



**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ - ΑΜΑΛΙΑΔΑ**  
**(πρώην Τμήμα Τεχνολόγων Γεωπόνων)**



**Πτυχιακή Εργασία**

**Μέθοδοι εκτίμησης του οξειδωτικού στρες και η εφαρμογή τους σε φυτικούς ιστούς**

Νικολοπούλου Κωνσταντίνα Α.Μ. 11869

Κουκουλάρη Εμμανουέλα Α.Μ. 11637

**Επιβλέπων Καθηγητής**

Ζερβουδάκης Γεώργιος

**ΑΜΑΛΙΑΔΑ, 2020**

## Περιεχόμενα

Εισαγωγή.....	<b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>
Γενικά.....	2
Οξειδωτικό stress .....	<b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>
Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS).....	4
Ελεύθερες ρίζες.....	<b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>
Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	6
Οι επιπτώσεις του Οξειδωτικού Stress .....	7
Αντιοξειδωτικές ουσίες.....	8
Αντιοξειδωτικά ένζυμα .....	9
Υπεροξειδάσες .....	9
Σκοπός της εργασίας.....	<b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>
Υλικά και Μέθοδοι .....	<b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>
Φυτά και δειγματοληψία .....	<b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>
Προσδιορισμός της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης.....	<b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>
Αποτελέσματα και Παρατηρήσεις.....	15
Συζήτηση – Συμπεράσματα .....	18
Βιβλιογραφία .....	19

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **Γενικά**

Η λέξη «στρες» (stress ή καταπόνηση στα ελληνικά) χρησιμοποιείται πολύ συχνά στη βιολογία των φυτών αλλά οι ερμηνείες διαφέρουν ως προς την ακριβή έννοια της. Ένας ορισμός της είναι η φυσιολογική απόκριση που προκαλείται από κάποιον περιβαλλοντικό παράγοντα ο οποίος περιορίζει την αύξηση, την αναπαραγωγή, την απόδοση της παραγωγής, την ποιότητά της ή άλλα χαρακτηριστικά μιας καλλιέργειας.

Πολλές φορές, οι συνέπειες της καταπόνησης εξακολουθούν να υφίστανται για μεγάλο χρονικό διάστημα ακόμη και μετά την κατάργηση των περιβαλλοντικών συνθηκών που την προκάλεσαν. Πιθανές αιτίες για αυτές τις διαρκείς συνέπειες είναι:

- 1) παραγωγή νέων κυτταρικών συστατικών (βιομάζα) για την ενίσχυση της άμυνας του φυτού
- 2) βλάβες των κυτταρικών συστατικών οι οποίες χρειάζονται χρόνο για να επιδιορθωθούν
- 3) αργή αντιστρεψιμότητα διαδικασιών όπως π.χ. η αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης, που είναι επιφορτισμένες για την επιβίωση και συνεπώς πιο σημαντικές από την αύξηση.

Οι παραπάνω μηχανισμοί θεωρούνται από τους επιστήμονες, ως οι αρνητικές επιδράσεις του stress στη λειτουργία των φυτών. Αν κατανοήσουμε βαθύτερα τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν τα φυτά μπορούμε να πετύχουμε την ποσοτική και ποιοτική βελτίωση των καλλιεργειών, όμως για την ανάπτυξη σχεδιασμένων στρατηγικών είναι αναγκαίο να κατανοηθούν και οι βιολογικοί μηχανισμοί των φυτών που βρίσκονται υπό την επίδραση του στρες (Ντίνου και Σουφλάκη, 2013).



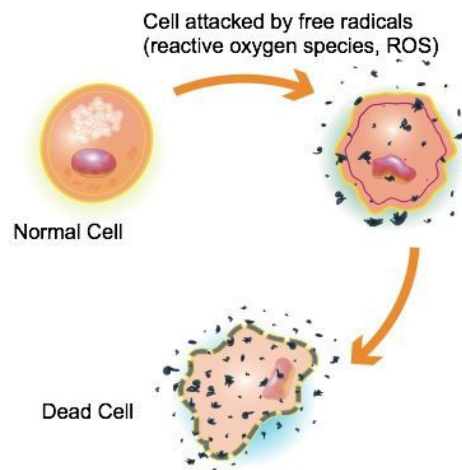
**Εικόνα 1:** Φυτό υπό καταπόνηση

[http://www.missouribotanicalgarden.org/Portals/0/Gardening/Gardening%20Help/images/Pests/Drought\\_Stress1921.jpg](http://www.missouribotanicalgarden.org/Portals/0/Gardening/Gardening%20Help/images/Pests/Drought_Stress1921.jpg)

### **Οξειδωτικό stress**

Εδώ και αρκετά χρόνια είχε προταθεί ότι οι τοξικές επιδράσεις του  $O_2$  σε συνδυασμό με την ιονίζουσα ακτινοβολία μπορούσαν να αποδοθούν στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών (free radicals) οξυγόνου. Από τότε, η διαρκής έρευνα στο πεδίο της βιοχημείας, απέδειξε την πολύπλοκη συμμετοχή των ελευθέρων ριζών στο μεταβολισμό των αερόβιων οργανισμών. Η αναπόφευκτη παρουσία των δραστικών αυτών μορίων στη ζωή των οργανισμών συνδέθηκε τόσο με φυσιολογικές βιοχημικές πορείες και δράσεις όπως η μετάδοση δευτερογενών κυτταρικών σημάτων, οι βιολογικές αντιδράσεις πολυμερισμού, η διαστολή και συστολή των αγγείων, η απόπτωση, όσο και με πλήθος ασθενειών όπως η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση, ο διαβήτης, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η κυστική ίνωση, ο καρκίνος, πολλές νευροεκφυλιστικές και άλλες ασθένειες (Πατσούκης, 2006).

Το οξειδωτικό stress ουσιαστικά είναι μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου και της ικανότητας ενός κυττάρου ή οργανισμού να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούν. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου βλάπτουν όλα τα συστατικά του κυττάρου συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, λιπιδίων και του DNA.



**Εικόνα 2: Ελεύθερες ρίζες που επιτίθενται σε υγιές κύτταρο**

[\(https://bionewscentral.com/cancer-cells-co-opt-pain-sensing-wasabi-receptor-to-survive-oxidative-stress/\)](https://bionewscentral.com/cancer-cells-co-opt-pain-sensing-wasabi-receptor-to-survive-oxidative-stress/)

Το οξειδωτικό stress είναι ουσιαστικά μια ρυθμιζόμενη διαδικασία. Το αμυντικό σύστημα του κυττάρου, υπό φυσιολογικές συνθήκες, παρέχει επαρκή προστασία απέναντι στο δραστικό οξυγόνο και τις ελεύθερες ρίζες. Όμως, τόσο οι φυσικές όσο και οι ανθρωπογενούς προέλευσης καταστάσεις καταπόνησης προκαλούν την αυξανόμενη παραγωγή των τοξικών παραγώγων οξυγόνου. Ως αντίδραση, η ικανότητα του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος αυξάνεται. Όμως, σε άλλες περιπτώσεις η αντίδραση μπορεί να μην είναι ιδιαίτερα ισχυρή.

Συνθήκες καταπόνησης για τα φυτά είναι η έντονη ακτινοβολία, η ατμοσφαιρική και η εδαφική ρύπανση, η έλλειψη νερού, η μεγάλη αλατότητα καθώς και οι προσβολές από παθογόνους οργανισμούς. Τα φυτά τα οποία αναπτύσσονται στον αγρό έρχονται αντιμέτωπα με πολλούς από αυτούς τους παράγοντες που προκαλούν το οξειδωτικό stress. Η ικανότητα προσαρμογής σε αυτές τις καταστάσεις εξαρτάται από το είδος του φυτού. Ορισμένες φορές το οξειδωτικό stress μπορεί να επιδράσει θετικά σε κάποια φυτά, καθώς τους δίνεται η δυνατότητα να αποκτήσουν αντοχές σε κάποια άλλη μορφή καταπόνησης. Άλλες φορές όμως μπορεί να οδηγήσουν σε άλλες μορφές stress.

Τα παραπάνω υποδεικνύουν την ύπαρξη κοινών παραγόντων οι οποίοι εμπλέκονται στις αποκρίσεις απέναντι σε διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης. Ένα κοινό στοιχείο είναι πως σε πολλές περιπτώσεις διαφορετικών καταπονήσεων παρατηρούμε την συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS - Reactive Oxygen Species) με αποτέλεσμα να δημιουργούνται αλλαγές στην κυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση (Χιώτη, 2016).

### **Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)**

Το μόριο του οξυγόνου στη βασική του (μη διεγερμένη) κατάσταση εμπίπτει στον ορισμό της ελεύθερης ρίζας αφού διαθέτει δύο μονήρη (ασύζευκτα) ηλεκτρόνια με ίδιας κατεύθυνσης στροφορμές (spin), που καταλαμβάνουν το καθένα ένα διαφορετικό μοριακό τροχιακό. Η κατανομή αυτή προσδίδει στη δομή του υψηλού βαθμού χημική σταθερότητα, αφού προκειμένου το O<sub>2</sub> να αντιδράσει απευθείας με κάποια ένωση, θα πρέπει η ένωση αυτή να διαθέτει επίσης δύο μονά ηλεκτρόνια με στροφορμή

αντίθετη ως προς αυτή των ασύζευκτων ηλεκτρονίων του  $O_2$ . Ο περιορισμός αυτός, που εξηγεί την αδυναμία του οξυγόνου να προσβάλλει απευθείας τα διάφορα βιολογικά μόρια, μπορεί να αρθεί με το σχηματισμό δραστικότερων παραγώγων του (Πατσούκης, 2006).

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου διακρίνονται στις εξής κατηγορίες

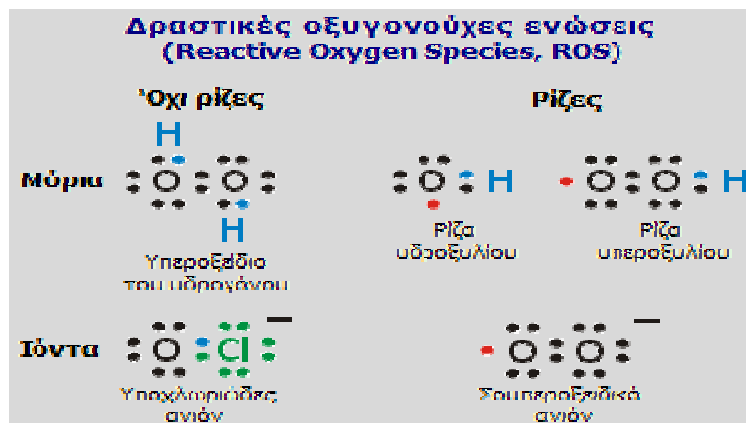
- ελεύθερες ρίζες**, όπως η ρίζα υδροξυλίου ( $\cdot OH$ )
- ιόντα**, όπως το υπερχλωριώδες ανιόν ( $ClO^-$ )
- συνδυασμοί ελευθέρων ριζών και ιόντων**, όπως το ανιόν σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot -}$ )
- μόρια**, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) (Ντίνου και Σουφλάκη, 2013).

Έτσι, οι ROS είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται συχνά από τους επιστήμονες ώστε να συμπεριλάβουν όχι μόνο τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ( $O_2^{\cdot -}$ ,  $\cdot OH$ ), αλλά και ορισμένες μη ρίζες, παράγωγα του  $O_2$  όπως βλέπουμε στον παρακάτω Πίνακα.

ΡΙΖΕΣ	ΜΗ ΡΙΖΕΣ
Υπεροξειδίο, $O_2^{\cdot -}$	Υπεροξειδίο του υδρογόνου, $H_2O_2$
Υδροξύλιο, $\cdot OH$	Υποχλωρικό οξύ, $HOCl$
Περοξύλιο, $RO_2^{\cdot}$	Όζον, $O_3$
Αλκοξύλιο, $RO^{\cdot}$	Μονήρες οξυγόνο, $^1\Delta gO_2$
Υδροπεροξύλιο, $HO_2^{\cdot}$	Περοξεινιτρώδες, $ONOO^-$

(Χιώτη, 2016)





**Εικόνα 3:** Παραδείγματα δραστικών μορφών οξυγόνου ([http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_H2O2.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_H2O2.htm))

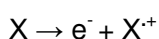
### Ελεύθερες ρίζες

Ελεύθερη ρίζα είναι οποιοδήποτε χημικό μόριο ή άτομο το οποίο υπάρχει ανεξάρτητο και διαθέτει ένα ή περισσότερα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια. Οι ελεύθερες ρίζες είναι ιδιαίτερα ασταθή μόρια διότι τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια μπορούν να αντιδράσουν με διάφορα οργανικά εντός των κυττάρων. Σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι επιβλαβείς για τους οργανισμούς διότι προκαλούν βλάβες σε διάφορα κυτταρικά οργανίδια (Ντίνου και Σουφλάκη, 2013).

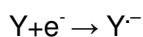
Υπάρχουν πολλές ελεύθερες ρίζες. Η πιο απλή ρίζα θεωρείται το ατομικό υδρογόνο, το οποίο διαθέτει μόνο ένα ηλεκτρόνιο το οποίο είναι ασύζευκτο.

Οι ρίζες μπορούν να δημιουργηθούν από την απώλεια ή την πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου από μία μη ρίζα

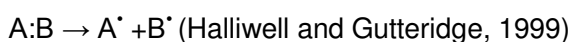
#### Απώλεια Ηλεκτρονίου

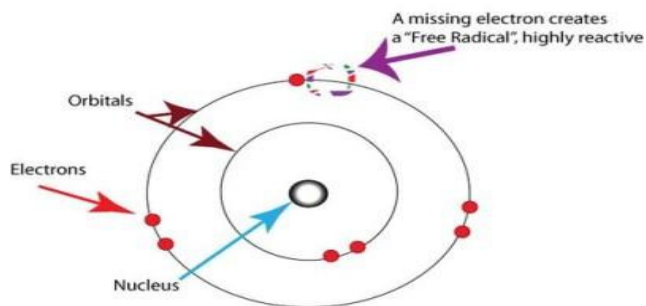


#### Πρόσληψη Ηλεκτρονίου



Ένας άλλος τρόπος σχηματισμού ελεύθερων ριζών είναι η ομολυτική διάσπαση, δηλαδή η διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού που υπάρχει σε μία χημική ένωση, όπου μετά τη διάσπαση ένα ηλεκτρόνιο από το κοινό ζεύγος παραμένει με κάθε άτομο. Για να γίνει αυτό απαιτείται ενέργεια που μπορεί να είναι θερμότητα, ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία ή από διάφορους άλλους τρόπους





**Εικόνα 4:** Μορφή ελεύθερης ρίζας (<https://www.thoughtco.com/definition-of-free-radical-604468>)

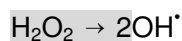
### Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> είναι ένα παχύρευστο υγρό χρώματος ανοιχτού μπλε και με σημείο βρασμού τους 150°C. Είναι τοξικό για τα περισσότερα κύτταρα σε συγκεντρώσεις από 10 έως 100 μM. Διαλύεται εύκολα στο νερό και διαχέεται πολύ εύκολα μέσα στα κύτταρα *in vivo*. Υπάρχουν ένζυμα που υπάρχουν όπως η οξειδάση της ξανθίνης, του ουρικού και των D-αμινοξέων που μπορούν να παράγουν H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Παπαποστόλου, 2007).

Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> είναι το πιο σταθερό μόριο από τις ROS, έχει το μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής και μπορεί να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες γι' αυτό και λειτουργεί ως διακυτταρικό σήμα. Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> που παράγεται σε ένα κύτταρο, υπάρχει πιθανότητα να επηρεάσει την έκφραση γονιδίων καθώς και να ενεργοποιήσει τους αμυντικούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένου και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Αυτό συμβαίνει διότι υπάρχουν συστήματα ανίχνευσης εντός των κυττάρων, τα οποία μπορούν να λάβουν αυτή την πληροφορία και στη συνέχεια να προκαλέσουν τις αντίστοιχες κυτταρικές αποκρίσεις (Μύρτζιου, 2012).

Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> εμφανίζει μικρή δραστηριότητα αλλά πάνω από κάποιες συγκεντρώσεις μπορεί να γίνει τοξικό για τα κύτταρα και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις χρησιμοποιείται και ως αντισηπτικό. Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> διαπερνά εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες και στο εσωτερικό των κυττάρων μπορεί να αντιδράσει με ιόντα σιδήρου ή χαλκού σχηματίζοντας πολύ καταστροφικές ROS, όπως το OH<sup>•</sup>. Οι υδροξυλικές ρίζες είναι αυτές όπου προκαλούν τις περισσότερες καταστροφές στο DNA κυττάρων τα οποία έχουν επωαστεί με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Η μετατροπή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε OH<sup>•</sup>, μπορεί να συμβεί με την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας.

Το φαινόμενο αυτό περιγράφεται από την παρακάτω αντίδραση:



(Παπαποστόλου, 2007)



## **Οι επιπτώσεις του Οξειδωτικού Stress**

Από τις ελεύθερες ρίζες και τις δραστικές μορφές οξυγόνου προκαλούνται βλάβες σχεδόν σε όλα τα βιομόρια αλλά κυρίως εις βάρος του DNA, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών.

### **DNA**

- i. Βλάβες στο πυρηνικό, μιτοχondριακό καθώς και στο DNA των χλωροπλαστών, που προκαλούν εγκοπές και σπασίματα στην αλυσίδα του DNA.
- ii. Βλάβες στις βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης με τη μορφή χημικών τροποποιήσεων.
- iii. Βλάβες στις πρωτεΐνες του DNA που συνήθως οδηγούν στο σχηματισμό ομοιοπολικών ενώσεων DNA-πρωτεϊνών.

Οι παραπάνω βλάβες είναι δυνατόν να προκαλέσουν μεταλλαξιγενέσεις, καρκινογενέσεις καθώς και κυτταρική δυσλειτουργία.

### **Λιπίδια**

Οι βλάβες στα λιπίδια προκαλούνται κατά βάση στο υδρόφοβο τμήμα της φωσfolιπιδικής διπλοστοιβάδας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης αλλά και των ενδοκυττάρων μεμβρανών. Τα είδη των βλαβών όπου μπορούν να προκληθούν στα λιπίδια είναι:

- α) η υπεροξειδωση λιπιδίων δηλαδή ο σχηματισμός ριζών άνθρακα (R<sup>·</sup>)
- β) η παραγωγή οργανικών υδροϋπεροξειδίων (ROOH)
- γ) η αποικοδόμηση λιπιδικών υπεροξειδίων σε τοξικά προϊόντα.

Αυτές οι βλάβες έχουν καταστροφικά αποτελέσματα για τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα των μεμβρανών, και οδηγούν σε βιοφυσικές και βιοχημικές διαταραχές στο κύτταρο.

### **Πρωτεΐνες**

Οι ROS προκαλούν συχνά οξειδωση και αλλοίωση των πρωτεϊνών οι οποίες χάνουν τη λειτουργικότητά τους και γίνονται επιβλαβείς για τη λειτουργία του κυττάρου. Οι χημικές μεταβολές που επέρχονται στις πρωτεΐνες ως συνέπεια του οξειδωτικού στρες ποικίλουν ανάλογα με το προσβαλλόμενο σε κάθε περίπτωση αμινοξύ αλλά και το είδος του δραστικού μορίου που επιφέρει τη βλάβη (Χιώτη, 2016).

## **Αντιοξειδωτικές ουσίες**

Αντιοξειδωτικό/ή χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε ένωση, η οποία όταν βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση από το προς οξειδωση υπόστρωμα έχει την ιδιότητα να καθυστερεί ή να εμποδίζει την οξειδωση του συγκεκριμένου υποστρώματος (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Οι αερόβιοι οργανισμοί κατά τη διάρκεια της εξελικτικής τους πορείας ανέπτυξαν μηχανισμούς αντιοξειδωτικής προστασίας, οι οποίοι αποτελούνται κυρίως από ένζυμα και μικρού μοριακού βάρους αντιοξειδωτικές ενώσεις. Οι μηχανισμοί της αντιοξειδωτικής άμυνας των οργανισμών μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις κατηγορίες:

1. Ένζυμα που απομακρύνουν τις ROS. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η καταλάση και οι υπεροξειδάσες.
2. Πρωτεΐνες που περιορίζουν τη διαθεσιμότητα των ιόντων σιδήρου και χαλκού τα οποία είναι προ-οξειδωτές. Οι προ-οξειδωτές είναι μόρια που μπορούν να οδηγήσουν σε σχηματισμό ελευθέρων ριζών.
3. Πρωτεΐνες, όπως είναι οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (heat shock proteins), που προστατεύουν τα βιομόρια από οξειδωτικές βλάβες με άλλους μηχανισμούς.
4. Μόρια χαμηλού μοριακού βάρους που αντιδρούν με ROS, και σχηματίζουν προϊόντα που δεν είναι επιβλαβή για τα κύτταρα. Στην κατηγορία αυτή των εκκαθαριστών (scavengers) των ΔΜΟ ανήκουν για παράδειγμα η γλουταθειόνη, η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη Ε), οι μελανίνες κ.ά.

Η διαθεσιμότητα των παραπάνω μηχανισμών άμυνας διαφέρει τόσο μεταξύ των ιστών όσο και μεταξύ των κυττάρων. Επιπλέον, οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί δεν εξασφαλίζουν απόλυτη άμυνα εναντίον του οξειδωτικού στρες άρα και ενάντια της οξειδωτικής βλάβης. Όμως, οι οργανισμοί διαθέτουν μια επιπλέον γραμμή άμυνας, τη δυνατότητα επιδιόρθωσης των οξειδωτικά τροποποιημένων μακρομορίων. Εάν δεν υπήρχαν και τέτοιου είδους μηχανισμοί η συνεχής συσσώρευση οξειδωτικών βλαβών θα ήταν τόσο ραγδαία που θα έθετε σε σοβαρό κίνδυνο την επιβίωση καθώς και τη διαιώνιση των οργανισμών (Παπαποστόλου, 2007).

## **Αντιοξειδωτικά ένζυμα**

Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα καταλύουν τη διάσπαση των ROS στο ενδοκυττάριο περιβάλλον. Παραδείγματα τέτοιων ενζύμων είναι:

- Δισμουτάση του σουπεροξειδίου

Η δισμουτάση του σουπεροξειδίου καταλύει τη μετατροπή ανιόντων σουπεροξειδίου σε υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ ) και αποτελεί ένα από τα πιο αποτελεσματικά ενδοκυττάρια ενζυμικά συστήματα αντιοξειδωτικής άμυνας.

- Αναγωγή της γλουταθειόνης

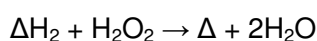
Ένζυμο που συμβάλλει στην αναγέννηση της ανοιγμένης μορφής της γλουταθειόνης (GSH) από την οξειδωμένη μορφή (GSSG).

- Κατάλυση Καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο σε δύο στάδια ( $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ ).

- Υπεροξειδάσες (Γιαννακοπούλου, 2009)

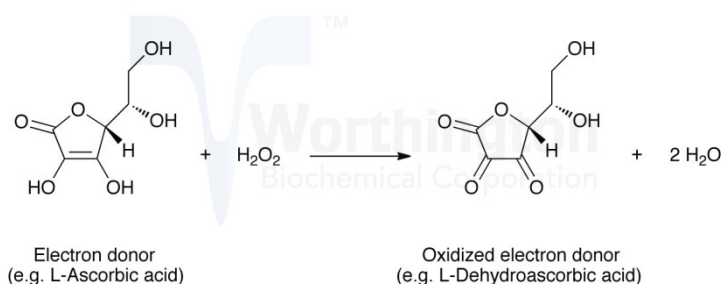
### Υπεροξειδάσες

Οι υπεροξειδάσες (peroxidases, Pxs) καταλύουν γενικά αντιδράσεις του τύπου:



απομακρύνουν δηλαδή το  $\text{H}_2\text{O}_2$ , οξειδώνοντας κάποιο άλλο υπόστρωμα ( $\Delta\text{H}_2$ ). Υπάρχουν πολλοί τύποι υπεροξειδάσων και απαντώνται κυρίως στο κυτταρόπλασμα αλλά και στο στρώμα των μιτοχονδρίων. Πολλές ανήκουν στην οικογένεια υπεροξειδάσων της γλουταθειόνης, και άλλες είναι η υπεροξειδάση του κυτοχρώματος c, η NADH υπεροξειδάση/οξειδάση, η υπεροξειδάση του ασκορβικού οξέος, η υπεροξειδάση των αγριοραφανίδων (horseradish peroxidase, HRP) και άλλες μη ειδικές υπεροξειδάσες (Πατσούκης, 2006).

### Peroxidase



### Εικόνα 5: Αντίδραση υπεροξειδάσης

<http://www.worthington-biochem.com:8080/resources/images/enzyme-manual/HPO/reaction.jpg>

Οι υπεροξειδάσες απαντώνται στα ζώα, τα φυτά και τα μικρόβια. Είναι μονομερείς γλυκοπρωτείνες με προσθετική ομάδα αίμης και οι υδατάνθρακες αποτελούν το 15% της συνολικής μάζας της πρωτεΐνης. Στα ανώτερα φυτά έχουν εντοπισθεί μέχρι 35 ισοενζυμικές μορφές της υπεροξειδάσης, αποτέλεσμα της ύπαρξης πολλών γονιδίων, μεγάλου αριθμού αντιγράφων γονιδίων λόγω πολυμορφισμών και μετά-μεταφραστικών αλλαγών στην πρωτεΐνη.

Η σύνθεση του ενζύμου γίνεται πιθανότατα στο ενδοπλασματικό δίκτυο, η τροποποίησή του στο σύμπλεγμα Golgi απ' όπου και εκκρίνεται. Η υπεροξειδάση δεν εμφανίζει αυστηρή εξειδίκευση έναντι των αναγωγικών, ενώ έχουν αναφερθεί κάποια ισοένζυμα υπεροξειδάσης που καταλύουν και την ανεξάρτητη του  $H_2O_2$  οξειδοαναγωγή. Αν και έχει μεγάλη καταλυτική ικανότητα ωστόσο δείχνει μικρή εξειδίκευση στο υπόστρωμα δότη. Οι πολλές ισοενζυμικές μορφές και η μικρή εξειδίκευση του ενζύμου έχουν ως αποτέλεσμα την δυσκολία στην κατανόηση των λειτουργιών και του ρόλου του στο φυτό. Ωστόσο, η ύπαρξη απλών μεθόδων μέτρησης της ενεργότητας των υπεροξειδασών την έχουν καταστήσει δείκτη της φυσιολογίας και αντιοξειδωτικής άμυνας των φυτών.

Οι υπεροξειδάσες εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, σε κυτταρικά οργανίδια αλλά και σε εξωκυττάρια δομές των ζωικών και φυτικών ιστών. Εξουδετερώνουν το επικίνδυνο για το κύτταρο  $H_2O_2$  στα πλαίσια διαφόρων φυσιολογικών λειτουργιών.

Αξίζει να σημειωθεί ότι έχουν βρεθεί και ένζυμα που παρουσιάζουν ταυτόχρονη καταλασική και υπεροξειδική ενεργότητα και χαρακτηρίζονται ως καταλάσες-υπεροξειδάσες (Χιώτη, 2016).

## **ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Στα πλαίσια αυτής της πτυχιακής εργασίας ο σκοπός μας ήταν να εφαρμόσουμε μια απλή φωτομετρική μέθοδο μέτρησης της ενεργότητας των υπεροξειδασών:

- 1) σε διαφορετικά φυτά
- 2) σε διαφορετικούς φυτικούς ιστούς (φύλλα και ρίζα)
- 3) με διαφορετικά διαλύματα

ώστε να επιβεβαιώσουμε ότι η μέθοδος είναι αξιόπιστη και πιθανές βέλτιστες συνθήκες.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Φυτά και δειγματοληψία

Στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν φυτά τα οποία προήλθαν από οπωροπωλεία καθώς και από οικιακές καλλιέργειες. Η δειγματοληψία στην πρώτη φάση του πειράματος πραγματοποιήθηκε από τα φύλλα των φυτών, στην δεύτερη φάση του πειράματος συλλέξαμε δείγματα και από την ρίζα. Επιλέχθηκαν μόνο υγιή φυτά και ιστοί.

Από τα φύλλα επιλέχθηκαν ιστοί χωρίς το κεντρικό νεύρο.

Όσον αφορά την λήψη δείγματος ρίζας τηρήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- ✧ Αφαίρεση του φυτού από τη γλάστρα.
- ✧ Καθάρισμα του χώματος με νερό βρύσης και στη συνέχεια με απιονισμένο νερό.
- ✧ Καλό στέγνωμα με διηθητικό χαρτί.
- ✧ Λήψη δείγματος από το κεντρικό τμήμα της ρίζας.

Και στις δύο περιπτώσεις η δειγματοληψία γινόταν την ίδια ημέρα που είχε προγραμματιστεί και η μέτρηση του κάθε δείγματος για την αποφυγή της αλλοίωσής του.

Φυτό	Είδος	Οικογένεια	Προέλευση
Σπανάκι	<i>Spinacia oleracea</i>	Chenopodiaceae	Φρουταγορά
Παντζάρι	<i>Beta vulgaris</i>	Chenopodiaceae	Φρουταγορά
Μαϊντανός	<i>Petroselinum crispum</i>	Apiaceae	Οικιακή γλάστρα
Σέλινο	<i>Apium graveolens</i>	Apiaceae	Φρουταγορά
Αντίδι	<i>Cichorium endivia</i>	Cichoriaceae	Φρουταγορά
Μαρούλι	<i>Lactuca sativa</i>	Cichoriaceae	Φρουταγορά
Βασιλικός	<i>Ocimum basilicum</i>	Lamiaceae	Οικιακή γλάστρα

**Πίνακας 1.** Φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα

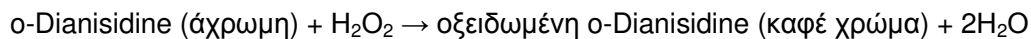
### Προσδιορισμός της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας των μη εξειδικευμένων υπεροξειδασών (Non Specific Peroxidases, NSPx) γίνεται με τη μέτρηση της οξειδωσης της διανισιδίνης στα 460 nm, ως τροποποιημένη μέθοδος των Sandhu et al., 2007.



### Η αρχή της μεθόδου

Η αντίδραση της μεθόδου είναι:



Η οξείδωση της διανισιδίνης συνοδεύεται από την αύξηση της απορρόφησης στα 460 nm. Η διαφορά στην απορρόφηση ( $\Delta A_{460}$ ) είναι ένας τρόπος υπολογισμού της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης αφού σύμφωνα με το νόμο των Beer-Lambert η απορρόφηση αυξάνεται με τη συγκέντρωση της ουσίας.

### Υλικά της μεθόδου

● Ρυθμιστικά διαλύματα (buffer). Στις παρακάτω διαδικασίες χρησιμοποιήθηκαν εναλλακτικά δύο διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα για λόγους σύγκρισης της αποτελεσματικότητάς τους.

Buffer 1:

✧ 0,1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,0

Buffer 2:

✧ 0,1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,0

✧ 1 mM EDTA

✧ 0,5 mM PMSF διαλυμένο σε αιθανόλη τελικής συγκέντρωσης 0,3% (v/v)

Τα παραπάνω διαλύματα χρησιμοποιούνται για την ομογενοποίηση (σε αναλογία 1 gr : 10 ml) αλλά και για τις τυχόν αραιώσεις του ομογενοποιητήματος. Η ομογενοποίηση γίνεται με όλα τα υλικά παγωμένα, καθώς και με χαμηλή ένταση φωτισμού, στο χώρο του εργαστηρίου.

●  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM (συγκέντρωση στην κυβέτα, φρέσκο διάλυμα):

Παίρνουμε 30 μl πυκνό  $\text{H}_2\text{O}_2$  (9,8 M) και τα αναμειγνύουμε με 1470 μl buffer. Το διάλυμα που προκύπτει έχει συγκέντρωση περίπου 200 mM. 50 μl από αυτό το διάλυμα σε 1 ml τελικό όγκο αντίδρασης δίνουν τελική συγκέντρωση  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM.

● o-dianisidine 0,5 mM (συγκέντρωση στην κυβέτα, φρέσκο διάλυμα, φωτοευαίσθητο):

Παίρνουμε 4,7 mgr διανισιδίνης (MB: 317,21) και τη διαλύουμε σε 1,5 ml μεθανόλη. Το διάλυμα που προκύπτει έχει συγκέντρωση 10 mM. 50 μl από αυτό το διάλυμα σε 1 ml τελικό όγκο αντίδρασης δίνουν τελική συγκέντρωση διανισιδίνης 0,5 mM.

● Υπεροξειδάση των αγριοραφανιδών (HRP): 1492 U/mg

## Πορεία της μεθόδου

- i. Βάζουμε το γουδί και το γουδοχέρι που θα χρησιμοποιήσουμε για την ομογενοποίηση στην κατάψυξη για τουλάχιστον 30 min.
- ii. Ζυγίζουμε περίπου 0,5 gr φύλλο ή ρίζα.
- iii. Κόβουμε τους ιστούς σε πολύ μικρά κομμάτια έτσι ώστε να είναι εύκολη η ομογενοποίηση. Όλη η διαδικασία γίνεται σε χαμηλή θερμοκρασία.
- iv. Προσθέτουμε μικρή ποσότητα άμμου για διευκόλυνση της διαδικασίας ομογενοποίησης, προσθέτουμε 1 ml κρύου ρυθμιστικού διαλύματος και ομογενοποιούμε.
- v. Επαναλαμβάνουμε τη χρήση κρύου ρυθμιστικού διαλύματος, έως τελικό όγκο 4 ml. Μεταφέρουμε το ομογενοποίημα σε σωλήνα φυγοκέντρησης.
- vi. Ξεπλένουμε το γουδί με 1 ml buffer, και μεταφέρουμε το ομογενοποίημα στο σωλήνα φυγοκέντρησης.
- vii. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα για 5 min στις 10000 rpm στους 4°C.
- viii. Μεταφέρουμε σε ογκομετρικό σωλήνα, ογκομετρούμε και μεταφέρουμε το δείγμα σε γυάλινο σωλήνα. Κατά την διάρκεια των μετρήσεων το δείγμα πρέπει να μένει σε πάγο και να υπάρχει χαμηλός φωτισμός. Γι' αυτό και οι γυάλινοι σωλήνες είναι καλυμμένοι με αλουμινόχαρτο και διατηρούνται σε πάγο.

<u>Υλικά</u>	<u>Μάρτυρας</u>	<u>Δείγμα 1ο</u>	<u>Δείγμα 2ο</u>	<u>Δείγμα 3ο</u>
Buffer	900	850	800	700
Φυτικό ομογενοποίημα	-	50	100	200
Διάλυμα o-dianisidine	50	50	50	50
Επώαση στους 30°C για 5 min				
Διάλυμα H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	50	50	50

Μηδενίζουμε με buffer και μετράμε την κλίση της αντίδρασης με Lagtime: 10 sec, Ratetime: 30 sec και ολοκλήρωση μέτρησης τα 100 sec διότι μετά η κλίση αρχίζει να μειώνεται λόγω της κατανάλωσης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Η κλίση εκφράζεται ως ΔΑ/min και μετατρέπεται σε units (U) ενζύμου με την χρήση της πρότυπης καμπύλης που παρασκευάζεται από καθαρή υπεροξειδάση (HRP). Όλες οι μετρήσεις γίνονται σε κυβέτα χαλαζία στα 460 nm. Η τελική έκφραση της δραστηριότητας γίνεται σε U/ml ή U/gr.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

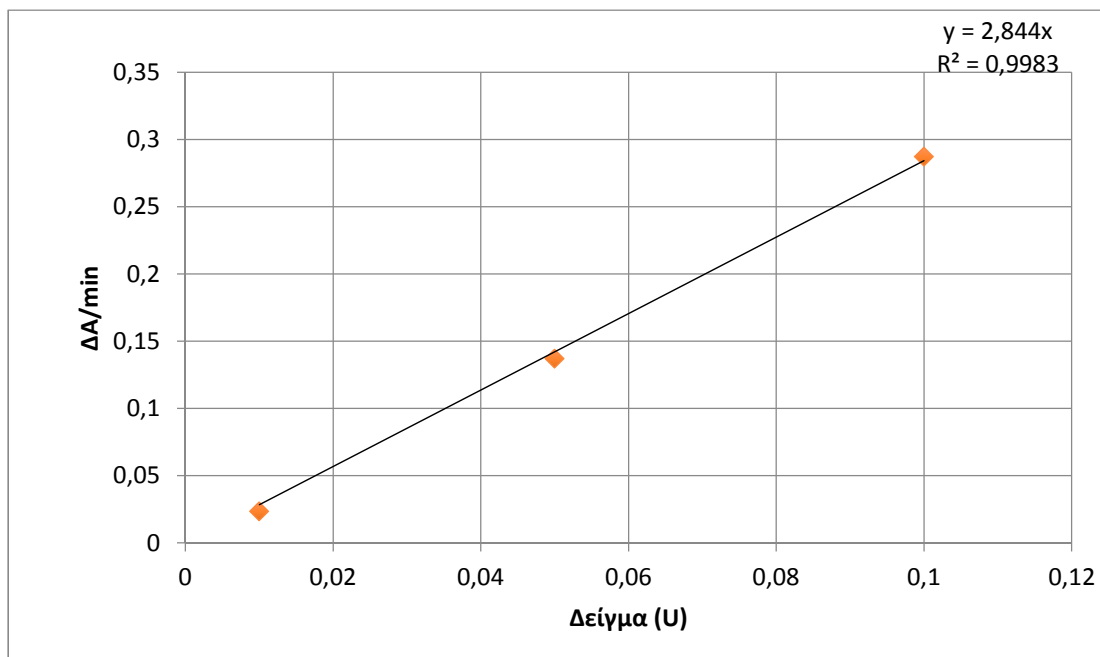
### 1) ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ

Ακολουθούμε τη διαδικασία σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα και αντικαθιστούμε το φυτικό ομογενοποίηση με πρότυπο διάλυμα από καθαρή υπεροξειδάση (HRP).

Οι μετρήσεις που έγιναν βρίσκονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2. Μετρήσεις πρότυπης καμπύλης

Δείγμα (U HRP)	ΔΑ/min
0,1	0.2874
0,05	0.1372
0,01	0.0235



Σχήμα 1. Πρότυπη καμπύλη HRP

## 2) ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΣΕ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ

*Πίνακας 2. Η δραστηκότητα στα φύλλα (U/gr νωπού βάρους φύλλου). Δείγματα από την αγορά.*

<b><u>ΦΥΤΟ</u></b>	<b><u>Buffer 1</u></b>	<b><u>Buffer 2</u></b>
Σπανάκι	4,18	3,24
Μαϊντανός (δείγμα νωπό από οικιακή γλάστρα)	26,26	20,56
Σέλερι	1,14	1,55
Παντζάρι	9,02	6,51
Αντίδι	1,51	0,93
Μαρούλι	0,62	1,02

*Πίνακας 3. Η δραστηκότητα σε νεαρά φύλλα (U/gr νωπού βάρους φύλλου).*

<b><u>ΦΥΤΟ</u></b>	<b><u>Buffer 1</u></b>	<b><u>Buffer 2</u></b>
Βασιλικός (δείγμα νωπό από οικιακή γλάστρα)	1,17	8,11
Μαϊντανός (δείγμα από οικιακή γλάστρα που συντηρήθηκε για 24 h στο ψυγείο)	0,68	3,02

*Πίνακας 4. Η δραστηκότητα σε γερασμένα φύλλα (U/gr νωπού βάρους φύλλου).*

<b><u>ΦΥΤΟ</u></b>	<b><u>Buffer 1</u></b>	<b><u>Buffer 2</u></b>
Βασιλικός (δείγμα νωπό από οικιακή γλάστρα)	0,92	1,42
Μαϊντανός (δείγμα από οικιακή γλάστρα που συντηρήθηκε για 24 h στο ψυγείο)	0,68	1,02

**Πίνακας 5.** Η δραστηριότητα στη ρίζα (U/gr νωπού βάρους ρίζας). Δείγματα νωπά από οικιακή γλάστρα.

<b><u>ΦΥΤΟ</u></b>	<b><u>Buffer 1</u></b>	<b><u>Buffer 2</u></b>
Μαϊντανός	26,4	3
Αντίδι	4,01	3,38

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώνουμε ότι:

- 1) Η συγκεκριμένη μέθοδος μέτρησης της δραστικότητας της υπεροξειδάσης μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε διαφορετικά φυτά όσο και σε διαφορετικούς ιστούς (φύλλα και ρίζες).
- 2) Τα νωπά δείγματα από γλάστρα (μαϊντανός και βασιλικός) φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη δραστικότητα σε σχέση με τα δείγματα που αγοράστηκαν από μανάβικο ή που κόπηκαν από οικιακή γλάστρα αλλά αποθηκεύτηκαν για 24 h στο ψυγείο πριν μετρηθούν (Πίνακες 2 και 3).
- 3) Τα δύο διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα δεν φαίνεται να έχουν ιδιαίτερη επίδραση στη μέτρηση της δραστικότητας οπότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν και τα δύο.
- 4) Οι δύο περιπτώσεις μεγάλης διαφοράς της δραστικότητας με τα διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα (σε νεαρά φύλλα βασιλικού και στη ρίζα μαϊντανού) χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης διότι η διαφορά μπορεί να οφείλεται σε τεχνικό σφάλμα κατά τον χειρισμό των δειγμάτων ή στο γεγονός ότι το δείγμα του βασιλικού που χρησιμοποιήθηκε με το Buffer 1 δεν ήταν αντιπροσωπευτικό διότι περιείχε αρκετά κιτρινωμένα φύλλα καθώς και φύλλα τα οποία ήταν λίγο αφυδατωμένα.

**Συνεπώς, η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιόπιστη μέτρηση της δραστικότητας της υπεροξειδάσης σε φυτικούς ιστούς. Συνιστάται η μέτρηση νωπών δειγμάτων αμέσως μετά την κοπή τους από το φυτό ώστε οι μετρήσεις να αντανακλούν καλύτερα την *in vivo* δραστικότητα του ενζύμου.**



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Γιαννακοπούλου Ε., 2009. Οξειδωτικό stress – αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί. Κλινική σημασία. Archives of Hellenic Medicine, 26 (1): 23-35.
- 2) Μύρτζιου Αμαλία – Ιωάννα, 2012. Ο ρόλος του μονοξειδίου του αζώτου στον ενζυμικό αντιοξειδωτικό μηχανισμό του φυτού *Medicago truncatula*. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας.
- 3) Ντίνου Κωνσταντίνα, Σουφλάκη Θεοδώρα (2013). Ανάπτυξη φαρματοφθορισμομετρικής μεθόδου ποσοτικοποίησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου στα καλλιεργούμενα φυτά. Πτυχιακή Εργασία, ΤΕΙ Μεσολογίου, Τμήμα ΘΕ.Κ.Α.
- 4) Παπαποστόλου Ιωάννης (2007). Ο ρόλος του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της ρίζας του σουπεροξειδίου στη σκληρωτική διαφοροποίηση των μυκήτων. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Βιολογίας.
- 5) Πατσούκης Νικόλαος (2006). Ο ρόλος την θειολικής κατάστασης στη σκληρωτική διαφοροποίηση των μυκήτων. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Βιολογίας.
- 6) Χιώτη Βασιλεία (2016). Επίδραση της αμινοτριαζόλης στη δραστικότητα της καταλάσης των καλλιεργούμενων φυτών. Πτυχιακή Εργασία, ΤΕΙ Δυτικής Ελλάδας, Τμήμα Τεχνολόγων Γεωπόνων.
- 7) Halliwell B. and Gutteridge J.M.C, 1999. Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford Science Publications.
- 8) Sandhu S. K. et al., 2007. Peroxidase as a biochemical marker of maturity levels in potato (*Solanum tuberosum*) cultivars grown under short days. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 35: 171-175.
- 9) Εικόνα εξωφύλλου: <https://www.hydrogentechnologies.com.au/oxidative-stress>