

OBRANNÉ MECHANIZMY FYTOPLANKTÓNU VOČI OXIDAČNÉMU STRESU VYVOLANÉHO ŤAŽKÝMI KOVMÍ

ALEXANDRA FILOVÁ, AGÁTA FARGAŠOVÁ
a MARIANNA MOLNÁROVÁ

*Katedra environmentálnej ekológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava
filova32@uniba.sk*

Došlo 14.11.16, prijaté 5.12.16.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.

Kľúčové slová: ťažké kovy, fytoxicita, oxidačný stres, obranné mechanizmy

Obsah

1. Úvod
2. Základné mechanizmy pôsobenia toxických kovov
3. Metabolické odpovede fytoplanktónu na stres vyvolaný ťažkými kovmi
 - 3.1. Singletový kyslík
 - 3.2. Superoxid
 - 3.3. Peroxid vodíka
 - 3.4. Hydroxylový radikál
4. Inhibícia detoxikačného systému ROS ťažkými kovmi
5. Obrana fytoplanktónu pred toxickými účinkami ťažkých kovov
6. Reakcie fytoplanktónu na zvýšenú hladinu ROS
7. Záver

1. Úvod

Ako ťažké kovy označujeme kovové prvky, ktoré majú pomerne vysokú hustotu (rovnú alebo väčšiu ako 5 g cm^{-3})¹. Obvykle sa do tejto skupiny zaraďujú aj niektoré polokovy (metaloidy), ktoré majú vo vzťahu k živým systémom veľmi podobné účinky ako kovy. V súvislosti s účinkami ťažkých kovov sa uvádza, že kým mnohé sú v nutričnej dávke nevyhnutné pre život, iné sú toxické aj v najmenšej koncentrácii². Potenciál kovu vyvolať toxicitu je závislý od viacerých faktorov, ku ktorým patrí aj koncentrácia a mobilita kovu v prostredí a tým jeho dostupnosť pre organizmus. V prípade fytoplanktónu, ktorého stielky nie sú, alebo sú len málo diferencované, chápeme príjem ťažkých kovov ako bunkový. Jedným zo základ-

ných parametrov, ktoré sa sledujú pri ekotoxikologickom hodnotení účinkov kovov, nielen na fytoplanktóne, je okrem iných aj zvýšený oxidačný stres. Zvýšený oxidačný stres charakterizujeme ako prevahu tvorby reaktívnych foriem kyslíka (ROS) nad tvorbou antioxidantov. Hladina stresu vyvolaná ťažkými kovmi a oxidantmi je zvyčajne rozhodujúca pri účinnosti obranných mechanizmov³. Zvýšená produkcia antioxidantných a iných obranných látok je odpoveďou na prítomnosť stresu a v bunke zabezpečuje opätovnú homeostázu stresom narušených systémov. Ak obranné mechanizmy nedokážu pokryť odstraňovanie negatívnych dôsledkov stresu, vedie to k takým poškodeniam bunkových štruktúr, ktoré už nie sú zlučiteľné so životom⁴.

2. Základné mechanizmy pôsobenia toxických kovov

Prejav toxických účinkov kovov je založený na viacerých mechanizmoch, ktorých výsledkom môže byť obmedzovanie vstupu esenciálnych látok do buniek⁵, alebo vytesňovanie esenciálnych kationov z biologicky funkčných štruktúr a ich nahrádzanie toxickým kovom^{5–8}. Kovy zvyčajne súperia o vstup do bunky a platí, že zvíťazí práve ten, ktorého koncentrácia je v prostredí vyššia. V ekotoxikologickej štúdii s riasou *Scenedesmus* sp. sa uvádza, že pri príjme bunkou si významne konkurujú zinok a veľmi toxické kadmium (Cd^{2+}). Zinok môže kadmium účinne brániť pri vstupe do bunky, ak je pomer koncentracii Zn/Cd väčší ako 14 (cit.⁹). Po vstupe kovov do bunky dochádza k ich interakcii s proteínmi, a to v dôsledku afinity kovov k tiolovým, histidínovým a karboxylovým skupinám^{8,10}. Takéto inhibičné účinky kovov sa potvrdili aj pri fytoplanktonickej riasy *Pseudokirchneriella* sp., kde kovy inhibovali hladinu esteráz, ktoré sú dôležité pri hydrolýze esterov¹¹. Okrem inhibície aktivity enzýmov sa môžu kovy podieľať aj na stimulácii napr. aktivity lipoxygenázy, a tak zvyšovať peroxidáciu lipidov¹². Schopnosť kovov (Cu, Zn, Cr a Cd) brzdiť tok elektrónov v dýchacom reťazci mitochondrií vedie k potlačaniu aktivity ATP-syntetázy a tvorby ATP¹¹. Kovy môžu poškodzovať aj genetickú informáciu, zasahovať do prepisu génov⁶ alebo antioxidantných systémov¹³. Oxidačný stres – zvýšená hladina reaktívnych foriem kyslíka (ROS) – je sprievodnou odpoveďou na toxicitu ťažkých kovov. Viacerí autori sú presvedčení, že ťažké kovy nepoškodzujú DNA priamo, ale nepriamo – spúšťaním zvýšenej produkcie ROS, ktoré potom spôsobujú štruktúrnu zmenu v nukleových kyselinách^{10,14}. Túto skutočnosť potvrdzuje prípad, kedy nižšie hladiny Cu a Cd nezvyšovali v bunkách *Chlorella* sp. hladinu ROS a nebol ovplyvnený ani prepis génov kódujúcich bielkovinové štruktúry chlo-

roplastov. Vyššie koncentrácie týchto kovov a ich kombinácia (Cu + Cd) už ale vplývali na zvýšenie hladiny ROS v bunkách fytoplanktónu, čo viedlo ku poklesu aktivity a expresie sledovaných génov⁶. Všeobecne sa v dôsledku oboch stresorov (ťažké kovy a ROS) znižuje efektívnosť fotosyntézy, ako aj príjem a asimilácia CO₂, respirácia a aktivita ďalších metabolických dráh. To vedie ku zvýšenému úhynu, poklesu reprodukcie a pohyblivosti fytoplanktónu. Vo vzťahu k riase *Chlamydomonas* sp. je možné účinnosť kovov z hľadiska produkcie ROS vyjadriť nasledovne: Pb²⁺ > Fe³⁺ > Cd²⁺ > Ag⁺ > Cu²⁺ > As⁵⁺ > Cr⁶⁺ > Zn²⁺ (cit.¹³). Z toho vyplýva, že olovo je najnebezpečnejším kovom, pokiaľ ide o zvýšenú tvorbu ROS.

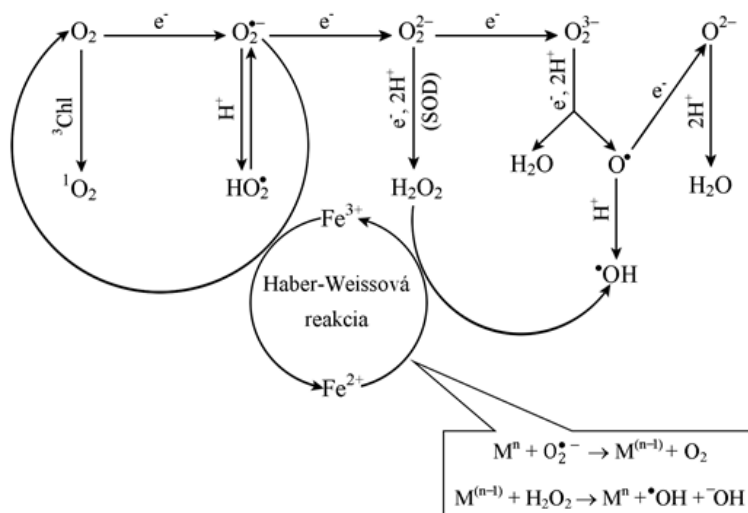
3. Metabolické odpovede fytoplanktónu na stres vyvolaný ťažkými kovmi

Fytoplanktón, podobne ako všetky aeróbné organizmy, vytvára v rámci svojich prirodzených metabolických procesov reaktívne formy kyslíka, ktoré sú v bezstresových podmienkach efektívne zneškodňované detoxikačnými mechanizmami¹⁵. V období stresu vyvolaného ťažkými kovmi môže dôjsť ku narušeniu činnosti antioxidantov, ROS sa v bunke hromadia, čím dochádza ku zvýšenému oxidačnému stresu. Molekulárny kyslík nemá vlastnosti ROS, pretože disponuje dvomi nespárenými elektrónmi s paralelným spinom, ale v bunke môže byť metabolicky transformovaný na aktivovanú formu¹⁶. Medzi ROS zaraďujeme singletový kyslík (¹O₂), superoxidový radikál(O₂^{•-}), perhydroxylový radikál (HO₂[•]), peroxid vodíka (H₂O₂) a hydroxylový radikál (•OH). Uvádza sa, že 90 % ROS sa v bunke produkuje na miestach, kde je zabezpečovaný

reťazový transport elektrónu – sú to predovšetkým chloroplasty, mitochondrie, endoplazmatické retikulum, plazmatické a jadrové membrány¹⁵. V menšej miere sa ROS tvoria enzymaticky pôsobením rôznych oxidáz a oxygenáz (NADPH oxidáza, xantín oxidáza, lipoxygenáza a cyklooxygenáza)¹⁵, ktoré môžu napr. v peroxizómoch vyvolávať enzymatickú a oxidatívnu degradáciu nežiaducich, nefunkčných alebo toxických látok¹⁷. S výnimkou singletového kyslíka vznikajú spomenuté ROS ako sled monovalentných reakcií (obr. 1).

3.1. Singletový kyslík

Vo fytoplanktóne, tak ako vo všetkých fotoautotrofných organizmoch, je významným procesom fotosyntéza závislá od svetlozberných pigmentov. Svetelná energia prijatá chlorofylom sa odštiepením elektrónu mení na energiu elektrochemickú. Za bežných podmienok chlorofyl pracuje s energiou týmto spôsobom a je známy ako singletový chlorofyl, ktorý má paralelné spiny. Stresové podmienky však môžu spôsobiť, že sa elektrón neuvoľňuje, a singletový chlorofyl môže znížiť excitovaný energetický stav transformáciou na tripletový stav – zmenou spinu elektrónu^{19,20}. Tripletový chlorofyl, vzhľadom ku singletovému chlorofylu, zadržiava v sebe nadbytočnú energiu dostatočne dlho na to, aby ju odovzdal molekulárnemu kyslíku (O₂) a tým prevrátil spin jedného z jeho elektrónov za vzniku reaktívneho singletového kyslíka (¹O₂)²¹. Zelené farbivá fotosyntetizujúcich organizmov, ako aj planktonických foriem rias a siníc, obsahujú vo svojej štruktúre horčík (Mg), ktorý môže byť pri strese vyvolanom ťažkými kovmi vytresnený a nahradený toxickým kovom, pričom sa vytvárajú „metalo-chlorofyly“⁴⁷. V literatúre sa uvádza, že



Obr. 1. Možné dráhy vzniku ROS^{2,4,18}

v testoch *in vitro*, stabilita tripletových chlorofylov stúpala v poradí: Cu-chlorofyl *a* (67 ns) < Zn-chlorofyl *a* (199 ns) \approx chlorofyl *a* (Mg-chlorofyl *a*) (208 ns). V rovnakom poradí sa zvyšovala aj schopnosť chlorofylov formovať singletový kyslík ($^1\text{O}_2$). Metalochlorofyly *a* sú teda menším (Cu-Chl *a*) alebo približne rovnako veľkým (Zn-Chl *a*) producentom $^1\text{O}_2$ ako Mg-chlorofyly *a* (cit.⁹). Metalochlorofyly majú ale iný závažnejší vplyv na fotosyntézu. V singletovom stave sú stabilnejšie a zadržiavajú v sebe excitačnú energiu o niečo dlhšie ako Mg-chlorofyly⁷. Týmto sa vo fotosyntetickom systéme znižuje rýchlosť toku elektrónov²². Ukazuje sa, že Fe-chlorofyl *a* (niekde známy ako Fe-feofytín *a*) zadržiava absorbovanú energiu až 3-násobne dlhšie ako Mg-Chl *a* (cit.²³), čo môže tiež viesť ku vzniku $^1\text{O}_2$. Singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) v bunkách riasy *Chlamydomonas* sp. poškodzuje bielkovinové štruktúry, akými sú napríklad D1 proteíny, ktoré sú nevyhnutné pre proces fotosyntézy. Okrem toho, spôsobuje aj deštrukciu chlorofylov vo fotosystéme PS II (cit.²⁴).

3.2. Superoxid

Jednou z príčin vzniku $\text{O}_2\bullet^-$ je zadržiavanie elektrónov v systémoch fotosyntézy. V podmienkach zvýšeného stresu, je to v PS II predovšetkým feofytín, ktorý má v čase zadržiavania elektrónov dostatočne silný energetický potenciál na transformáciu molekulárneho kyslíka (O_2) na superoxidový radikál ($\text{O}_2\bullet^-$)²⁵. Vo fytoplanktóne môže byť elektronový transport PS II potláčaný najmä kadmiumom (Cd). Účinnosť ostatných kovov v tomto prípade klesá v poradí $\text{Zn} > \text{Cr} > \text{Cu} > \text{Al}$ (cit.²⁶). Inhibícia metabolizmu CO_2 môže viesť ku zvýšenej Mehlerovej reakcii v PS I. Divalentné kationty, ako sú Co^{2+} , Ni^{2+} a Zn^{2+} , vytlačujú Mg^{2+} z enzymatického systému RuBisCO, výsledkom čoho je znížená efektivita fixácie CO_2 (cit.²⁷). Ako dokazujú výskumy na morskej riasy z rodu *Thalassiosira* sp. iným zásahom ťažkých kovov do metabolizmu CO_2 je vytesnenie zinku z metaloenzyému Zn-uhličitanovej dehydratázy²⁸. Posledným článkom PS I je ferredoxín, ktorý bežne uvoľňuje elektrón a redukuje NADP^+ na NADPH v Calvinovom cykle. V situácii, kedy sa vplyvom ťažkých kovov inhibuje príjem CO_2 , môže byť rýchlosť uvoľňovania elektrónov z chloroplastov, ako aj rýchlosť ich prenosu cez fotosystémy, väčšia ako zužitkovanie NADPH v Calvinovom cykle. Redukovaný ferredoxín musí zaujať základný stav, a ak nemože odovzdať elektrón NADP^+ , zbavuje sa ho inými spôsobmi, pričom môže náboj odovzdať aj molekulárnemu kyslíku a transformovať ho na $\text{O}_2\bullet^-$ (cit.^{29–31}). Zdrojom superoxidu sú aj organely bunkového dýchania – mitochondrie. Machado a spol.¹¹ dokazujú, že toxické koncentrácie Cu^{2+} a Zn^{2+} vplývajú na zníženie aktivity mitochondriálnej ATP-syntetázy v riasy *Pseudokirchneriella subcapitata*, pričom je prechod elektrónov brzdený na niektorom z dýchacích centier a zvyšuje sa možnosť formácie $\text{O}_2\bullet^-$. V organelách s kyslým prostredím sa superoxid protonizuje a vytvára perhydroxylový radikál ($\bullet\text{O}=\text{O}\cdot\text{H}$), ktorý narozdiel od $\text{O}_2\bullet^-$ má schopnosť voľne prechádzať cez biologické membrány a iniciovať

tak oxidáciu tukov³². Rovnako závažné sú aj negatívne účinky superoxidu ($\text{O}_2\bullet^-$), ktorý poškodzuje bielkoviny, polynenasýtené mastné kyseliny (PUFA) a fotosyntetizujúce pigmenty³³.

3.3. Peroxid vodíka

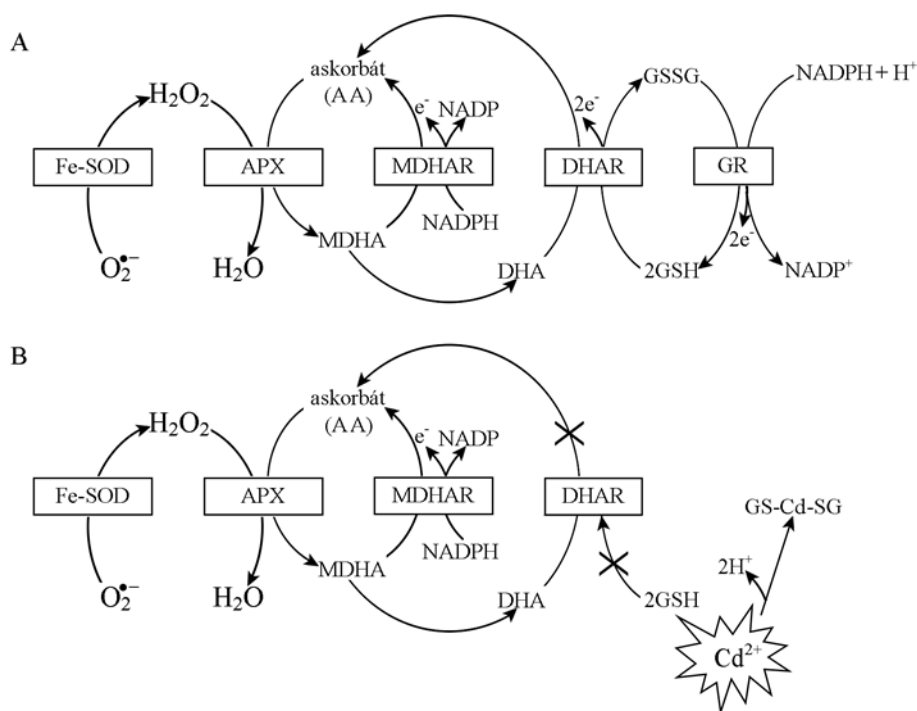
Do procesu obrany proti reaktívnemu superoxidu sú vo fytoplanktóne, podobne ako u ostatných organizmov, zahrnuté superoxidodismutázy³², ktorých úlohou je urýchliť premenu $\text{O}_2\bullet^-$ na peroxid vodíka (H_2O_2)³⁴. Podľa del Río a spol.¹⁷ môže peroxid vodíka vznikať aj priamo, a to v peroxidómoch pri fotorespirácii glykolát oxidázy alebo β -oxidácii matných kyselín. Približne 2 % z kyslíka prijatého mitochondriami sa bežne zapája do produkcie H_2O_2 (cit.¹⁰). Peroxid vodíka je stabilná molekula, a preto ho nemožno označiť za reaktívnu či radikálovú formu³⁵. Medzi ROS sa zaraďuje z toho dôvodu, že voľne difunduje cez membrány z miesta jeho tvorby do iných miest bunky¹⁵, kde môže dôjsť k Haber-Weissovej reakcii za vzniku hydroxylového radikálu ($\bullet\text{OH}$) (obr. 1)^{16,34}.

3.4. Hydroxylový radikál

Ťažké kovy môžeme zaradiť do dvoch skupín: redoxne aktívne ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$; $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$; Ag^+/Ag^0 ; $\text{Cr}^{4+}/\text{Cr}^{5+}$) a neaktívne (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Al^{3+} , a ďalšie)²⁷. Kovy preukazujúce redoxnú aktivitu, môžu byť zapojené do Haber-Weissovej reakcie (obr. 1), ktorej výsledkom je tvorba hydroxylového radikálu ($\bullet\text{OH}$) z peroxidu vodíka (H_2O_2)²⁷. Toxická intracelulárna hladina redukčno-oxidačných kovov (Fe, Cu, Ag alebo Cr) prispieva ku zvýšenej tvorbe $\bullet\text{OH}$ (cit.^{8,36}). Haber-Weissova reakcia sa dá zhrnúť nasledovne: superoxid redukuje kov a sám sa oxiduje na molekulárny kyslík. Redukovaný kov potom môže reagovať s H_2O_2 za vzniku hydroxylového radikálu ($\bullet\text{OH}$) (obr. 1)³⁴. Hydroxylový radikál sa považuje za najnebezpečnejšiu formu aktívneho kyslíka, čo súvisí s jeho vysokou nestabilitou a obmedzenými mechanizmami jeho detoxikácie, takže ihneď oxiduje najbližšie biomolekuly, akými sú pigmenty, proteíny, tuky a DNA^{4,8}.

4. Inhibícia detoxikačného systému ROS ťažkými kovmi

V živých organizmoch, fytoplanktón nevynímajúc, je glutatión (GSH) zahrnutý aj v antioxidačnom askorbát-glutatiónovom cykle (AA-GSH cyklus), ktorý zodpovedá za zneškodňovanie H_2O_2 (obr. 2A)¹³. Glutatión je tripeptid, kde jednou z aminokyselín je cysteín s tiolovou ($-\text{SH}$) funkčnou skupinou. Ióny ťažkých kovov, ako Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} majú chemicky najvyššiu afinitu k síre³⁷. V dôsledku reaktivity kovov so sírou môžu interagovať aj s tiolovou skupinou glutatiónu (obr. 2B). Napríklad kationt kadmia (Cd^{2+}) reaguje s dvomi molekulami GSH za vzniku komplexu kadmium-glutatión (GS-Cd-SG) a protónov (H^+)³⁸. Glutatión tak stráca primárnu funk-



Obr. 2. Askorbát-glutatiónový cyklus (AA-GSH cyklus) v chloroplastoch^{38,41}. A – funkčný AA-GSH cyklus, B – cyklus AA-GSH inhibovaný kadmíom. Fe-SOD – Fe-superoxiddismutáza; APX – askorbát-peroxidáza; AA – askorbát; MDHAR – monodehydroaskorbát reduktáza; DHAR – dehydroaskorbát reduktáza; GR – glutatión reduktáza; MDHA – monodehydroaskorbát; DHA – dehydroaskorbát; GSH – glutatión; GS-Cd-GS – komplex kadmium-glutatión

ciu donora elektrónov na regeneráciu askorbátu (AA), čím sa narúša askorbát-glutatiónový cyklus. V iných cykloch, podieľajúcich sa na odstraňovaní H_2O_2 , je zahrnutý selenoproteín – glutatión peroxidáza (GPX), ktorá sa nachádza aj v niektorých riasach³⁹. Už v staršej práci sa uvádza, že Cd^{2+} a Zn^{2+} majú najvyšší potenciál inhibovať GPX, zatiaľ čo Ag^+ , Hg^{2+} , Co^{2+} a Pb^{2+} vplyvajú na funkčnosť GPX v menšej miere⁴⁰.

Výskumy ukazujú, že DNA je poškodzovaná hlavne $\text{HO}\cdot$ a $^1\text{O}_2$, menej H_2O_2 a $\text{O}_2\cdot^-$, ale do jej štruktúry môžu zasahovať aj NOS (cit.⁸). Mnohé obranné látky sú kódované genetickou informáciou, ako napr. superoxiddismutáza (SOD), ktorá zodpovedá za odstraňovanie superoxidu. Ak oxidačný stres naruší genetickú informáciu, môže sa výrazne znížiť aj produkcia SOD (cit.⁴), a tak sa posilní ďalšie hromadenie superoxidu. Inhibovaná aktivita katalázy (CAT) a askorbát peroxidázy (APX), ktoré sa tiež podieľajú na detoxikácii ROS, sa spomína v súvislosti s deštruktívnymi účinkami peroxinitritu (ONOO^-), ktorý vzniká pri interakcii superoxidu ($\text{O}_2\cdot^-$) s oxidom dusnatým (NO)¹⁷.

5. Obrana fytoplanktónu pred toxickými účinkami ťažkých kovov

V podmienkach zvýšeného stresu môžu riasy vytvárať kolónie. Agregáciou niekoľkých buniek rias sa zmenší plocha voľných bunkových stien, čím sa obmedzí kontakt s okolitým prostredím a minimalizuje sa vstup toxických kovov⁴². Bunková stena spolu so slizom môže zvyšovať účinnosť pri príjme kovov, ale zároveň predstavuje aj bariéru pre ich vstup. Zvýšená produkcia slizu sa pozorovala ako v podmienkach nedostatku živín, tak aj pri obrane rias proti kovom prítomným v toxických koncentráciách^{42,43}. Zvyšovanie hustoty slizu je zabezpečené vylučovaním exudátov, ktoré sú bohaté na kovy chelatujúce a stabilizujúce štrukturálne skupiny. Podobné zloženie ako sliz má aj bunková stena. Komponenty bunkovej steny obsahujú funkčné skupiny, akými sú hydroxylová (R-OH), aldehydová (R-COH) prípadne aminová (R-NH₂) skupina, ktoré zachytávajú kovy prostredníctvom vodíkovej väzby^{42,44}. Inými skupinami sú R-OSO_2^- a R-COO^- . Karboxylová (R-COOH) funkčná skupina je súčasťou mastných kyselín zabudovaných v bunkovej stene a pri neutrálnom pH sa zvyčajne deprotonizuje, preto má negatívny náboj so schopnosťou stabilizovať kovy ($\text{M}^{2+} + 2 \text{R-COO}^- \rightarrow \text{R-COO-M-OOC-R}$)⁴². Medzi obranu možno zaradiť aj vylúčenie už fytoplanktónom prijatých kovov z cytoplaz-

my mimo bunku. Napríklad úlohou membránových prenášačov zo skupiny CDFs (z angl. cation diffusion facilitators), ktorých funkcia je založená na H^+ antiporte, je vyplavovanie katiónov kovov, akými sú Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} alebo Mn^{2+} (cit.⁴⁵). Zbavovanie sa kovov môže prebiehať aj cez ATP-pumpy, pri ktorých sa ale spotrebúva energia. Toxicita ťažkých kovov závisí aj od ich oxidačného stavu. Preto si riasy vyvinuli enzymatické mechanizmy, pomocou ktorých menia oxidačný stav kovu tak, aby predstavoval menšiu hrozbu⁴⁶. Špecifickými látkami zahrnutými v obrane proti toxicite ťažkých kovov sú fytochelatíny ((γ -Glu-Cys) n Gly) (PCs), ktoré sa v riasach tvoria prednostne s dĺžkou peptidu $n = 2$ a sú skupinou bielkovín bohatých na tiolové skupiny ($-SH$)⁴⁷. Stabilizácia kovov fytochelatínmi je založená na princípe väzby kovu s $-SH$ funkčnou skupinou. V prípade fytoplanktónu sa PCs do obrany zapájajú rovnako v mimobunkovom (exudácia), ako aj v bunkovom priestore. V bunke sú kovy potom zachytávané a sekvestrované vo vakuolách, čím sa zabezpečuje prevencia tvorby ROS (cit.⁴¹). V literatúre sa uvádza, že kým pri ochrane pred toxickými účinkami Ni, Ag a Zn riasa *Scenedesmus* sp. zvyšovala len tvorbu glutatiónu (GSH), v prítomnosti Cu a Pb už zvyšovala nielen syntézu GSH, ale aj fytochelatínov, ktoré sú na $-SH$ skupiny bohatšie⁴⁸. Všeobecne sa však uvádza, že syntézu PCs môže spúšťať celý rad kovových katiónov, pričom na zvyšovanie ich hladiny vplyvajú kovy v tomto poradí: Ag < Co < Ni < Zn < Cu < Hg < Pb < Cd (cit.⁴⁹).

6. Reakcie fytoplanktónu na zvýšenú hladinu ROS

V prítomnosti toxických koncentrácií ťažkých kovov sa hladina antioxidantov vo fytoplanktóne jednoznačne zvyšuje. Pri riase *Scenedesmus bijugatus* sa v podmienkach toxickej koncentrácie Cu hladina antioxidantov zvyšovala v poradí $GPX > SOD > APX > CAT$ (cit.⁵⁰). Zvýšená hladina obranných látok (SOD aj APX) sa pozorovala aj v prípade chronického stresu vyvolaného ťažkými kovmi v riase *Gonyaulax* sp., kedy sa hladina SOD zvyšovala v závislosti od prítomného kovu v poradí $Hg^{2+} < Cu^{2+} < Pb^{2+} < Cd^{2+}$ a hladina APX v poradí $Hg^{2+} < Cd^{2+} < Pb^{2+} < Cu^{2+}$ (cit.³). Spontánna dismutácia $O_2^{\bullet -}$ na H_2O_2 je 10 000krát pomalšia ako tá, ktorá je aktivovaná SOD (cit.⁵¹). Superoxiddismutáza má niekoľko subcelulárnych foriem, ktoré sa líšia ako kovom prítomným v jej štruktúre, tak aj lokalizáciou v bunke (Fe-SOD je lokalizovaná v chloroplastoch, Mn-SOD v mitochondriách, Cu/Zn-SOD detoxikuje $O_2^{\bullet -}$ v chloroplastoch, peroxizómoch a cytosóle). V prokaryotickom fytoplanktóne – niektorých siniciach – sa vyskytuje Ni-SOD (cit.⁴¹). Na necyklickom zneškodňovaní H_2O_2 v peroxizómoch sa podieľa kataláza (CAT), ktorá obsahuje hémovú skupinu, a katalyzuje rozpad peroxidu vodíka na vodu a kyslík⁴. Do odstraňovania H_2O_2 je zahrnutá aj askorbát peroxidáza (APX) a glutatión peroxidáza (GPX), ktoré pri katalýze odštiepujú zo substrátov (askorbátu (AA) a glutatiónu (GSH)) elektróny potreb-

né na detoxikačnú reakciu. Oxidované substráty sú potom obnovované rôznymi cyklami, ku ktorým patrí aj vyššie spomenutý askorbát-glutatiónový cyklus. Prolín zabezpečuje v riasach prevenciu pred peroxidáciou lipidov a zmiernenie oxidačného stresu v čase ich vystavenia ťažkým kovom^{14,52}. Napríklad v prítomnosti kadmia sa hladina prolínu v skúmaných druhoch fytoplanktónu zvýšila v priemere 6-násobne⁵³. V testoch s riasami, ktoré boli stresované Cd, Mn alebo Ni, sa ukázalo, že suplementárny prolín stimuluje aj vyššiu aktivitu obranných látok, akými sú peroxidáza a kataláza⁵⁴.

7. Záver

Štúdie orientované na výskum abiotického stresu dokazujú, že ťažké kovy zasahujú do biologicky významných štruktúr v bunkách fytoplanktónu. Ťažké kovy, okrem iného, narúšajú aj hospodárenie s energiou vo fotosyntéze a zasahujú do reťazcov transportu elektrónov. Výsledkom toho je obvykle zvýšená produkcia reaktívnych foriem kyslíka a oxidačný stres je tak sprievodným javom toxicity ťažkých kovov. ROS poškodzujú mnohé biomolekuly a obmedzujú správne fungovanie metabolických dráh. V dôsledku spomenutých stresorov sa významne znižuje produkcia fytoplanktónu. Potravinové zdroje vyšších trofických úrovní sa tak stávajú obmedzené a celkovo môže byť ovplyvnená nielen diverzita, ale aj početnosť organizmov vo vodnom systéme. Fytoplanktón sa môže so stresom vysporiadať cez obranné mechanizmy, ktoré zahŕňajú aj celulárnu tvorbu špecifických látok. Fotoautotrofný planktón znižuje reaktivitu ťažkých kovov väzbou s fytochelatínmi, ktorých syntéza je vždy spúšťaná ako odpoveď na toxické koncentrácie ťažkých kovov. Proti oxidačnému stresu sa zvyšuje hladina antioxidantov, úlohou ktorých je účinné zneškodňovanie ROS na biologicky neškodné látky. Vzhľadom na to, že riasy sa dokážu brániť nižším koncentráciám ťažkých kovov, je možné, pri prijateľnej hladine kontaminácie vodného prostredia antropogénnou činnosťou (ťažba a výrobné procesy), uvažovať o jeho dlhodobej udržateľnosti. Naopak, príliš vysoké koncentrácie ťažkých kovov nielenže samy pôsobia na fytoplanktón nepriaznivo, ale vyvolávajú aj hromadenie ROS v ich bunkách, čo môže mať pre vodný ekosystém fatálne následky. Z environmentálneho hľadiska je udržiavanie dobrého stavu vôd prioritné, nakoľko ich kvalita a život v nich ovplyvňuje aj život človeka.

Publikácia bola podporená grantom VEGA 1/0098/14.

Zoznam skratiek

AA	askorbát (kyselina askorbová)
APX	askorbát peroxidáza
CAT	kataláza
CDFs	trasportéry kationovej difúzie (z angl. Cation diffusion facilitators)

Cys	cystein
DHA	dehydroaskorbát
DHAR	dehydroaskorbát reduktáza
Glu	glutamin
Gly	glycín
GPX	glutatión peroxidáza
GR	glutatión reduktáza
GS-	glutatión (deprotonizovaný)
GSH	glutatión (redukovaná forma)
GSSG	glutatión (oxidovaná forma)
Chl <i>a</i>	chlorofyl <i>a</i>
MDHA	monodehydroaskorbát
MDHAR	monodehydroaskorbát reduktáza
NADP ⁺	oxidovaný nikotín-amid-adenín-dinukleotid-fosfát
NADPH	redukovaný nikotín-amid-adenín-dinukleotid-fosfát
NOS	reaktívne formy dusíka
PCs	fytochelatíny
PS I	fotosystém I
PS II	fotosystém II
PUFA	polynenasýtené mastné kyseliny
ROS	reaktívne formy kyslíka
RuBisCO	ribulóza-1,5-bisfosfát karboxyláza/ oxygenáza
-SH	tiolová funkčná skupina
SOD	superoxiddismutáza

LITERATÚRA

- Kafka Z., Punčochařová J.: Chem. Listy 96, 611 (2002).
- Shilpi G., Shilpi S., Sunita S.: Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 7, 9 (2015).
- Okamoto O. K., Pinto E., Latorre L. R., Bechara E. J. H., Colepicolo P.: Arch. Environ. Contam. Toxicol. 40, 18 (2001).
- Karuppanapandian T., Moon J.-C., Kim C., Manoharan K., Kim W.: Aust. J. Crop Sci. 5, 709 (2011).
- Küpper H., Dëdic R., Svoboda A., Hála J., Kroneck P. M. H.: Biochim. Biophys. Acta 1572, 107 (2002).
- Qian H., Li J., Sun L., Chen W., Sheng G. D., Liu W., Fu Z.: Aquat. Toxicol. 94, 56 (2009).
- Küpper H., Küpper F. C., Spiller M., v knihe: *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications. Advances in Photosynthesis and Respiration* (Grimm B., Porra R. J., Rüdiger W., Scheer, ed.), sv. I., kap. 5. Springer, Dordrecht 2006.
- Sharma S. S., Dietz K.-J.: Trends Plant Sci. 14, 43 (2008).
- Töpperwien S. T., Behra R., Sigg L.: Environ. Toxicol. Chem. 26, 483 (2007).
- Shahid M., Pourrut B., Dumat C., Nadeem M., Aslam M., Pinelli E.: Rev. Environ. Contam. Toxicol. 232, 1 (2014).
- Machado M. D., Lopes A. R., Soares E. V.: J. Hazard. Mater. 296, 82 (2015).
- Tripathi B. N., Mehta S. K., Amar A., Gaur J. P.: Chemosphere 62, 538 (2006).
- Szivák I., Behra R., Sigg L.: J. Phycol. 45, 427 (2009).
- Pinto E., Sigaud-Kutner T. C. S., Leitaõ M. A. S., Okamoto O. K., Morse D., Colepicolo P.: J. Phycol. 39, 1008 (2003).
- Lushchak V. I.: Comp. Biochem. Physiol. 153c, 175 (2011).
- Bandyopadhyay U., Das D., Banerjee R. K.: Curr. Sci. 77, 658 (1999).
- del Río L. A., Sandalio L. M., Corpas F. J., Palma J. M., Barroso J. B.: Plant Physiol. 141, 330 (2006).
- Gill S. S., Tuteja N.: Plant Physiol. Biochem. 48, 909 (2010).
- Santabarbara S., Agostini G., Casazza A. P., Syme C. D., Heathcote P., Böhles F., Evans M. C. W., Jennings R. C., Carbonera D.: Biochim. Biophys. Acta 1767, 88 (2007).
- Etinski M., Petković M., Ristić M. M.: J. Serb. Chem. Soc. 78, 1775 (2013).
- Krieger-Liszkay A.: J. Exp. Bot. 56, 337 (2005).
- Knauer S., Knauer K.: J. Phycol. 44, 311 (2008).
- Sandiningtyas R. D., Suendo V.: *Proceedings of the 3rd International Conference on Mathematics and Natural Sciences, Indonesia, 23 – 25. Nov. 2010*, Science for Suitable Development (Khodijah S., Ihsanawati C., ed.), str. 859.
- Trebst A., Depka B., Holländer-Czytko H.: FEBS Lett. 516, 156 (2002).
- Pospíšil P.: Biochim. Biophys. Acta 1787, 1151 (2009).
- Andosch A., Höftberger M., Lütz C., Lütz-Meindl U.: Int. J. Mol. Sci. 16, 10389 (2015).
- Hossain M. A., Piyatida P., da Silva J. A. T., Fujita M.: J. Bot. 2012, 1.
- Lane T. W., Morel F. M. M.: Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 4627 (2000).
- Ruuska S. A., Badger M. R., Andrews T. J., von Cammerer S.: J. Exp. Bot. 51, 357 (2000).
- Makino A., Miyake C., Yokota A.: Plant Cell Physiol. 43, 1017 (2000).
- Skillman J. B., Griffin K. L., Earll S., Kusama M., v knihe: *Thermodynamics - Systems in Equilibrium and Non-Equilibrium* (Piraján J. C. M., ed.), sv. I, kap. 3, Intechopen, Croatia 2011.
- Gechev T. S., Van Breusegem F., Stone J. M., Denev I., Laloi C.: BioEssays 28, 1091 (2006).
- El-Baky H. A., El Baz F. K., El-Baroty G. S.: Int. J. Agric. Biol., 6, 49 (2004).
- Arora A., Sairam R. K., Srivastava G. C.: Curr. Sci. 82, 1227 (2002).
- Lennicke C., Rahn J., Lichtenfels R., Wessjohann L. A., Seliger B.: Cell Commun. Signaling 13, 1 (2015).
- Ercal N., Guer-Orhan H., Aykin-Burns N.: Curr. Top. Med. Chem. 1, 529 (2001).
- Mendoza-Cózatl D., Loza-Tavera H., Hernández-

- Navarro A., Moreno-Sánchez R.: FEMS Microbiol. Rev. 29, 653 (2005).
38. Yadav S. K.: J. S. Afr. Bot. 76, 167 (2010).
39. Raven J. A., Evans M. C. W., Korb R. E.: Photosynth. Res. 60, 111 (1999).
40. Splittgerber A. G., Tappel A. L.: Arch. Biochem. Biophys. 197, 534 (1979).
41. Cirulis J. T., Scott J. A., Ross G. M.: Can. J. Physiol. Pharmacol. 91, 15 (2013).
42. Chen P., Powell B. A., Mortimer M., Ke P. C.: Environ. Sci. Technol. 46, 12178 (2012).
43. Ploug H., Stolte W., Jørgensen B. B.: Limnol. Oceanogr. 44, 1959 (1999).
44. Kalin M., Wheeler W. N., Meinrath G.: J. Environ. Radioact. 78, 151 (2005).
45. González-Guerrero M., Escudero V., Saéz Á., Tejada-Jiménez M.: Front. Plant Sci. 7, 1 (2016).
46. González-Dávila M.: Mar. Chem. 48, 215 (1995).
47. Perales-Vela H. V., Peña-Castro J. M., Cañizares-Villanueva R. O.: Chemosphere 64, 1 (2006).
48. Le Faucheur S., Schildknecht F., Behra R., Sigg L.: Aquat. Toxicol. 80, 355 (2006).
49. Ahner B. A., François, Morel M. M.: Limnol. Oceanogr. 40, 658 (1995).
50. Nagalakshmi N., Prasad M. N. V.: Bull. Environ. Contam. Toxicol. 61, 623 (1998).
51. Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V.: Ann. Bot. 91, 179 (2003).
52. Hayat S., Hayat Q., Alyemeni M. N., Wani A. S., Pichtel J., Ahmad A.: Plant Signaling Behav. 7, 1456 (2012).
53. Maršálek B., Rojíčková R.: Z. Naturforsch. 51c, 646 (1996).
54. El-Enany A. E., Issa A. A.: Folia Microbiol. 46, 227 (2001).

A. Filová, A. Fargašová, and M. Molnárová
(Department of Environmental Ecology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University Bratislava): **Defensive Mechanisms of Phytoplankton against Oxidative Stress Caused by Heavy Metals**

The replacement of essential elements by heavy metals exercise an influence on phytoplankton ultrastructure and metabolism. When metals enter into the algal cells, they transform some biological ultrastructures, e.g. chlorophylls. Created metallo-biomolecules retain energy and block the electron transport chain. Increased generation of reactive oxygen forms is a result of abnormal metabolic activities and reactive oxygen species may cause a denaturation of biomolecules. Phytoplankton alleviates the toxicity of metals and oxidative stress through enhancing the defensive mechanisms. Production of phytochelatins is involved in the protection against the replacement of essential element by toxic metals. Antioxidants, such as superoxide dismutase, catalase, ascorbic acid, glutathione, and many peroxidases protect phytoplanktonic cells against oxidative stress.