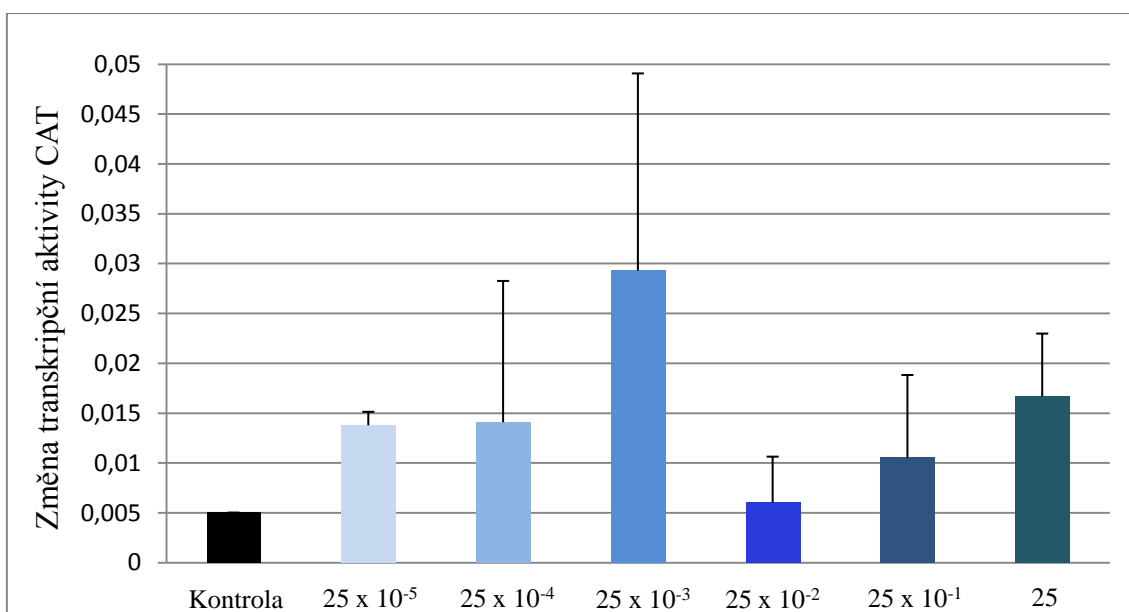
**Obr. 13:** Změny transkripční aktivity superoxiddismutáz u samic *D. melanogaster* po působení parakvatu. Hodnoty koncentrace jsou uvedeny v jednotkách mM.



**Obr. 14:** Změny transkripční aktivity superoxiddismutázy u samců *D. melanogaster* po působení parakvatu. Hodnoty koncentrace jsou uvedeny v jednotkách mM.



**Obr. 15:** Změny transkripční aktivity katalázy u samic *D. melanogaster* po působení parakvatu. Hodnoty koncentrace jsou uvedeny v jednotkách mM.

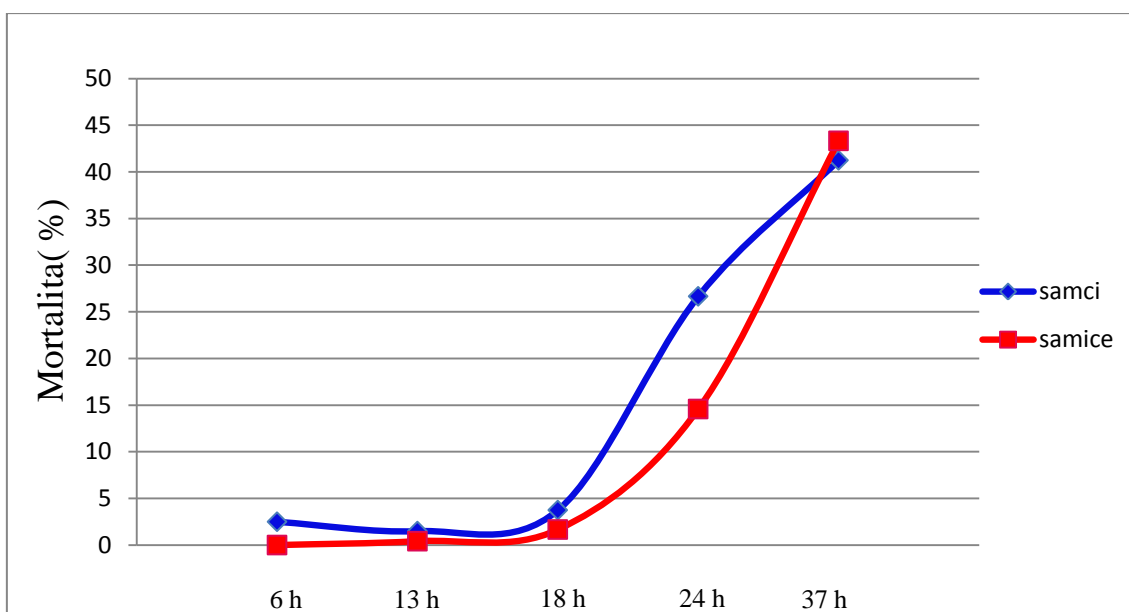


**Obr. 16:** Změny transkripční aktivity katalázy u samců *D. melanogaster* po působení parakvatu. Hodnoty koncentrace jsou uvedeny v jednotkách mM.

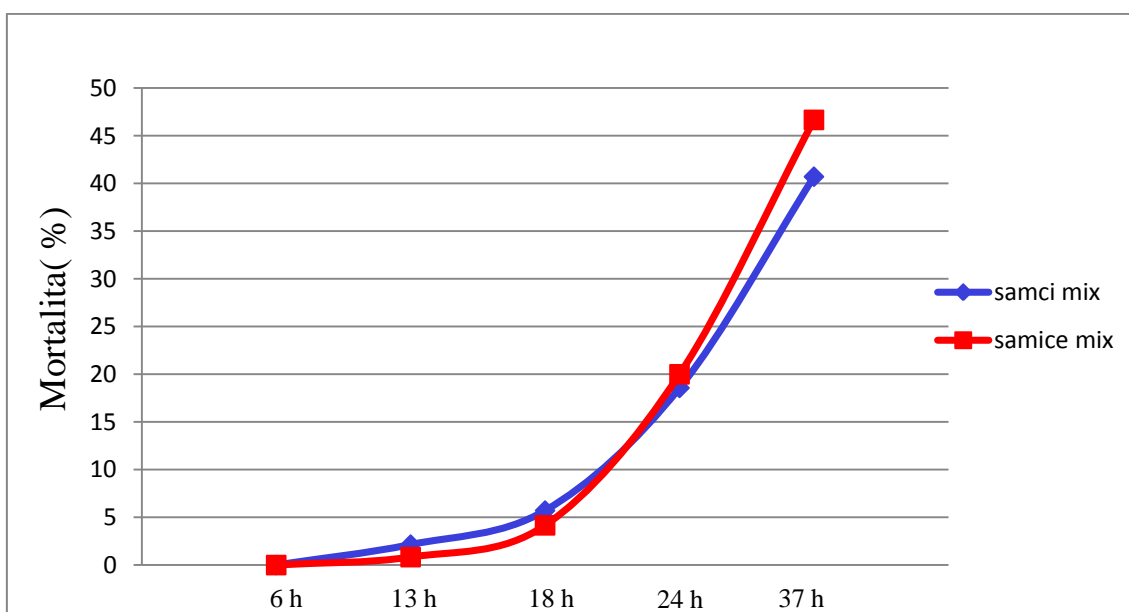
#### 4.1.6 Vyhodnocení vlivu pohlaví na mortalitu

Dalším důkazem negativního vlivu oxidativního stresu u *D. melanogaster* je jeho vliv na mortalitu. Oxidativní stres byl vyvolán parakvatem o nejvyšší koncentraci, použité v předchozích pokusech, tj. 25 mM. Z výsledků mortality samic a samců, kdy byla obě pohlaví před působením parakvatu držena po 24 hodin odděleně a také odděleně dána na paraquat, je zřejmá vyšší mortalita samců než samic (Obr. 17). Pokud však byli jedinci

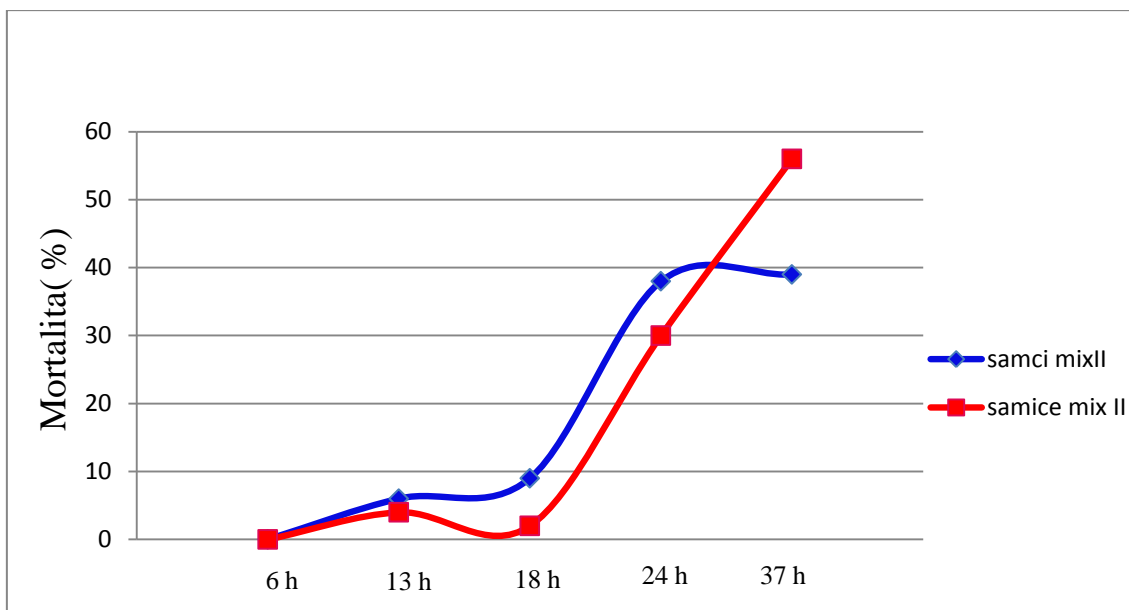
na parakvat dání společně (v grafech označováno jako samci/samice mix), došlo po cca 24 hodinách k viditelnému nárůstu mortality u samic a naopak k poklesu u samců (Obr. 18, 20, 21). V případě, že byli jedinci před působením parakvatu drženi dohromady (opět po 24 hodin) a také dání společně na parakvat (v grafech označováno jako samci/samice mix II), byla mortalita u obou pohlaví zaznamenána jako nejvyšší. (Obr. 19). V tomto případě samci taktéž vykazovali vyšší mortalitu oproti samicím (Obr. 19).



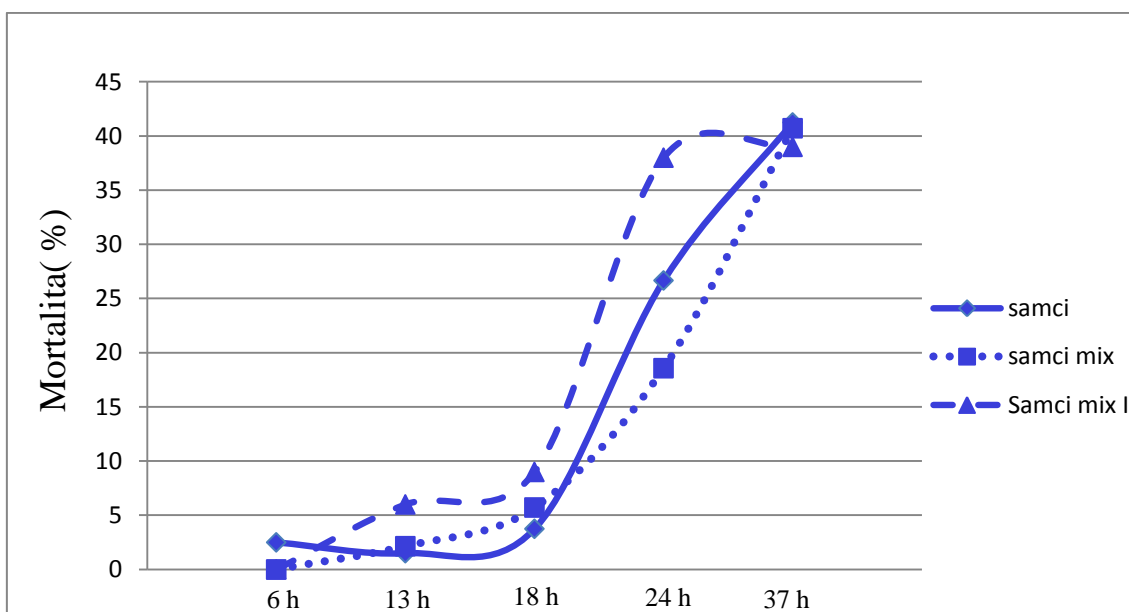
**Obr. 17:** Vliv pohlaví na mortalitu samců a samic *D. melanogaster* po působení 25 mM parakvatu po dobu 37 hodin.



**Obr. 18:** Vliv pohlaví na mortalitu při vzájemné interakci pohlaví *D. melanogaster* po působení 25 mM parakvatu po dobu 37 hodin.

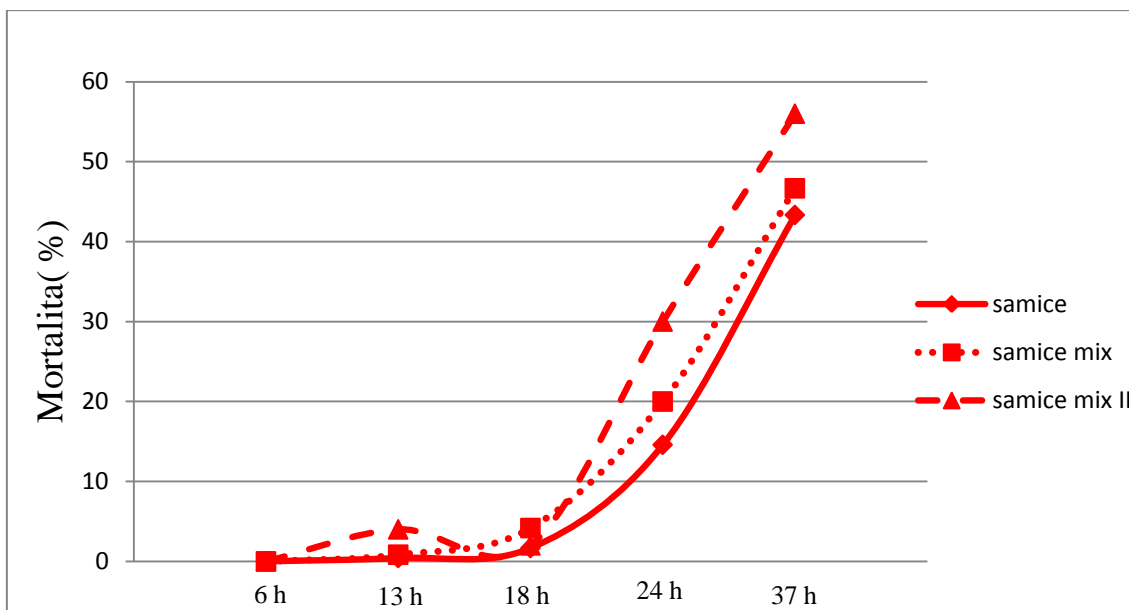


**Obr. 19:** Vliv pohlaví na mortalitu při dlouhodobé vzájemné interakci pohlaví *D. melanogaster* po působení 25 mM parakvatu po dobu 37 hodin.



**Obr. 20:** Vliv interakce pohlaví na mortalitu samců *D. melanogaster* po působení 25 mM parakvatu po dobu 37 hodin.





**Obr. 21:** Vliv interakce pohlaví na mortalitu samic *D. melanogaster* po působení 25 mM parakvatu po dobu 37 hodin.

#### 4.1.7 Vyhodnocení přítomnosti vodných hydroperoxidů po působení parakvatu

Pro testování vodných peroxidů byly využity stejné koncentrace parakvatu jako v předešlých experimentech, tj. koncentrace  $25 \times 10^{-5}$ ,  $25 \times 10^{-4}$ ,  $25 \times 10^{-3}$ ,  $25 \times 10^{-2}$ ,  $25 \times 10^{-1}$  a 25 mM a doba působení byla 12 - 14 hodin. Nicméně i při opakovaných pokusech nebyla vzhledem ke kontrole zvýšená přítomnost vodných peroxidů zaznamenána. Vzhledem k potvrzenému nárůstu oxidativního stresu při použitých koncentracích, je nezvýšená hladina vodných peroxidů patrně pouze metodický problém. Z časových důvodů ovšem nebylo možné testovat další modifikace protokolu.

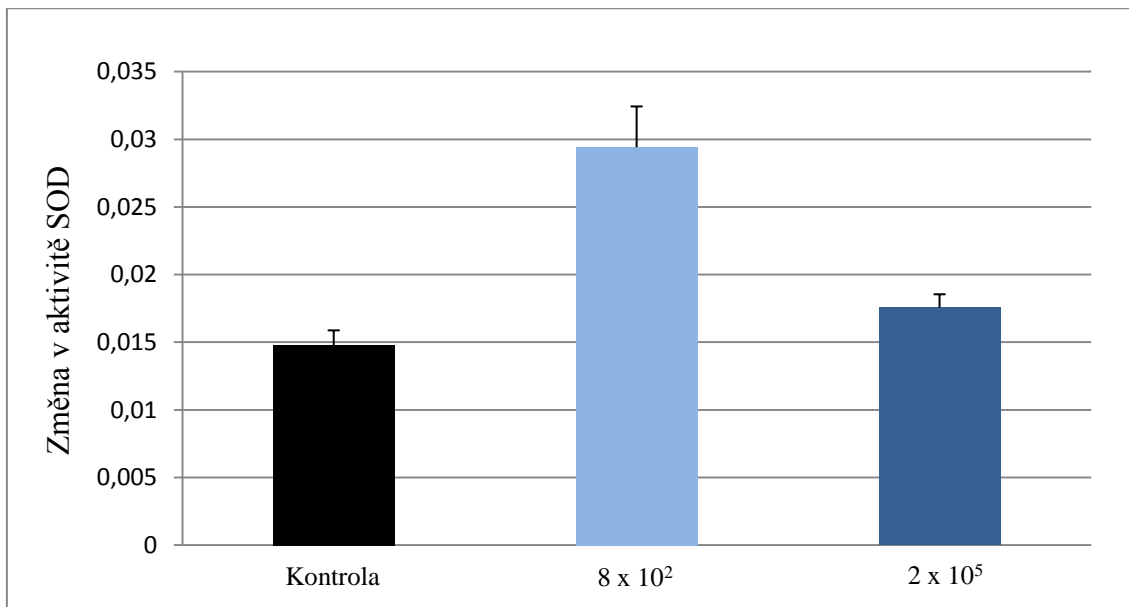
## 4.2 *L. migratoria*

### 4.2.1 Vyhodnocení antioxidační aktivity

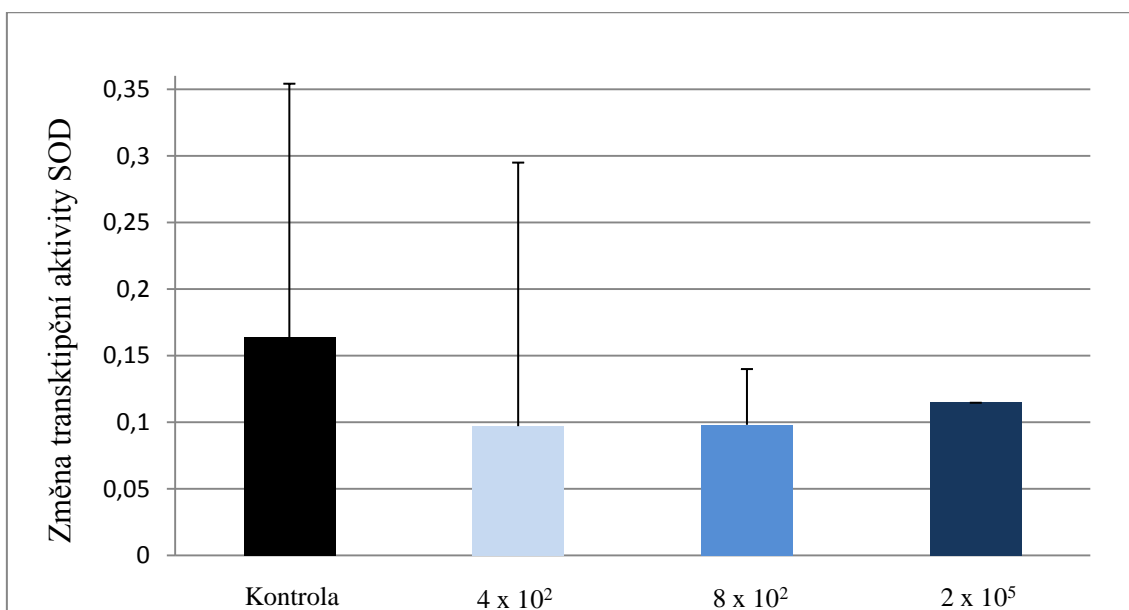
Jako marker antioxidační aktivity byla u *L. migratoria* vyhodnocována enzymatická aktivita SOD. Při působení parakvatu byl pozorován výrazný nárůst jednotek superoxiddismutázy. Maximální nárůst byl pozorován při koncentraci  $8 \times 10^2$  pM, zatímco při testování koncentrace parakvatu  $2 \times 10^5$  pM byl pozorován pokles téměř na hodnotu kontroly (Obr. 22).

Na transkripční úrovni byla testována superoxiddismáza a kataláza. Bylo prokázáno, že při koncentraci  $4 \times 10^2$  pM dochází k signifikantnímu nárůstu transkripce katalázy, při koncentracích  $8 \times 10^2$  a  $2 \times 10^5$  pM se transkripční aktivita již snižuje (Obr. 23). U aktivity

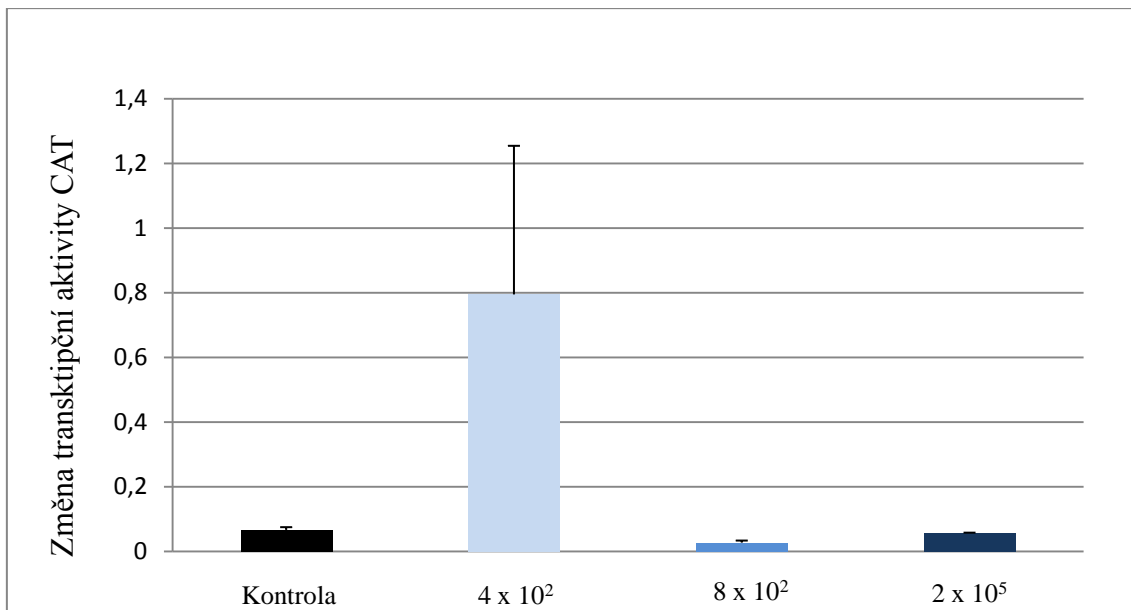
superoxiddismutázy byl v testovaných vzorcích vzhledem ke kontrole nalézán její pokles (Obr. 24).



**Obr. 22:** Změny aktivity superoxid-dismutázy dospělců *L. migratoria* po působení parakvatu. Hodnoty koncentrace jsou uvedeny v jednotkách pM.



**Obr. 23:** Změny transkripční aktivity superoxid-dismutázy *L. migratoria* po působení parakvatu. Hodnoty koncentrace jsou uvedeny v jednotkách pM.



**Obr. 24:** Změny transkripční aktivity katalázy u *L. migratoria* po působení parakvatu. Hodnoty koncentrace jsou uvedeny v jednotkách pM.

### 4.3 Statistické vypracování výsledků

Průkaznost výsledků byla vyhodnocena pomocí statistické analýzy dat. Výsledné hodnoty pro *D. melanogaster* (Tab. 3 a 4) a pro *L. migratoria* (Tab. 5) jsou znázorněny níže.

**Tab. 3:** Statistické vyhodnocení výsledků enzymatické aktivity SOD a CAT u *M. melanogaster*.

<i>D. melanogaster</i>						
Enzymatická aktivita						
	SOD			CAT		
	♀♂	♂	♀	♀♂	♂	♀
parakvat	t-test	t-test	t-test	t-test	t-test	t-test
koncentrace (nmol)	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
0,00025	<i>p</i> = 0,0453*	<i>p</i> = 0,1961	<i>p</i> = 0,0795		<i>p</i> = 0,0315*	<i>p</i> = 0,0124*
0,0025	<i>p</i> = 0,0289*	<i>p</i> = 0,4157	<i>p</i> = 0,2358		<i>p</i> = 0,0232*	<i>p</i> = 0,0739
0,025	<i>p</i> = 0,0026**	<i>p</i> = 0,0401*	<i>p</i> = 0,2903		<i>p</i> = 0,1065	<i>p</i> = 0,061*
0,25	<i>p</i> = 0,0127*	<i>p</i> = 0,2302	<i>p</i> = 0,0792	<i>p</i> = 0,0092**	<i>p</i> = 0,0328*	<i>p</i> = 0,2401
2,5	<i>p</i> = 0,1626	<i>p</i> = 0,0611	<i>p</i> = 0,1258	<i>p</i> = 0,178	<i>p</i> = 0,306	<i>p</i> = 0,2566
25	<i>p</i> = 0,0193*			<i>p</i> = 0,699		

\*  $p < 0,005$ , tj. průkazné

\*\*  $p < 0,001$ , tj. vysoce průkazné

**Tab. 4:** Statistické vyhodnocení výsledků enzymatické a transkripční aktivity SOD a CAT u *D. melanogaster*.

<i>D. melanogaster</i>				
Transkripční aktivita				
	SOD		CAT	
	♂	♀	♂	♀
parakvat	t-test	t-test	t-test	t-test
koncentrace (nmol)	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
0,00025	<i>p</i> = 0,0089**	<i>p</i> = 0,0446*	<i>p</i> = 0,0059*	<i>p</i> = 0,0647
0,0025	<i>p</i> = 0,0672	<i>p</i> = 0,0487*	<i>p</i> = 0,2306	<i>p</i> = 0,0055**
0,025	<i>p</i> = 0,1070	<i>p</i> = 0,0305*	<i>p</i> = 0,1124	<i>p</i> = 0,0499*
0,25	<i>p</i> = 0,2970	<i>p</i> = 0,0075**	<i>p</i> = 0,3944	<i>p</i> = 0,0569
2,5	<i>p</i> = 0,0313*	<i>p</i> = 0,1614	<i>p</i> = 0,2231	<i>p</i> = 0,1503
25	<i>p</i> = 0,344*		<i>p</i> = 0,0603	<i>p</i> = 0,1231

\*  $p < 0,005$ , tj. průkazné

\*\*  $p < 0,001$ , tj. vysoce průkazné

**Tab. 5:** Statistické vyhodnocení výsledků transkripční aktivity SOD a CAT u *L. migratoria*.

<i>L. migratoria</i>				
	Transkripční aktivita		Enzymatická aktivita	
	SOD	CAT		SOD
parakvat	t-test	t-test	parakvat	t-test
koncentrace (pmol)	<i>p</i>	<i>p</i>	koncentrace (pmol)	<i>p</i>
400	<i>p</i> = 0,4136	<i>p</i> = 0,0499*	800	<i>p</i> = 0,0022**
800	<i>p</i> = 0,1344	<i>p</i> = 0,0047**	200 000	<i>p</i> = 0,0386*

\*  $p < 0,005$ , tj. průkazné

\*\*  $p < 0,001$ , tj. vysoce průkazné

## 5 Diskuse

Tato bakalářská práce je zaměřena na vyhodnocení enzymatické a transkripční aktivity antioxidantních enzymů superoxiddismutázy a katalázy u *D. melanogaster* a *L. migratoria* při zvýšeném oxidativním stresu a na jejich rozdíly v závislosti na pohlaví.

Účinky oxidativního stresu vyvolané parakvatem byly zkoumány v řadě studií, a to z hlediska jeho vlivu na antioxidantní obranu (Mockett et al., 1999; Rzezniczak et al., 2011), mortalitu (Rzezniczak et al., 2011; Wang et al., 2001), na sledování lokomoční aktivity (Inamdar et al., 2012; Koh et al., 2006), délku života (Vettraino et al., 2001) či reprodukci (Wang et al., 2001). Dle dostupných studií se míra mortality při použití například 10 mM parakvatu v 1-5 % sacharóze pohybuje během 48 hodin od 46 do 64 % (Seto et al., 1990; Rzezniczak et al., 2011; Phillips et al., 1989; Zou et al., 2000) s maximálním přežitím 3,5 – 4,4 dní (Inamdar et al., 2012). Intenzita letálních účinků parakvatu může být ovlivněna faktory, jako je charakter nosného média, kdy např. mortalita u much, krmených roztokem 10 mM parakvatu se sacharózou, byla srovnatelná s 30 mM parakvatem v kukuřično-melasovém médiu (Rzezniczak et al., 2011) či stářím testovaných jedinců (Peng et al., 2012; Minois, 2001). Dále lze uvažovat o environmentálních vlivech a především o vlivu pohlaví (Le Bourg a Fournier, 2004; Minois, 2001) a skrytých genetických faktorech v genetickém pozadí testovaných jedinců. Stejně jako i u dalších stresových podmínek, byla k parakvatu prokázána vyšší citlivost samčího pohlaví (Minois, 2001; Lushchak, 2011). Nicméně doposud žádná publikace nenabídla informaci o tom, jestli míra působení parakvatu může být ovlivněna také vzájemnou interakcí pohlaví. U samců, kteří byli drženi izolovaně od samic, má studie potvrdila vyšší citlivost k působení parakvatu, a to jak z hlediska mortality, tak i z hlediska nárůstu aktivity SOD (samci vykázali nejvyšší nárůst aktivity SOD při koncentracích 100x nižších než tomu bylo u samic). A krom toho mé výsledky naznačují, že účinky parakvatu mohou být skutečně odlišné, pokud jsou při působení parakvatu pohlaví držena pospolu či nikoliv. Zejména z výsledků mortality je patrné, že interakce obou pohlaví zvyšuje negativní dopad parakvatu, a to na jedince obou pohlaví, nicméně s výjimkou samců v průběhu období 18-37 hodin po iniciaci interakce. Zvýšená mortalita u společně držných much přináší důkaz toho, že zvýšená aktivita SOD, pozorovaná u těchto much, je spíše známkou stresu než benefitní reakcí získanou vzájemnou interakcí. Mimoto pro zvýšenou míru stresu hovoří také zvýšené hladiny SOD již při koncentracích  $25 \times 10^{-5}$  až  $25 \times 10^{-3}$  a naopak náhlý pokles u vyšších koncentrací. Nicméně o důvodech pozorovaných změn lze bez přidružených behaviorálních studií jen

stěží spekulovat. Rovněž by bylo třeba provést další experimenty zaměřené na mortalitu much při podmínkách, které by umožnily sledovat možný vliv časové délky interakce much a rovněž jejich stáří.

Aktivita superoxiddismutázy a katalázy při působení parakvatu byla studována v několika dosavadních publikacích. Tyto studie, na rozdíl od mé bakalářské práce, pracovaly pouze s poměrně úzkým rozsahem koncentrací parakvatu, tj. od 5 do 40 mM (Rzezniczak et al., 2011; Mockett et al., 1999; Peng et al., 2012), kdy byl nalézán nepatrný nárůst aktivity superoxiddismutázy či naopak pokles aktivity obou enzymů. V mé bakalářské práci jsem testovala rozsah koncentrací od  $25 \times 10^{-5}$  do 25 mM a v porovnání s publikovanými výsledky je zřejmé, že se nárůst aktivity antioxidantních enzymů v určitých koncentracích liší, což můžeme vysvětlit rozdílností pracovních postupů, použitého materiálu a zejména genetickou rozdílností použitých much. V případě SOD mohou také konstatovat, že předcházející studie použily příliš vysoké dávky parakvatu, které vedly, v porovnání s nízkými dávkami v mé studii, pouze k nepatrnému nárůstu aktivity SOD (Rzezniczak et al., 2001). Ze získaného profilu enzymatické aktivity u superoxiddismutázy a katalázy, které přináší má studie, je zřejmý posun, kdy dochází k nárůstu/poklesu či k maximu v aktivitě obou enzymů. Tento jev lze přičíst dvěma faktům, vycházejícím z funkce katalázy. Zaprvé, že funkce katalázy závisí do jisté míry na funkci SOD, která dismutací radikálu superoxidu vytváří peroxid vodíku, jenž je výchozím substrátem pro katalázu. A zadruhé, že aktivita enzymu katalázy je zahájena až při koncentracích  $H_2O_2$  vyšších než  $10^{-6}$  M (Cohen a Hochstein, 1963).

Jako další marker oxidativního stresu byla vyhodnocována transkripční aktivita antioxidantních enzymů superoxiddismutázy a katalázy. U kontrolních vzorků obou enzymů byla transkripční hladina samců cca 10x vyšší než u samic. Nelze s určitostí tvrdit, že pozorovaný rozdíl je odezvou rozdílné citlivosti k parakvatu. Jak bylo prokázáno, samčí a samičí genomy mohou vykazovat značné rozdíly v transkripční aktivitě celé řady genů, a to tím, že téměř polovina genomu projevuje výrazně odlišnou hladinu transkripce vzhledem k pohlaví a s tím, že to jsou právě geny, kódující oxidoreduktázy, které jsou více regulovány u samců než samic (Harbison et al., 2005). Zatímco u samců byly hodnoty při působení parakvatu z jednotlivých opakování nesourodé a tím jakékoliv změny neprůkazné, u samic jsou hodnoty průkazné a jejich změny víceméně kopírují trend ve změně enzymatické aktivity. Jak u samic, tak u samců můžeme konstatovat, že téměř u všech testovaných vzorků byl zjištěn nárůst aktivity vzhledem ke kontrolním vzorkům.

Ze získaných výsledků vyplývá, že změna aktivity antioxidantních enzymů je na transkripční úrovni mnohem výraznější, než na úrovni enzymatické. Z toho lze usuzovat, že změny transkripční aktivity, jsou citlivějším markerem pro vyhodnocování oxidačního stresu.



## **6 Závěr a perspektiva výzkumu**

Ve své bakalářské práci jsem potvrdila vliv oxidativního stresu, indukovaného parakvatem na antioxidační enzymy superoxiddismutázu a katalázu, a to jak na enzymatické, tak transkripční úrovni. Významnost práce, především ve vztahu k odborné veřejnosti, lze spatřovat zejména ve dvou bodech. Jednak se podařilo poukázat na problém využívání příliš vysokých dávek parakvatu v kombinaci s vyhodnocováním antioxidačních enzymů jako markerů oxidativního stresu a zadruhé se podařilo identifikovat dosud neprokázaný aspekt při působení parakvatu na drozofilu, a to vliv vzájemné interakce pohlaví. Má práce prokázala, že s ohledem k výsledkům mortality a aktivity superoxiddismutázy, společné soužití jedinců obou pohlaví zvyšuje citlivost k působení parakvatu, tedy s velkou pravděpodobností citlivost k oxidativnímu stresu. Nicméně pro objasnění skutečných příčin této zvýšené citlivosti je třeba studii doplnit o dodatečné experimenty, jako jsou behaviorální studie, studie detailněji zaměřené na antioxidační změny u jednotlivých pohlaví, experimenty s jinými oxidativními stres-indukujícími látkami a experimenty zaměřené na vliv stáří.

## 7 Použitá literatura

- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. (2001) "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." *Biochemical Journal* 357.Pt 3: 593- 615.
- Arking R, Buck S, Berrios A, Dwyer S, Baker GT. (1991) "Elevated paraquat resistance can be used as a bioassay for longevity in a genetically based long-lived strain of *Drosophila*." *Developmental genetics* 12.5: 362-370.
- Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee RK. (1999) "Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis." *Current Science* 77.5: 658-666.
- Berlett BS, Stadtman ER. (1997) "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress." *Journal of Biological Chemistry* 272.33: 20313-20316.
- Blum J, Fridovich I. (1985) "Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 240.2: 500-508.
- Cohen G, Hochstein P. (1963) " Glutathione peroxidase: The primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. " *Biochemistry* 2: 1420-1428.
- Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. (1992) "Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89.21: 10405-10409.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. (2006) "Biomarkers of oxidative damage in human disease." *Clinical chemistry* 52.4: 601-623.
- Dinis-Oliveira RJ, Remiao F, Carmo H, Duarte JA, Navarro AS, Bastos ML, Carvalho F. (2006) "Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease." *Neurotoxicology* 27.6: 1110-1122.
- Drew B, Leeuwenburgh C. (2002) "Aging and the role of reactive nitrogen species." *Annals of the New York Academy of Sciences* 959.1: 66-81.
- Fenton HJH. (1894) "LXXIII. Oxidation of tartaric acid in presence of iron." *Journal of the Chemical Society, Transactions* 65: 899-910.
- Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. (2009) "Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history." *Dynamic Medicine* 8.1: 1.
- Fridovich I. (1997) "Superoxide Anion Radical ( $O_2^-$ ), Superoxide Dismutases, and Related Matters." *Journal of Biological Chemistry* 272.30: 18515-18517.
- Goldberg I, Hochman A. (1989) "Three different types of catalases in *Klebsiella pneumoniae*." *Archives of biochemistry and biophysics* 268.1: 124-128.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (1989) "Free radicals in biology and medicine." 2nd ed., Clarendon Press, Oxford, England 129-130.

- Harbison ST, Chang S, Kamdar KP, Mackay TFC (2005) "Quantitative genomics of starvation stress resistance in *Drosophila*." *Genome biology* 6.4: 36.
- Harman D. (1956) " Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." *The journal of gerontology* 11, 298-300.
- Hensley K, Floyd RA. (2002) "Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: a look back, a look ahead." *Archives of biochemistry and biophysics* 397.2: 377-383.
- Holeček V, Rokyta R. (2005) " Volně radikálová teorie stárnutí." *Česká geriatrická revue* 3(1).
- Chen QM, Bartholomew JC, Campisi J, Acosta M, Reagan JD, Ames BN. (1998) "Molecular analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication." *Biochemical Journal* 332.Pt 1: 43-50.
- Ikebuchi Y, Masumoto N, Tasaka K, Koike K, Kasahara K, Miyake A, Tanizawa O. (1991) "Superoxide anion increases intracellular pH, intracellular free calcium, and arachidonate release in human amnion cells." *Journal of Biological Chemistry* 266.20 13233-13237.
- Inamdar AA, Chaudhuri A, O'Donnell J. (2012) "The Protective Effect of Minocycline in a Paraquat-Induced Parkinson's Disease Model in *Drosophila* is Modified in Altered Genetic Backgrounds." *Parkinson's disease*.
- Jenner P. (2003) "Oxidative stress in Parkinson's disease." *Annals of neurology* 53.3: 26-38.
- Johnston RB, Keele BB, Misra HP, Lehmeyer JE, Webb LS, Baehner RL, Rajagopalan KV. (1975) "The role of superoxide anion generation in phagocytic bactericidal activity. Studies with normal and chronic granulomatous disease leukocytes." *Journal of Clinical Investigation* 55.6: 1357 - 1372.
- Jones DP. (2008) "Radical-free biology of oxidative stress." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 295.4: C849-C868.
- Keller GA, Warner TG, Steimer KS, Hallewell RA. (1991) "Cu, Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88.16 7381-7385.
- Kirkman HN, Gaetani GF. (1984) "Catalase: A tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81.14: 4343-4347.
- Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J, Stevenson DE, Walborg EF. (1998) "The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis." *Environmental health perspectives* 106.Suppl 1: 289-295.

- Koh K, Evans JM, Hendricks JC, Sehgal A. (2006) "A *Drosophila* model for age-associated changes in sleep: wake cycles." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.37: 13843-13847.
- Le Bourg É, Fournier D. "Is lifespan extension accompanied by improved antioxidant defences? A study of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster* flies that lived in hypergravity at a young age." *Biogerontology* 5.4 (2004): 261-266.
- Liu Y, Fiskum G, Schubert D. (2002) "Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain." *Journal of neurochemistry* 80.5: 780-787.
- Lloyd RV, Hanna PM, Mason RP. (1997) "The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction." *Free radical biology and medicine* 22.5: 885-888.
- Loew O. (1900) "A new enzyme of general occurrence in organisms. A preliminary note." *Science* 11: 701-702.
- Lushchak OV, Rovenko BM, Gospodaryov DV, Lushchak VI (2011) "*Drosophila melanogaster* larvae fed by glucose and fructose demonstrate difference in oxidative stress markers and antioxidant enzymes of adult flies." *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology* 160.1: 27-34.
- Mann T, Keilin D. (1938) "Haemocuprein and hepatocuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 126.844: 303-315.
- Markesbery WR. (1997) "Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease." *Free radical biology & medicine* 23.1: 134-147.
- Marounek M. (2006) "Povaha a mechanismus účinku antioxidantů, význam ve výživě zvířat a lidí. *Studie - Vědecký ústav živočišné výroby Praha.*
- McCord JM, Fridovich I. (1988) "Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988)." *Free radical biology & medicine* 5.5-6: 363.
- McCormack, AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, Di Monte DA. (2002) "Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat." *Neurobiology of disease* 10.2: 119-127.
- Meir E, Yagil E. (1985) "Further characterization of the two catalases in *Escherichia coli*." *Current Microbiology* 12.6: 315-319.
- Miller AF. (2012) "Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights." *FEBS letters* 586.5: 585-595.
- Minois N. "Resistance to stress as a function of age in transgenic *Drosophila melanogaster* overexpressing Hsp70." *Journal of Insect Physiology* 47 (2001): 1007-1012.

- Miwa S, Brand MD. (2005) "The topology of superoxide production by complex III and glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Drosophila* mitochondria." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1709.3: 214-219.
- Miwa S, Muller FL, Beckman KB. (2008) "The basics of oxidative biochemistry." *Oxidative Stress in Aging*. Humana Press, 11-35.
- Mockett RJ, Sohal RS, Orr WC. (1999) "Overexpression of glutathione reductase extends survival in transgenic *Drosophila melanogaster* under hyperoxia but not normoxia." *The FASEB journal* 13.13: 1733-1742.
- Mueller S, Millonig G, Waite GN. (2009) "The GOX/CAT system: a novel enzymatic method to independently control hydrogen peroxide and hypoxia in cell culture." *Advances in medical sciences* 54.2: 121-135.
- Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. (2004) "Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane." *Journal of Biological Chemistry* 279.47: 49064-49073.
- Ovanovic SV, Clement D, MacLeod K. (1998) "Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome." *Free Radical Biology and Medicine* 25.9: 1044-1048.
- Passardi F, Zamocky M, Favet J, Jakopitsch C, Penel C, Obinger C, Dunand C. (2007) "Phylogenetic distribution of catalase-peroxidases: Are there patches of order in chaos?." *Gene* 397.1: 101-113.
- Peng C, Zuo Y, Kwan KM, Liang Y, Ma K, Chan HYE, Huang Y, Yu H, Chen ZY. (2012) "Blueberry extract prolongs lifespan of *Drosophila melanogaster*." *Experimental gerontology* 47.2: 170-178.
- Peschek GA, Obinger C, Renger G. (2011) "Bioenergetic processes of Cyanobacteria: From evolutionary singularity to ecological diversity". Springer, London.
- Racek J, Holeček V. (1999) " Enzymy a volné radikály." *Chem. Listy* 93,11A – 780.
- Ray S, Sengupta A, Ray A. (2007) "Effects of paraquat on anti-oxidant system in rats." *Indian journal of experimental biology* 45.5: 432-438.
- Reddy JK, Reddy MK, Usman M, Lalwani ND, Rao MS. (1986) "Comparison of hepatic peroxisome proliferative effect and its implication for hepatocarcinogenicity of phthalate esters, di(2-ethylhexyl)phthalate, and di(2-ethylhexyl)adipate with a hypolipidemic drug." *Environmental health perspectives* 65: 317-327.
- Rzezniczak TZ, Douglas LA, Watterson, Merritt TJS. (2011) "Paraquat administration in *Drosophila* for use in metabolic studies of oxidative stress." *Analytical biochemistry* 419.2: 345-347.

- Seto NO, Hayashi S, Tener GM. (1990) "Overexpression of Cu-Zn superoxide dismutase in *Drosophila* does not affect life-span." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87.11: 4270-4274.
- Sies H. (1997) "Oxidative stress: oxidants and antioxidants." *Experimental physiology* 82.2:291-295.
- Storey KB. (2004) "Functional metabolism: Regulation and adaptation." John Wiley & Sons, Inc. New Jersey.
- Suman S, Seth RK, Chandna S. (2009) "Mitochondrial antioxidant defence in radio-resistant *Lepidopteran* insect cells." *Bioinformatics* 4.1: 19-23.
- Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. (1995) "Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction." *Science* 270.5234: 296-299.
- Sykes AG. (2001) "Advances in inorganic chemistry." Volume 51. Academic Press.
- Tower J. (1996) "Aging mechanisms in fruit flies." *BioEssays* 18.10: 799-807.
- Vettraino J, Buck S, Arking R. (2001) "Direct selection for paraquat resistance in *Drosophila* results in a different extended longevity phenotype." *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 56.10: 415-425.
- Vijaya Kumar S, Saritha G, Fareedullah MD. (2010) "Role of antioxidants and oxidative stress in cardiovascular diseases." *Annals of Biological Research* 1.3: 158-173.
- von Zglinicki T. (2000) "Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence." *Annals of the New York Academy of Sciences* 908.1: 99-110.
- Wang, Y, Salmon AB, Harshman LG. (2001) "A cost of reproduction: oxidative stress susceptibility is associated with increased egg production in *Drosophila melanogaster*." *Experimental gerontology* 36.8: 1349-1359.
- Wei YH, Lee HC. "Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging." *Experimental biology and medicine* 237(2002): 671-682.
- Wesseling C, Van Wendel De Joode B, Ruepert C, León C, Monge P, Hermosillo H, Partanen LJ (2001) "Paraquat in developing countries." *International journal of occupational and environmental health* 7.4: 275-286.
- Youn HD, Kim EJ, Roe JH, Hah YC, Kang, SO. (1996) "A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces spp.*" *Biochemical Journal* 318.Pt 3: 889-896.
- Zámocký M. (1998) "Spektroskopické a enzymologické vlastnosti kvasinkovej peroxidázovej katalázy." *Chemické listy* 92: 875 – 882.

Zou S, Meadows S, Sharp L, Jan LY, Jan YN (2000) "Genome-wide study of aging and oxidative stress response in *Drosophila melanogaster*." Proceedings of the National Academy of Sciences 97.25: 13726-13731.

## 8 Přílohy

### Izolace celkové RNA

Pro izolaci RNA z *D. melanogaster* byl použit kit NucleoSpin RNA II od firmy Macherey-Nagel. Nejprve zhomogenizujeme vzorek a to ve zkumavce spolu s 350  $\mu$ l roztoku RA1 a 3,5  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoetanolu a zkumavku důkladně zvortexujeme. K vyčištění roztoku použijeme mikrozukavku s filtrem, která je součástí kitu (mikrozukavka s fialovým kroužkem na hrdle). Vzorek poté centrifugujeme 1 minutu při 11 000 otáčkách za minutu. Filtr odstraníme a k supernatantu přidáme 350  $\mu$ l 100% etanolu a roztok promícháme pipetováním. Následně roztok nepipetujeme do nové mikrozukavky, která je opět součástí kitu (mikrozukavka s modrým kroužkem na hrdle). Centrifugujeme po dobu 30 sekund a to při 11 000 otáčkách za minutu. Filtr následně přendáme do nové mikrozukavky a připipetujeme 350  $\mu$ l roztoku MDB (Membrane Desalting Buffer) a opět centrifugujeme 1 minutu při 11 000 otáčkách za minutu.

Dále si připravíme reakční směs DNázy. Do sterilní mikrozukavky napipetujeme pro každou reakci 10  $\mu$ l rDNázy a 90  $\mu$ l reakčního pufru pro rDNázu. Mícháme převrácením mikrozukavky. Ke každému vzorku následně přidáme 95  $\mu$ l této směsi, kterou napipetujeme po celém filtru a necháme stát 15 minut při pokojové teplotě.

Následuje promývání membrány. Na filtr napipetujeme 200  $\mu$ l pufru RA2 a centrifugujeme 30 sekund při 11 000 otáčkách za minutu. Supernatant vylijeme a filtr umístíme do nové mikrozukavky a přidáme 600  $\mu$ l pufru RA3 a znovu centrifugujeme za stejných podmínek. Kapalinu odstraníme a filtr umístíme zpět do mikrozukavky. Dále přidáme 250  $\mu$ l pufru RA3 a centrifugujeme po dobu 2 minut při stejných podmínkách jako v předchozím kroku. Tím se membrána vysuší.

Kolonku umístíme do nové „nuclease-free“ mikrozukavky o objemu 1,5 ml. Napipetujeme 60  $\mu$ l „RNase-free“ vody a centrifugujeme 1 minutu při 11 000 otáčkách za minutu. Vyizolovanou RNA uchováváme při teplotě -80 °C.

### Syntéza cDNA SMARTScribe TM reverzní transkriptázou

Pro syntézu cDNA používáme kit Super Script III First-Strand od firmy Clontech. Nejprve si vytvoříme mix, který obsahuje 0,2 – 2  $\mu$ g celkové RNA, 0,5  $\mu$ l oligo dT (50  $\mu$ M) a doplníme „RNase-free“ vodou do 5  $\mu$ l. Směs zahřejeme na teplotu 72 °C po dobu 3 minut a pak vzorek neprodleně přeneseme na led, kde jej inkubujeme alespoň 2 minuty. Poté ke vzorku přidáme mix 2  $\mu$ l 5x First-Strand Buffer, 1  $\mu$ l DTP mixu a 1  $\mu$ l 20 mM DTT a



centrifugujeme. Jemně promícháme pipetou a přidáme 1  $\mu\text{l}$  (100 U/ $\mu\text{l}$ ) SmartScribe RT a opět opatrně promícháme. Roztok poté inkubujeme při teplotě 42 °C po dobu 90 minut. Reakci ukončíme zahřátím směsi na teplotu 70 °C po dobu 15 minut.

### Determinace peroxidů vodných roztoků

Pro determinaci peroxidů vodných roztoků používáme kit PeroxiDetect Kit od firmy Sigma. Nejprve připravíme pracovní roztoky. Jako první namícháme 100  $\mu\text{M}$  hydrogen peroxidový standard. Zásobní 30% roztok hydrogen peroxidu naředíme tak, abychom získali koncentraci 10 mM. Poté determinujeme přesnou koncentraci 10 mM hydrogen peroxidu absorbcí při 240 nm. Absorbance  $A_{240}$  10 mM roztoku je 0,436. Vypočítáme množství 1 mM roztoku a toto množství naředíme 10x pro získání finálního 100  $\mu\text{M}$  roztoku. Pro přípravu Working Color Reagent smícháme Ferrous Ammonium Sulfate Reagent s Aqueous Peroxide Color Reagent v poměru 1:100. Pro vytvoření roztoků standardní křivky  $\text{H}_2\text{O}_2$  z 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  postupujeme dle tabulky.

Tab. 6: Množství objemů reakčních směsí pro vytvoření standardní křivky.

nmoly na reakční objem	$\mu\text{l}$ (100 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ )	$\mu\text{l}$ ( $\text{H}_2\text{O}$ )
0	0	20
1	2	18
2	4	16
4	8	12
6	12	8
8	16	4

Na mikrotitrační destičku napipetujte 20  $\mu\text{l}$  testovaného vzorku pro každou jamku. Ke vzorkům přidáme 200  $\mu\text{l}$  Working Color Reagent, promícháme a při pokojové teplotě inkubujeme po dobu 30 min.

Absorbanci vyhodnocujeme při 560 nm, za použití  $\text{H}_2\text{O}$  jako blanku. Pokud je signál příliš vysoký, absorbanci vyhodnotíme při 590 nm. Z naměřených absorbcí připravíme standardní křivku a odečteme množství nmolů testovaného  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Množství nmolů  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{ml}$  lze vypočítat dle vztahu:

$$\text{nmol } \text{H}_2\text{O}_2/\text{ml} = \frac{[A_{560}(\text{vzorku}) - A_{560}(\text{blank})] \times \text{ředící faktor}}{[A_{560}(1 \text{ nmol peroxidu})] \times \text{objem vzorku(ml)}}$$

### **Vyhodnocení aktivity katalázy**

Pro vyhodnocení enzymatické aktivity katalázy používáme kit Amplex Red Catalase Assay od firmy Invitrogen. Nejprve si nachystáme zásobní roztoky. Pro přípravu 10 mM roztoku Amplex Red Reagent necháme vytemperovat Amplex Red Reagent a Dimethylsulfoxid (DMSO) na pokojovou teplotu. Poté 0,26 mg Amplex Red Reagent rozpustíme ve 100  $\mu$ l DMSO. Dále si připravíme 1x pracovní roztok Reaction Buffer a to ze 4 ml 5x Reaction Buffer stock solution a 16 ml dH<sub>2</sub>O. Pro přípravu 100 U/ml roztoku Horseradish Peroxidase (HRP) rozpustíme obsah vialky HRP ve 200  $\mu$ l 1x Reaction Buffer (z tohoto roztoku připravíme aliquoty, které uchováváme při teplotě -20 °C). A v neposlední řadě připravíme 1000 U/ml roztok katalázy, kdy rozpustíme obsah vialky katalázy ve 100  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O (po použití uděláme aliquoty a ty umístíme do -20°C).

Nejprve smícháme 5  $\mu$ l vzorku s 20  $\mu$ l 1x Reaction Buffer. Pro přípravu vzorků standardní křivky naředíme roztok katalázy (1000 U/ml) spolu s 1x Reaction Buffer tak, abychom získali získání sérii šesti ředění o koncentracích 0 – 4 U/ $\mu$ l.

Testované vzorky, vzorky standardní křivky a kontroly nanese na 96-jamkovou destičku, a to po 25  $\mu$ l na jamku. Připravíme si 40  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> roztoku smícháním 1  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 42,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, který důkladně zortexujeme. Roztok připraveného 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o objemu 10  $\mu$ l smícháme s 4,99 ml 1x Reaction Buffer. 25  $\mu$ l připraveného roztoku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nanese ke vzorkům na destičce a inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě. Dále si připravíme Amplex Red Reagentu, kdy pro přípravu jedné reakce smícháme 49,3  $\mu$ l 1x Reagent Buffer, 0,5  $\mu$ l Amplex Red a 0,2  $\mu$ l HRP. Nanese 50  $\mu$ l připraveného Amplex Red Reagentu ke vzorkům na destičce a znovu inkubujeme minimálně 30 minut při teplotě 37 °C (chráníme před světlem). K vyhodnocení fluorescence nebo absorbance v microplate reader využíváme excitaci v rozsahu 530 – 560 nm a detekci emise při 590 nm nebo vyhodnocení absorbance při 560 nm. Pro zaznamenání změny fluorescence nebo absorbance odečteme hodnoty vzorku od negativní kontroly, tj. vzorku bez katalázy.

## Vyhodnocení aktivity superoxididismutázy

K vyhodnocení aktivity superoxididismutázy používáme SOD Assay Kit od firmy Sigma. Připravíme si ředící řadu vzorků o ředění 5, 10 a 20x. Dále vyrobíme WST pracovní roztok smícháním WST Solution s Buffer Solution v poměru 1:19. Pro přípravu enzymatického roztoku potřebujeme Enzym Solution, který centrifugujeme po dobu 5 sekund a promícháme pipetováním. Poté enzym smícháme s Dilution Buffer v poměru 1:166. Jako kontrolu správnosti reakce smícháme 1  $\mu\text{l}$  ze zásobního roztoku SOD o koncentraci 0,001 U/ $\mu\text{l}$  spolu s 1000  $\mu\text{l}$  Dilution Buffer.

Pro každé ředění a SOD kontrolu připravíme reakci, kdy napipetujeme 20  $\mu\text{l}$  testovaného vzorku nebo 20  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O (pro blank 1 a 3) na 96-jamkovou destičku. Dále přidáme 200  $\mu\text{l}$  WST pracovního roztoku a 20  $\mu\text{l}$  enzymatického roztoku. Pro blank 3 použijeme namísto enzymatického roztoku 20  $\mu\text{l}$  Dilution Buffer. Vše důkladně promícháme a inkubujeme při teplotě 37 °C, 20 min.

Absorbanci změříme při 450 nm pomocí microplate reader či na spektrofotometru a vyhotovíme kalibrační křivku. Vypočítáme procentuelní míru inhibice reakce (danou přítomností SOD) ze vzorce, kde A je absorbance.

$$\text{Inhibice (\%)} = \{[(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{Test}} - A_{\text{blank Test}})] / (A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})\} \times 100.$$