UNIVERZITET CRNE GORE

 Prirodno-matematički fakultet

 Odsjek za biologiju

SEMINARSKI RAD: ***MEHANIZMI ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE I NJIHOVA ULOGA U ODGOVORU NA STRESNE USLOVE SREDINE***

Predmet: Ekofiziologija

Student: Orhan Ibrahimovic 5/17 Profesor: Dr Dragana Petrović

Školska godina 2017/18

Reaktivne vrste kiseonika (ROS – eng. Reactive Oxygen Species) su djelimično redukovane forme atmosferskog kiseonika. Formiraju se ili ekscitacijom O2, pri čemu nastaje singletni kiseonik (1O2), ili sukcesivnim monovalentnim redukcijama tokom kojih nastaju superoksid (·O2 -), hidrogen peroksid (H2O2), i hidroksil radikal (OH-). Za razliku od atmosferskog kiseonika, ROS mogu nerestriktivno oksidovati različite biomolekule i tako izazvati oštećenje ćelije (Mittler, 2002; Apel i Hirt, 2004). Zbog velike reaktivnosti prema svim ćelijskim komponentama, ROS se, generalno, smatraju štetnim sporednim produktima aerobnog metabolizma, čija produkcija bi trebalo da se po svaku cijenu umanji ili onemogući. Međutim, danas je poznato da su ROS veoma moćni signalni molekuli koji regulišu brojne biološke procese kao što su rast, ćelijski ciklus, ćelijska programirana smrt i aklimatizacioni odgovor na abiotički i biotički stres (Dat i sar, 2000; Mittler, 2002; Apel i Hirt, 2004; Desikan i sar, 2005; Gechev i sar, 2006; Foyer i Shigeoka, 2011). Naročito je važna produkcija ROS indukovana svjetlošću, jer obezbjeđuje biljnoj ćeliji esencijalnu informaciju o neravnoteži između procesa proizvodnje i procesa potrošnje energije (Foyer i Shigeoka, 2011). Zbog dvostruke uloge koju ROS imaju u biljnoj ćeliji, kao veoma reaktivne toksične vrste i kao signalni molekuli, neophodna je precizna regulacija njihovog nastanka i razgradnje (slika 1.). Mehanizmi koji omogućavaju smanjenje proizvodnje ROS tokom stresa uključuju: anatomske adaptacije (pokreti listova, različite zaštitne epidermalne stukture ili zaštita stoma u specifičnim strukturama), fiziološke adaptacije (C4 i CAM metabolizam) i molekularne mehanizme koji omogućavaju rearanžman fotosintetskog aparata u skladu sa dostupnom količinom svjetlosti ili potpunu supresiju fotosinteze (Mooney i sar, 1977; Coupe i sar, 2006; Mittler, 2006; Miyazawa i sar, 2006; Lambers, Chapin i Pons, 2008). Mehanizmi koji omogućavaju aktivno uklanjanje ROS sastoji se iz enzimske i neenzimske komponente (Mittler, 2002; Mittler, 2006). U enzimske mehanizme spadaju: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), askorbat peroksidaza (APX), glutation reduktaza (GR), peroksidaze III klase (POD), monodehidroaskorbat reduktaza (MDHAR), dehidroaskorbat reduktaza (DHAR), glutation peroksidaza (GPX) i glutation S-transferaza. Neenzimsku komponentu čine: askorbat, glutation, α-tokoferol, karotenoidi i fenolna jedinjenja (Mittler, 2002; Apel i Hirt, 2004; Grace, 2005).

**Slika 1. Mehanizmi proizvodnje, uklanjanja i izbjegavanja ROS kod biljaka( prema Mittler, 2002)**

****

Skraćenice: Apo, apoplast; Chl, hloroplast; CW, ćelijski zid; Cyt, citoplazma, ET, transport elektrona; Mit, mitohondrije; Per, peroksizom; PM, plazma membrana; PS, fotosistem; Vac, vakuola.

**ENZIMSKI MEHANIZMI ANTIOKSIDATIVNE ZASTITE: STRUKTURA, FUNKCIJA, LOKALIZACIJA I REGULACIJA**

Biljke aktivno proizvode ROS kao signalne molekule koji učestvuju u regulaciji odgovora na abiotički stres, programiranu ćelijsku smrt i odbranu od patogena. Kako bi održale delikatnu ravnotežu u produkciji ROS, koji imaju signalnu ulogu, i uklanjanju viška ROS, koji nastaju kao posledica oksidativnog stresa, biljke su razvile složenu mrežu antioksidativnih enzima (Slika 1.6.1). Najznačajniji antioksidativni enzimi su: SOD, CAT, APX, GR i POD (Mittler, 2002; Suzuki i Mittler, 2006; Foyer i Shigeoka, 2011).



**Slika 2**. **Uloga ROS i antioksidanata u regulaciji redoks-homeostaze ćelije tokom odgovora na stres. Povećana oksidacija dovodi do programirane ćelijske smrti (A) ili povećane otpornosti na stres (B), u zavisnosti od intenziteta signala i prirode signalnog puta koji se aktivira (prema Foyer i Shigeoka, 2011**).

Tokom djelovanja abiotičkog i biotičkog stresa, dolazi do akumulacije ROS, ali se ćelijski odeljci u kojima se formiraju ROS, kao i dinamika nastanka i razgradnje ROS veoma razlikuju. U toku trajanja stresa, povećana količina ROS u ćeliji ne mora biti samo simptom disfunkcionalnosti ćelije, već predstavlja signal koji pokreće odgovor na stres i prilagođava ćelisku mašineriju na izmenjene uslove staništa. ROS moduliraju brojne puteve prenosa signala, kao što su kaskadna transdukcija signala regulisana proteinskim kinazama koje aktivira mitogen i aktivnost transkripcionih faktora (Suzuki i Mittler, 2006; Jaspers i Kangasjärvi, 2010; Foyer i Shigeoka, 2011).

 ***Superoksid dismutaza***

Superoksid dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1) je metaloenzim koji predstavlja prvu liniju odbrane od toksičnih efekata povišenog nivoa ROS (Scandalios, 1993). SOD katalizuje dismutaciju ·O2 - pri čemu nastaju H2O2 i O2:

**·O2 - + ·O2 - + 2H+ → 2H2O2 + O2;**

Uklanjanjem ·O2 - SOD umanjuje mogućnost nastanka ·OH putem HaberWeiss reakcije koja je katalizovana metalima. Na osnovu metala koji sadrži kofaktor SOD se dijele na tri forme: Cu/Zn-SOD, Fe-SOD i Mn-SOD. Kod viših biljaka Cu/Zn-SOD i Fe-SOD su dimeri, dok je Mn-SOD tetramer (Bowler i sar, 1994; Alscher i sar, 2002). Mn-SOD se nalazi u mitohondrijama i peroksizomima, Cu/Zn-SOD je karakteristična za citoplazmu i hloroplaste, dok se Fe-SOD nalazi u hloroplastima ali nije univerzalno prisutan kod svih viših biljaka. Sva tri tipa SOD su proteini kodirani jedarnim genima i mogu se identifikovati na osnovu osetljivosti prema inhibitorima KCN i H2O2. Mn-SOD je otporan na oba inhibitora, Cu/Zn-SOD je osetljiv na oba inhibitora, dok je Fe-SOD osetljiv na H2O2 i otporan na KCN. Zastupljenost SOD u skoro svim ćelijskim odeljcima je neophodna zbog nepropustljivosti fosfolipidnih membrana za superoksid (Takahashi i Asada, 1983). SOD je prisutna kod svih aerobnih organizama i smatra se da ima centralnu ulogu u zaštiti od oksidativnog stresa (Scandalios, 1993; Bowler i sar, 1994; Alscher i sar, 2002). Na 25 osnovu poređenja sekvenci aminokiselina, smatra se da Mn-SOD i Fe-SOD imaju slično poreklo i da su nastale mnogo pre Cu/Zn-SOD, koja je evoluirala nezavisno kod eukariota (Kanematsu i Asada, 1990). Do danas, brojne studije su pokazale da se aktivnost SOD povećava kao odgovor na različite stresore (visok intenzitet svetlosti, suša, parakvat, teški metali).

 ***Askorbat peroksidaza***

Superfamilija peroksidaza dijeli se na tri klase. Zajedničko za sve tri klase je postojanje hem grupe koju čine protoporfirin IX i Fe3+, kao i slična trodimenzionalna struktura (Welinder i sar, 2002). Peroksidaze klase I, u koje spada i askorbat peroksidaza, prisutne su kod svih organizama izuzev životinja, i njihova osnovna uloga je detoksifikacija H2O2 (Passardi i sar, 2007). Klasa II peroksidaza karakteristična je za gljive. Peroksidaze III klase (POD, EC 1.11.1.7), glikoproteini koji sadrže hem grupu, prisutne su kao velike multigenske familije kod svih terestričnih biljaka. Askorbat peroksidaza (APX, EC 1.11.1.11) ima ključnu ulogu u finoj modulaciji količine H2O2 kod biljaka, za razliku od katalaze koja uklanja višak H2O2 tokom stresa (Mittler, 2002). Ova peroksidaza uklanja H2O2 koristeći askorbat (Asc) kao donor elektrona, pri čemu nastaje dehidroaskorbat (DHA): H2O2 + Asc → 2H2O + DHA; Askorbat peroksidaza je veoma osetljiva na smanjenu koncentraciju Asc. Na primer, ukoliko je koncentracija askorbata manja od 20 µM izoforme APX karakteristične za hloroplaste brzo gube aktivnost (Mittler i Zilinskas, 1993; Shigeoka i sar, 2002; Foyer i Shigeoka, 2011). Postoji najmanje pet izoformi APX koje se nalaze u različitim ćelijskim odeljcima, citoplazmi, membrani tilakoida, stromi hloroplasta i membrani peroksizoma (Scandalios, 1993; Asada, 1999; Logan i sar, 2006). Izoforme APX razlikuju se po molekulskoj težini, optimalnoj pH, stabilnosti i specifičnosti za supstrate. Do povećane ekspresije gena koji kodiraju askorbat peroksidaze dolazi u uslovima stresa kao što su mehaničke povrede, patogeni, zračenje, vodni deficit, atmosfersko zagađenje i toksični efekti metala (Mittler i Poulos, 2005; Logan i sar, 2006).

  ***Katalaza***

Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6) je tetramerni enzim koji sadrži hem kao kofaktor i vrši uklanjanje H2O2 iz ćelije:

2H2O2 → H2O + O2;

Ovaj enzim predominantno se nalazi u peroksizomima i učestvuje u razgradnji H2O2 koji nastaje tokom glioksalatnog ciklusa fotorespiracije, katabolizma purina i kao posledica aktivnosti oksidaza uključenih u β–oksidaciju masnih kiselina (Willekens i sar, 1997; Feierabend, 2005; Engel i sar, 2006). CAT ima veoma nizak afinitet prema H2O2 (u mM opsegu) i veliku brzinu reakcije (Mittler, 2002; Engel i sar, 2006). CAT je veoma fotosenzitivan enzim i ima visoku stopu sinteze i razgradnje slično kao i D1 protein fotosistema II (Hertwig i sar, 1992; Feierabend, 2005). Zbog toga stresni uslovi koji dovode do smanjene sinteze proteina kao što su osmotski stres, visoke i niske temperature dovode do smanjenja aktivnosti CAT. Dosadašnja istraživanja su utvrdila postojanje tri klase CAT, koje su kodirane različitim genima kod viših biljaka. Prema podeli koju su predložili Willekens i sar (1995) klasu I čine katalaze koje se eksprimiraju u fotosintetičkim tkivima, CAT klase II su aktivne u vaskularnim tkivima, dok su CAT klase III specifične za reproduktivna tkiva i semena (Mhamdi i sar, 2010; Hu i sar, 2010).

 ***Glutation reduktaza***

Glutation reduktaza (GR, EC 1.6.4.2) je po strukturi homodimerni flavoprotein. Ova oksidoreduktaza zastupljena je i kod prokariota i eukariota (Edwards i sar, 1990; Lascano i sar, 2003). Spada u enzime askorbat-glutation ciklusa. Ima ključnu ulogu u održavanju količine redukovanog glutationa (GSH) i na taj način reguliše redoks status ćelije. GR katalizuje redukciju oksidovanog glutationa zavisnu od NADPH:

 **GSSG + NADPH → 2GSH + NADP+;**

Ovaj enzim se predominantno nalazi u hloroplastima ali su poznate i mitohondrijalne i citosolne izoforme (Creissen i sar, 1995; Chew i sar, 2003; Lascano i sar, 2003).

 ***Peroksidaze III klase***

Peroksidaze III klase (POD, EC 1.11.1.7) su glikoproteini koji kod terestričnih biljaka čine veliku multigensku familiju. Smatra se da su imale važnu ulogu u kolonizaciji kopnenih staništa, preko formiranja rigidnih potpornih struktura, i u adaptaciji na sredinu obogaćenu kiseonikom (Passardi i sar, 2004; Cosio i Dunand, 2009). Nalaze se u vakuolama, ćelijskom zidu i endoplazmatičnom retikulumu i odlikuje ih visoka termalna stabilnost (Takahama i Egashira, 1991; Passardi i sar, 2005). Peroksidaze klase III katalizuju redukciju H2O2, a kao donore elektrona mogu da koriste različite supstrate, kao što su fenolna jedinjenja, prekursori lignina i auksin (Takahama i Oniki, 1997; Hiraga i sar, 2001; De Gara, 2004; Passardi i sar, 2005). Takođe, dovode i do produkcije H2O2 putem oksidacije NADH tokom oksidativnog praska i izduživanja ćelije (Otter i Polle, 1997; Passardi i sar, 2005; Cosio i Dunand, 2009). Kod viših biljaka POD imaju višestruku ulogu. Učestvuju u metabolizmu ćelijskog zida, rastu ćelija, detoksifikaciji H2O2, katabolizmu auksina, oksidaciji toksičnih jedinjenja, zaštiti od patogena, mehaničkih povreda i oksidativnog stresa, simbiozi i senescenciji (Passardi i sar, 2005; Cosio i Dunand, 2009). Raznovrsnost procesa koje katalizuju peroksidaze III klase kao i veliki broj gena koji ih kodira ukazuju na postojanje funkcionalne specijalizacije ovog enzima, što potvrđuje činjenica da sekvence peroksidaza imaju i konzervativne i varijabilne regione (Welinder i sar, 2002; Cosio i Dunand, 2009).

NEENZIMSKI MEHANIZMI ANTIOKSIDATIVNE ZASTITE

Oksidacione reakcije su osnova metaboličkih procesa ali istovremeno mogu dovesti do oštećenja ćelija, zbog čega su biljke razvile veliki broj različitih neenzimskih antioksidanata koji se još nazivaju i antioksidanti male molekulske mase. Neenzimski antioksidanti se dijele na dve grupe: hidrofilne i hidrofobne. Hidrofilni antioksidanti (glutation, askorbinska kiselina i fenolna jedinjenja) su rastvorljivi u vodi i omogućavaju uklanjanje reaktivnih vrsta kiseonika u citosolu biljne ćelije. Hidrofobni antioksidanti (tokoferoli i karotenoidi) su rastvorljivi u lipidima i štite ćelijske membrane od oksidativnih oštećenja (Noctor i Foyer, 1998; Dias i sar, 2011; Foyer i Shigeoka, 2011). Biljke proizvode veliki broj organskih jedinjenja, tzv. sekundarnih metabolita, koja ne učestvuju direktno u rastu i razviću, ali posreduju u interakcijama između biljaka i njihove životne sredine i značajno doprinose otpornosti biljaka na nepovoljne sredinske uslove. Takođe, utvrđeno je da neka od ovih jedinjenja imaju antioksidativna svojstva, tj. mogu učestvovati, direktno ili posredno, u zaštiti biljaka od reaktivnih vrsta kiseonika. Na osnovu biosintetskog puta, sekundarni metaboliti se dele na: alkaloide, terpenoide i fenolna jedinjenja. Glavne grupe fenolnih jedinjenja su: hidroksicinamične kiseline, flavonoidi, antocijani i tanini. Najveći procenat fenolnih jedinjenja čine strukturni polimeri, kao što su lignin i suberin, koji obezbjeđuju mehaničku potporu biljkama. Funkcija nesrukturnih fenolnih jedinjenja je manje očigledna, ali sve je više studija koje ukazuju na njihovu važnu ulogu u aklimatizaciji biljaka na stresne uslove sredine (Sakihama i sar, 2002; Grace, 2005; Li i sar, 2006).

Neenzimska komponenta antioksidativnog odbranbenog sistema uključuje glavne celularne redoks puferske askorbate (AsA) i glutation (g-glutamil-cisteinil-glicin, GSH) kao i tokoferol, karotenoide i fenolna jedinjenja. Oni komuniciraju sa brojnim celularnim komponentama i pored ključnih uloga u odbrani i kao enzimski kofaktori, ovi antioksidanti utiču na rast i razvoj biljaka modulacijom procesa od mitoze i elongacije ćelija do starenja i smrti ćelije.

 ***Fenolna jedinjenja kao antioksidanti***

Terminom fenolna jedinjenja (eng. phenolics, polyphenols, phenolic compounds) označavaju se sva hemijska jedinjenja koja sadrže najmanje jedan aromatični ugljovodonični prsten za koji je vezana jedna ili više hidroksilnih grupa (Sakihama i sar, 2002). Kod biljaka, solubilna fenolna jedinjenja su jedna od najzastupljenijih i najraznovrsnijih grupa supstanci koja po strukturi variraju od malih, relativno jednostavnih molekula (npr. salicilna kiselina) do složenih polimera kao što su suberin i lignin (Sakihama i sar, 2002; Grace, 2005; Li i sar, 2006). Spadaju u neenzimske antioksidante i veoma su važni za očuvanje fizioloških funkcija biljke tokom stresnih ekoloških uslova sredine (Grace, 2005). Poznato je da fenolna jedinjenja predstavljaju glavnu zaštitu biljaka od patogena, ali su novija istraživanja pokazala da imaju podjednako važnu ulogu i u sprečavanju štetnih posledica oksidativnog stresa. Fenoli su veoma efikasni u apsorpciji viška svetlosne energije, naročito u UV delu spektra, čime ublažavanju negativne posledice oksidativnog stresa (Grace i sar, 1998; Grace, 2005; Neill i Gould, 2003). Takođe, fenolna jedinjenja mogu uklanjati ROS direktno, delujući kao antioksidanti, ili indirektno, kao supstrati antioksidativnih enzima (Sakihama i sar, 2002; Grace, 2005). Antocijani su grupa pigmenata flavonoida rastvorljivih u vodi koji, zavisno od pH, mogu biti crvene, ljubičaste ili plave boje (Harborne, 1988). Mogu se naći u svim tkivima viših biljaka, uključujući cvjetove, plodove, listove, izdanke i korjenove. Sintetišu se u citoplazmi, a zatim se akumuliraju u vakuolama (Conn i sar, 2003). Antocijani daju karakterističnu boju cvjetovima i plodovima, čime doprinose privlačenju životinja koje su vektori za oprašivanje i rasejavanje semena. Ekološka i fiziološka funkcija antocijana u vegetativnim strukturama je manje poznata (Gould i sar, 2002; Steyn i sar, 2002; Close i Beadle, 2003; Hughes i Smith, 2007; Hatier i Gould, 2008). Ekspresija antocijana u vegetativnim strukturama varira u zavisnosti od biljne vrste. Kod nekih vrsta su stalno prisutni, dok se kod drugih sintetišu samo u određenim ontogenetskim fazama listova, ili u uslovima stresa (Chalker-Scott, 1999; Steyn i sar, 2002; Merzlyak i sar, 2008). Generalno, antocijani se akumuliraju u fotosintetskim tkivima izloženim visokim intenzitetima svetlosti, kao što su adaksijalni sloj epidermisa i gornji slojevi mezofila listova (Neill i Gould, 2003; Hughes i Smith, 2007). Sve je više studija koje ukazuju da antocijani imaju važnu funkciju u zaštiti biljnih ćelija od brojnih abiotičkih stresora (visoki intenzitet svjetlosti, UV radijacija, ekstremne temperature, deficit vode i teški metali) koji dovode do oksidativnog stresa (Chalker-Scott 1999, Neill i Gould, 2003; Steyn i sar, 2002; Hughes i Smith, 2007). Antocijani ublažavaju oksidativni stres na dva načina: direktno ukljanjaju ROS, djelujući kao antioksidanti ili apsorpcijom svetlosti štite biljaku od štetnih efekata visokih intenziteta vidljive i UV svetlosti (Neill i Gould, 2003; Petrini i sar, 2002).



Slika 3. Strukture nekih fenolnih jedinjenja u biljkama

Kao snazni antioksidanti, fenolna jedinjenja razliĉitim mehanizmima neutrališući slobodne radikale u ćelijama, umanjuju lipidnu peroksidaciju ćelijske membrane, mogu da spriječe oksidativna oštećenja DNK i širenje tumora (Havsteen, 2002). Fenolna jedinjenja kao antioksidanti, mogu uticati i na primarni proces starenja, mogu biti efikasni inhibitori oksidacije LDL, a epidemiološka prouĉavanja pokazuju inverzni odnos izmedju unosa hrane bogate flavonoidima i kardiovaskularnih oboljenja. Svi ovi podaci ukazuju na to da povećana konzumacija voća i povrća bogatog nutritivnim sastojcima koji ispoljavaju antioksidativna svojstva moze doprineti poboljšanju kvaliteta zivota. Nutricionisti procenjuju da je dnevni unos flavonoida putem hrane oko 1-2 grama (Havsteen, 2002).

 ***Askorbat***

 Askorbinska kiselina (vitamin C) jedan od najačih antioksidanata, može da redukuje mnoge slobodne radikale. Direktno može da bez učešća enzima skuplja ROS, indirektno α-tokoferol vraća u aktivnu, redukovanu formu. Reaguje sa slobodnim radikalima, redukuje vodonik peroksid i učestvuje u askorbatglutation ciklusu (ASH-GSH). U hloroplastima kao kofaktor enzima violaksantin de-epoksidaza indirektno učestvuje u ksantofil ciklusu (mehanizam zaštite od fotooksidacije). Askorbinska kiselina je donor elektrona u brojnim enzimskim i neenzimskim reakcijam tokom kojih se uklanjaju ROS.

Askorbat (AsA) je najambundantniji antioksidant male molekularne težine koji ima ključnu ulogu u odbrani od oksidativnog stresa uzrokovanog povećanim nivoom ROS. AsA se smatra moćnim antioksidantom zbog svoje sposobnosti da donira elektrone u nizu enzimskih i neenzimskih reakcija. Pokazalo se da AsA igra značajnu ulogu u nekoliko fizioloških procesa u biljkama, uključujući rast, diferencijaciju i metabolizam. Većina AsA u biljkama doprinosi D-manozu / L-galaktou koji se obično naziva Smirnoff-Vheeler put kojim se nastavlja preko GDP-D-manoze, GDP-L-galaktoze, L-galaktoze I L-galaktono-1,4-lakton . AsA se takođe sintetiše putem intermedijera uronske kiseline, D-galakturonska kiselina. Na ovom putu je D-galakturonska kiselina se konvertuje u L-galaktonsku kiselina reduktazom galakturonske kiseline, koja se zatim pretvara u L-galaktono-1,4-lakton. The L-galaktono-1,4-lakton se dalje oksiduje u AsA pomoću Lgalactono-1,4-laktona dehidrogenaze (GALDH) enzima. To se sintetiše u mitohondrijama pomoću L-galaktono-g-laktona dehidrogenaze i transportuje se do ostalih ćelijskih komponenti kroz protonsko-elektrohemijski gradijent ili oakšanom difuzijom. Detektuje se u većini postrojenja celije, organelama i u apoplastu u biljkama i utvrđeno je da je posebno obilan u fotosintetičkim tkivima. Većina AsA-a, gotovo više od 90%, lokalizovana je u citoplazmi, ali za razliku od drugih rastvorljivih antioksidanata, značajan dio se prenosi u apoplast, gde je prisutan u milimolarnoj koncentraciji. Veruje se da apoplast AsA da predstavljaju prvu liniju odbrane od potencijalno štetnih spoljnih oksidanata. AsA štiti kritične makromolekule od oksidativnog oštećenja. U normalnom fiziološkom stanju, AsA uglavnom postoji u smanjenoj kolicini u hloroplastu, gde takođe deluje kao kofaktor violaksantina de-epoksidaza, čime se održava rasipanje viška ekscitacije energije. Obezbjeđuje zaštitu membrane direktno reagujuci sa O2 • -, H2O2 i regenerisući a-tokoferol od tokoferoksil radikala i čuva aktivnost enzima jonske proteze proteinskih metala . AsA ima ključnu ulogu u uklanjanju H2O2 preko AsAGSH ciklus. Oksidacija AsA se javlja u dva uzastopna koraka, prvo se proizvede monodihidroaskorbat (MDHA), a zatim naknadno dehidroaskorbat (DHA). U AsA-GSH ciklus, dva molekula AsA koriste APKS za smanjenje H2O2 i vodu uz istovremenu generaciju MDHA. MDHA je radikal sa kratkim trajanjem života i može spontano dismutirati u DHA i AsA ili se svodi na AsA pomoću NADP (H) zavisnog enzima MDHAR. DHA je takođe veoma nestabilan kod pH vrednosti veće od 6,0 i raspada se na tartarat i oksalat. Da bi se ovo sprečilo, DHA se brzo smanjuje na AsA pomoću enzima DHAR-a koji dovodi do smanjenja ekvivalenata iz GSH. Nivo AsA pod ekološkim stresom zavisiod ravnoteže između stope i kapaciteta AsA biosinteze i prometa na antioksidativnu potražnju. Prevelika ekspresija enzima uključenih u Asin biosintezu daje abioticnu toleranciju na stress u biljkama. BDP-Manoza 3 , 5 -epimeraza (GME) katalizuje konverziju BDP-D-manoze u GDP-L-galaktozu, važan korak na putu Smirnoff-Vheeler AsA biosinteze u višim biljkama. Prevelika ekspresija dva člana GME familije gena rezultirace povećanjem akumulacije askorbata I poboljšanjem tolerancije prema abioticima dokazano u biljci paradajza. Povećan AsA sadržaj pokazao se da povecava toleranciju na oksidativni stress kod ***Arabidopsis***. Utc-1 mutant,nastao nedostatkom aktivnosti BDP-manoze pirofosforilaze, enzima pronađenog u početnom dijelu puta biosinteze askorbata ranije, postaje posvećen sintezi askorbata da bude osjetljiviji na dodatni UV-B tretman nego biljke divljih vrs



Slika 3. Sematski prikaz biosinteze askorbata

 ***Glutation***

Glutation je tripeptid (glutaminska kiselina-cisteinglicin); u oksidovanom obliku dva molekula glutationa su vezana preko sumpora (GSSG). Centralna uloga GSH je u regeneraciji askorbinske kiseline. Učestvuje u regulaciji transporta sulfata, transdukciji signala, konjugaciji metabolita i detoksikaciji kao i regulaciji ekspresije gena tokom stresa. Može direktno da uklanja ROS, stabilizuje membrane tako što uklanja acil-perokside nastale tokom peroksidacije lipida.

Tripeptid glutation (g-glutamilcisteinil-glicin, GSH) je jedan od ključnih molekula niske molekulske mase. To je neproteinski tiol koji igra važnu ulogu intracelularne odbrane od oksidativnog oštećenja izazvanog ROS-om. Otkriven je praktično u svim ćelijskim odeljcima:citozolu, hloroplastima, endoplazmatskom retikulumu, vakuoli, i mitohondriji. GSH se sintetiše u citosolu i hloroplastima biljnih ćelija pod dejstvom enzima izoforme g-glutamil-cisteinil sintetaze (g-ECS) I glutation sintetaze (GS). Ravnoteža između GSH i glutation disulfida (GSSG) je centralna komponenta održavanja ćelijskog redoks stanja. Zbog svoje smanjene snage, GSH igra važnu ulogu u različitim biološkim procesima, uključujući rast i diobu ćelija, regulaciju transporta sulfata, transdukcija signala, konjugacija metabolita, enzimska regulacija, sinteza proteina i nukleinskih kiselina. GSH funkcioniše kao antioksidant na mnogo načina. Može reagovati hemijski sa O2 • -, • OH, H2O2 i, stoga, može funkcionisati direktno kao slobodni radikal. GSH može zaštititi makromolekule (tj. proteine, lipide, DNK) djelovanjem kao protonski donor u prisustvu ROS ili organskih slobodnih radikala, pri cemu nastaje GSSG. Može da učestvuje u regeneraciji još jednog potencijalnog antioksidanta AsA, preko AsA-GSH ciklusa. GSH reciklira AsA iz njegove oksidacije do smanjenog oblika pod dejstvom enzima enzim DHAR. GSH takođe može smanjiti DHA neenzimski mehanizam pri pH> 7 i pri koncentraciji GSH veće od 1 mM. Ovo može biti značajan put u hloroplastima, gde u prisustvu svetlosti, pH ostaje oko 8, a koncentracija GSH može biti i visoka 5 mM. Generisanje i održavanje smanjene kolicine GSH, bilo de novo sintezom ili recikliranjem od strane GR, koristeći NADPH kao kofaktor i donor elektrona, od vitalnog je značaja za ćeliju. Uloga GSH u antioksidativnom odbrambenom sistemu daje razloge za njegovu upotrebu kao stress markera. Kada je u eksperimentu kod jabuka proglašena progresivna suša, početni odgovor je bio mala oksidacija GSH, praćena povećanjem koncentracije GSH. Kada se stres povećao, koncentracije GSH su opale i redoks stanje se oksidovalo, što je obilježilo degradaciju sistema. Slično stesu susom, izmenjen odnos GSH / GSSG je primećen kod biljaka za vrijeme različitih stresnih stanja kao što je zasljanjenost, hladnoce kao i i toksičnosti metala.

 ***Tokoferoli*** ***(a, b, g, i d)***

Tokoferoli su lipofilni antioksidanti koji su esencijalne komponente bioloških membrana. Najpoznatiji je α-tokoferol (E vitamin), njegova visoka antioksidativna aktivnost uslovljena je prisustvom tri metil grupe. Redukuje perokside polinezasićenih kiselina, sprečava autooksidaciju lipida odnosno utiče na stabilnost membrana.

Tokoferoli predstavljaju grupu lipofilnih antioksidanata uključenih u čišćenje slobodnih radikala kiseonika, peroksid radikala lipida i 1O2. Relativna antioksidativna aktivnost izomera tokoferola in vivo je a> b> g> d koji je rezultat metilacije uzoraka i količine metil grupa vezanih za fenolni prsten strukture polarne glave. Stoga, a-tokoferol sa svoja tri metilna supstituenta ima najveću antioksidativnu aktivnost od svih tokoferola. Tokoferole sintetišu samo fotosintetski organizmi i prisutni su samo u zelenim delovima biljaka. Tokoferolov biosintetički put koristi dva jedinjenja homogentisana kiselina (HGA) i fitil difosfat (PDP) kao prekursori. Najmanje 5 enzima 4-hidroksifenilpiruvata dioksigenaze (HPPD), homogentizovane fitil transferase. Poznato je da tokoferoli štite lipide I ostale komponente membrane fizičkim gašenjem I hemijski reaguju sa O2 u hloroplastima, čime se štiti struktura i funkcija PSII. Tokoferoli sprečavaju korak širenja lanca u autoksidaciji lipida koji ga čini je efektivnom slobodno radikalnom zamkom.

 ***Karotenoidi***

Karotenoidi (karoteni i ksantofili) pripadaju grupi izoprenoidnih jedinjenja. U hloroplastima učestvuju u zaštiti fotosistema, tako što uklanjaju ROS koji nastaju tokom ekscitacije hlorofila. Mogu da reaguju sa singlet kiseonikom i da višak energije oslobode u vidu toplote ili preko ciklusa ksantofila.

 Karotenoidi takođe pripadaju grupi lipofilnih antioksidanata i mogu da razbiju različite oblike ROS. Karotenoidi se nalaze u biljkama, kao i mikroorganizmima. U biljkama, karotenoidi apsorbuju svetlost u regionu između 400 i 550 nm vidljivog spektra i prenose zarobljenu energiju u Chl. Karotenoidi takođe služe kao prekursori za signalizaciju molekula koji utiču razvoj biljaka i imaju ulogu u biotickiom ili abiotskom odgovoru na stres.

 ***Prekomerna proizvodnja ROS u stresnim uslovima***. Proizvodnja ROS u biljkama u normalnim uslovima je mala. Međutim, kao odgovor na različite sredinske promjene, ROS se drastično povećava u biljkama, ometajući normalnu ravnotežu O2 • -, • OH, i H2O2 u intracelularnom okruženju. Efekti raznih sredinskih stresova kao što su suša, zaslanjenost tla, hladnoca, toksičnost metala, UV-B zračenje i napad patogena razmatrana je u nastavku.

***Suša***. Pod stresom suše, proizvodnja ROS povecava se na nekoliko načina. Inhibicija asimilacije ugljen dioksida, zajedno sa promenama u aktivnosti fotosintetičkog transportnog kapaciteta za vrijeme suše rezultira ubrzanom proizvodnjom ROS-a putem hloroplast Mehlerove reakcije. Tokom suše, fiksiranje CO2 je ograničeno zbog zatvaranja stoma, zauzvrat, dolazi do smanjenja NADP + regeneracije kroz Calvinov ciklus. Zbog nedostatka akceptora elektrona dolazi do smanjenja fotosintetičkog ETC-a veci transporta elektrona na O2 pomoću Mehlerove reakcije. Fotosintetika aktivnost je inhibirana u biljnim tkivima zbog neuravnoteženosti između apsorpcije svjetlosti I njenog koriscenja za vrijeme suse. Rasipanje viška svjetlosne energije u PSII jezgro i anteni dovode do stvaranja ROS-a koja mogu biti opasni za vrijeme stresa suše. Pod stresom suše, fotorespiratorni put takođe je poboljšan, naročito kada je oksigenacija RUBP maksimalna, zbog ograničenja u fiksiranju CO2. Noctor i saradnici procijenili su da za vrijeme fotorespiracije, da više od 70% ukupne proizvodnje H2O2 nastaje pod uslovima stresa izazvanog susom.

Povećana proizvodnja ROS-a dovodi do oksidativnog stresa biljke za vrijeme njenog rasta.. Za borbu protiv opasnosti od strane ROS-a, biljke poseduju različite enzime za čišćenje i metabolizam.

***Zaslanjenost tla***. Stres zaslanjenoscu tla rezultira prekomernom generacijom ROS-a. Dolazi zbog visokih koncentracija soli do prekomerne proizvodnje ROS-O2 • -, • OH, H2O2 i 1O2, sto izaziva poremecaj celularnog transporta elektrona kroz različitie subcelularne odeljke kao što su hloroplasti i mitohondrije, kao i do indukovanja metaboličkih puteva kao što je fotorespiracija. Stres zaslanjenoscu može dovesti do zatvaranja stoma, što smanjuje raspoloživost CO2 listovima i inhibira fiksiranje ugljenika, što uzrokuje izlaganje hloroplasti prekomjernoj energiji I dolazi do prekomjerne redukcije sistema za transport elektrona, poboljšana je generacija ROS-a i indukovan je oksidativni stres. Nizak odnos CO2 / O2 u hloroplastima takođe daje prednost fotorespiraciji, što dovodi do povećane proizvodnje ROS kao što je H2O2.

***Mrznjenje***. Stres mrznjenja je ključni faktor koji ograničava rast i produktivnost biljaka. Stres mrznjenja uzrokuje značajno smanjenja transkripata rbcL i rbcS, sadržaja RUBISCO-a i inicijalne aktivnosti RUBISCO, dovodeći do višeg elektronskog transporta do O2. Akumulacija H2O2 u hloroplastu je u negativnoj korelaciji sa početnom aktivnošću RUBISCO-a I fotosintetičkom stopom. Oksidativni stres izazvan hladnocom očigledno dovodi do povećane akumulacije ROS-a, uključujući H2O2 i O2 • -,dolazi do peroksidacije lipida i oksidacija proteina.

***UV-B zračenje*** na biljkama je opasnost za produktivnost,kao i za globalnu poljoprivredu.Povecano UV-B zracenje značajno inhibira stopu neto fotosinteze. Dokazano je da UV-B zracenje rezultira smanjenjem osvijetljenosti i brzina asimilacije CO2, koja je praćena smanjenjem u brzini karboksilacije i sadržaja i aktivnosti RUBISCO-a. Biljke poseduju antioksidativni enzim oslobadjanja SOD, POD, CAT i APKS i neenzimske antioksidanse, kao što su AsA, GSH i karotenoidi kako bi se održala ravnoteža između proizvodnje i uklanjanja ROS-a.

***Patogeni***. Jedan od prvih ćelijskih odgovora koji sledi uspješnom prepoznavanju patogena je oksidativni rafal koji uključuje proizvodnju ROS-a. Razliciti patogeni dovode do stvaranja O2• - ili njegove dismutacije proizvod H2O2 u apoplastu.Radvan i saradnici primetili su veću koncentraciju H2O2 i MDA kod Vicia faba koja je zaražena virusom u sjemenu. Nekoliko enzima ima ulogu u prepoznavanju patogena i dolazi do apoplastične ROS proizvodnje. Upotreba inhibitora ukazala je na to na plazma membrane sadrze NADPH oksidaze i peroksidaze ćelijskog zida kao dva najverovatnija biohemijska izvora.

LITERATURA

1. C. H. Foyer and J. Harbinson, “Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport,” in Causes of Photooxidative Stresses and Amelioration of Defense Systems in Plants, C. H. Foyer and P. Mullineaux, Eds., pp. 1–42, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 1994.
2. C. H. Foyer, “Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis,” in Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems, J. Scandalios, Ed., pp. 587–621, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA, 1997.
3. L. A. Del Río, L. M. Sandalio, F. J. Corpas, J. M. Palma, and J. B. Barroso, “Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling,” Plant Physiology, vol. 141, no. 2, pp. 330–335, 2006.
4. O. Blokhina and K. V. Fagerstedt, “Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems,” Physiologia Plantarum, vol. 138, no. 4, pp. 447–462, 2010.
5. E. Heyno, V. Mary, P. Schopfer, and A. Krieger-Liszkay, “Oxygen activation at the plasma membrane: relation between superoxide and hydroxyl radical production by isolated membranes,” Planta, vol. 234, no. 1, pp. 35–45, 2011.
6. K. Shah, R. G. Kumar, S. Verma, and R. S. Dubey, “Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings,” Plant Science, vol. 161, no. 6, pp. 1135–1144, 2001.
7. R. Mittler, “Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance,” Trends in Plant Science, vol. 7, no. 9, pp. 405–410, 2002.
8. P. Sharma and R. S. Dubey, “Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings,” Plant Growth Regulation, vol. 46, no. 3, pp. 209–221, 2005.
9. W. H. Hu, X. S. Song, K. Shi, X. J. Xia, Y. H. Zhou, and J. Q. Yu, “Changes in electron transport, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes in chloroplasts and mitochondria of cucumber leaves as influenced by chilling,” Photosynthetica, vol. 46, no. 4, pp. 581–588, 2008.
10. C. Han, Q. Liu, and Y. Yang, “Short-term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet-B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of Picea asperata seedlings,” Plant Growth Regulation, vol.