

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie  
Studijní obor: Medicinální chemie



Eliška Hájková

Fytoextrakce směsných vzorků farmak z vodných roztoků  
Phytoextraction of mixed drug samples from aqueous solutions

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Stanislav Smrček, CSc.

Praha, 2022

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 23. srpna 2022

Eliška Hájková

## Abstrakt

V životním prostředí byla detekována řada kontaminantů, včetně léčiv. Jejich přítomnost v půdě a vodních zdrojích může mít pro jejich neustále se zvyšující koncentraci toxický vliv na necílové organismy. Metoda fytoremediace využívá schopnosti rostlin vychytávat tyto kontaminanty a různými mechanismy je detoxikovat.

Cílem této práce byla fytoextrakce ibuprofenu za využití kukuřice seté (*Zea mays*) z vodných roztoků média. Byla provedena také fytoextrakce ibuprofenu v kombinaci s dextromethorphanem. Kvantitativní množství extrahovaného ibuprofenu bylo detekováno pomocí HPLC s UV detekcí. Ibuprofen byl velmi dobře rostlinami extrahován. V přítomnosti dextromethorphanu byla účinnost fytoextrakce snížena. Účinnost fytoextrakce ibuprofenu byla 0,10 mg na gram čerstvé hmotnosti listu, zatímco za přítomnosti dextromethorphanu byla fytoextrakční účinnost 0,09 mg na gram čerstvé hmotnosti listu.

Po fytoextrakci ibuprofenu byla stanovena antioxidační kapacita v listech a kořenech experimentálních rostlin, z nichž nejvyšší hodnoty vykazovaly kořeny rostlin pěstované s ibuprofenem v kombinaci s dextromethorphanem v médiu. V listech a kořenech byl detekován i obsah fenolických látek, kde nejvyšší zastoupení fenolických látek bylo detekováno v kořenech rostlin pěstovaných s oběma léčivy. Metodou dle Bradforda bylo stanoveno množství bílkovin, které bylo nejvyšší v listech rostlin pěstovaných s ibuprofenem a u kořenů rostlin pěstovaných s oběma léčivy. Po elektroforetické separaci za nativních podmínek byla stanovena aktivita askorbátperoxidasy, u které bylo v případě kořenů detekováno mnoho izoform, aktivita peroxidasy s nejvyšší aktivitou v kořenech rostlin pěstovaných s přidaným ibuprofenem v kombinaci s dextromethorphanem a aktivita šikimatdehydrogenasy, která dosáhla nejvyšší hodnoty v listech rostlin obsahujícím ibuprofen v médiu. Aktivita superoxiddismutasy byla pod limitem detekce. Aktivita celkových volných peroxidasy byla v listech nejvyšší v případě rostlin pěstovaných s oběma léčivy a v kořenech s přidaným dextromethorphanem v médiu. Membránově vázané peroxidasy byly detekovány v listech i kořenech rostlin s přidaným ibuprofenem i dextromethorphanem v médiu. Aktivita guajakolperoxidasy dosahovala v kořenech nejvyšší aktivity v případě rostlin obsahujících ibuprofen v médiu.

Klíčová slova: fytoextrakce, dextromethorphan, ibuprofen, enzymová aktivita

## Abstract

A number of contaminants have been detected in the environment, including pharmaceuticals. Their presence in soil, water sources can have a toxic effect on organisms due to their constantly increasing concentration. The method of phytoremediation uses the ability of plants to absorb these contaminants and detoxify them by various mechanisms.

The aim of this work was the phytoextraction of ibuprofen using maize (*Zea mays*) from aqueous solutions. Phytoextraction of ibuprofen after cultivation with added dextromethorphan was also carried out. The quantitative amount of extracted ibuprofen was detected by HPLC with UV detection. Ibuprofen has been very well extracted by plants. In the presence of dextromethorphan, the efficiency of phytoextraction was decreased.

The phytoextraction efficiency of ibuprofen was 0.10 mg per gram of leaf fresh weight, while in the presence of dextromethorphan, the phytoextraction efficiency was 0.09 mg per gram of leaf fresh weight.

After phytoextraction of ibuprofen, the antioxidant capacity was determined by FRAP method of leaf and root extracts of the plants, of which the highest values were observed in the roots of plant grown with ibuprofen in combination with dextromethorphan. The phenolic compounds were also detected in leaves and roots, where the highest percentage of phenolic compounds was detected in root with both drugs present in the medium. The amount of proteins was measured by the Bradford method. The highest protein concentration was found in the leaves of plants grown with ibuprofen and in the roots of plants grown with both drugs. In gels after native electrophoresis, ascorbate peroxidase activity was detected, where there were many isoforms observed in the root extracts, peroxidase activity with the highest activity in the roots with grown with ibuprofen in combination with dextromethorphan in the medium, and shikimate dehydrogenase activity, which reached the highest value in the extract of the leaf containing ibuprofen. Superoxide dismutase activity was under the limit of detection.

The activity of total soluble and membrane-bound peroxides was determined by DAB method. The activity of total peroxides was highest in the leaves of plants containing both drugs in the medium and in the roots with added dextromethorphan. Membrane-bound peroxidases were present in both the roots and leaves of plants with both ibuprofen and dextromethorphan in the medium. Guaiacol peroxidase activity was not detected in the leaves, while in the roots its activity reached its highest value in the plant group with ibuprofen in the medium.

Key words: phytoextraction, dextromethorphan, ibuprofen, enzymatic activity

# Obsah

Abstrakt .....	3
Abstract .....	4
Použité zkratky .....	7
1. Úvod .....	9
2. Cíle práce.....	11
3. Přehled problematiky .....	12
3.1 Výskyt léčiv v životním prostředí.....	12
3.1.1 Výskyt ibuprofenu v životním prostředí .....	13
3.2 Fytoremediace .....	14
3.2.1 Rozdělení fytoremediačních technik.....	15
3.3 Nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAIDs).....	16
3.3.1 Ibuprofen .....	18
3.4 Antitusika .....	19
3.4.1 Dextromethorphan.....	19
3.5 Antioxidační systém rostlin .....	20
4. Experimentální část .....	23
4.1 Použité chemikálie a přístroje.....	23
4.1.1 Použité chemikálie.....	23
4.1.2 Použité přístroje.....	24
4.1.3 Další použitý materiál.....	25
4.2 Příprava živného média .....	25
4.3 Kultivace rostlin .....	26
4.3.1 Příprava sterilní vody.....	26
4.3.2 Kultivace rostlin .....	26
4.4 Přidání farmak a odběr vzorků .....	26
4.4.1 Přidání farmak v první sérii .....	26
4.4.2 Přidání farmak ve druhé sérii – studie směsné fytoextrakce .....	27
4.4.3 Odběr vzorků.....	27
4.5 Ukončení kultivace a následné zpracování rostlin .....	27
4.6 Detekce a kvantifikace léčiva v kultivačním médiu pomocí HPLC/UV .....	27
4.7 Biochemická analýza rostlin.....	28
4.7.1 Příprava rostlinných vzorků pro stanovení obsahu fenolických látek a antioxidační kapacity .....	28
4.7.2 Stanovení antioxidační kapacity metodou FRAP.....	28

4.7.3 Stanovení fenolických látek.....	28
4.7.4 Příprava rostlinných extraktů pro stanovení enzymové aktivity .....	29
4.7.5 Stanovení množství bílkovin dle Bradforda.....	29
4.7.6 Stanovení aktivity celkových volných a membránově vázaných peroxidas .....	29
4.7.7 Stanovení aktivity guajakolperoxidasy .....	30
4.7.8 Elektroforetická separace za nativních podmínek.....	30
5. Výsledky.....	32
5.1 Kalibrace ibuprofenu .....	32
5.2 Výsledky fytoextrakce.....	32
5.2.1 Výsledky fytoextrakce ibuprofenu.....	32
5.2.2 Výsledky fytoextrakce ibuprofenu s dextromethorphanem v kombinaci .....	34
5.2.3 Porovnání jednotlivých kultivací .....	35
5.2.4 Účinnost fytoextrakce.....	36
5.3 Biochemická analýza rostlinného metabolismu.....	36
5.3.1 Výsledky nativní elektroforézy .....	37
5.3.2 Stanovení antioxidační kapacity .....	40
5.3.3 Stanovení obsahu fenolických látek.....	41
5.3.4 Stanovení obsahu bílkovin metodou dle Bradforda .....	42
5.3.4 Výsledky spektroskopických stanovení .....	44
6. Diskuze.....	47
7. Závěr.....	49
8. Poděkování .....	50
9. Literatura .....	51

## **Použité zkratky**

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)

AMP – adenosinmonofosfát

APX – askorbátperoxidasa

ASIC – kyselinové iontové kanály (z angl. acid-sensing ion channels)

ATP – adenosintrifosfát

BSA – hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)

CAT – katalasa

COX – cyklooxygenasa

DAB – 3,3'-diamidobenzidin

DDT – 1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan

DMSO – dimethylsulfoxid

DXM – dextromethorphan

DXO – dextrophan

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

ENT – otorinolaryngologie

FRAP – redukční (antioxidační) síla (z angl. ferric ion reducing antioxidant power)

FW – čerstvá hmotnost (z angl. fresh weight)

GABA – kyselina  $\gamma$ -amino máselná

G-POD – guajakolperoxidasa

GPX – glutathionperoxidasy

GR – glutathionreduktasa

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)

MS médium – médium dle Murashiga a Skooga

NADP – nikotinamidadenindinukleotidfosfát, oxidovaná forma

NBT – Nitroblue tetrazolium chlorid

NMDA – N-methyl-D-aspartát

NSAIDs – nesteroidní protizánětlivá léčiva (z angl. nonsteroidal anti-inflammatory drugs)

PGE2 – prostaglandin E2

PGD2 – prostaglandin D2

PGI2 – prostaglandin I2

PPCP – farmaceutika a produkty osobní péče (z angl. pharmaceuticals and personal care products)

PVP – polyvinylpyrrolidon

ROS – reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)

RPM – počet otáček za minutu (z angl. revolutions per minute)

SDH – šikimatdehydrogenasa

SDS – dodecylsulfát sodný

SOD – superoxiddismutasa

TEMED – N,N,N',N' - tetramethylethyldiamin

TPTZ – 2,4,6-tripyridyl-s-triazin

Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan

TPTZ – 2,4,6-tripyridyl-s-triazin

TRPV1 – přechodný receptorový potenciálový kationtový kanál podrodiny V člen 1

TXA2 – tromboxan A2

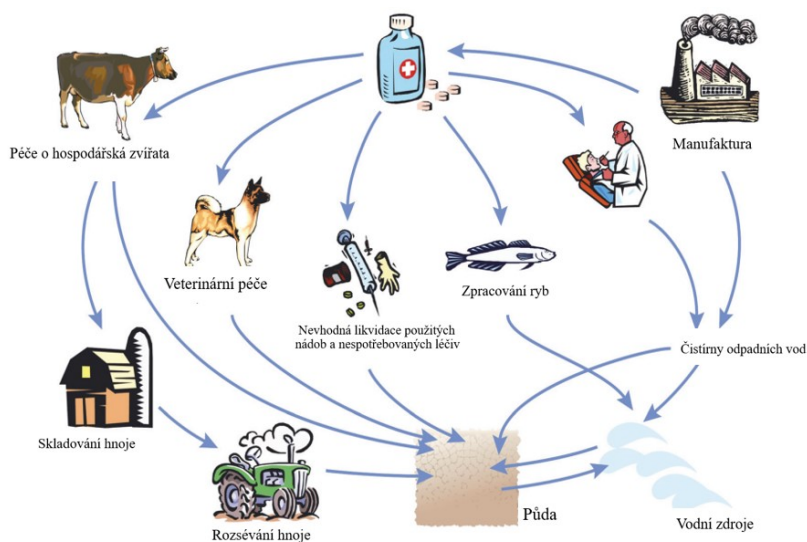
WHO – Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

# 1. Úvod

V životním prostředí se díky činnosti člověka, zemědělství a průmyslu nachází mnoho kontaminantů jako jsou těžké kovy, radionuklidy, organické sloučeniny, produkty osobní péče člověka i živočichů a farmaceutika [1]. Mezi nejčastější léčiva znečišťující životní prostředí patří antihypertenziva, antibiotika, hormony, antidepresiva, antikonvulziva, lipidové regulátory a skupina nesteroidních protizánětlivých léčiv (NSAIDs) [2].

Nesteroidní protizánětlivá léčiva jsou skupinou léčiv vykazujících analgetické, antipyretické a protizánětlivými účinky [3]. Mezi NSAIDs patří ibuprofen. Ibuprofen je velice často užívané léčivo celosvětově pro zmírnění akutní bolesti, zánětu a horečky, jeho koncentrace v povrchové, podzemní i v pitné vodě se tak výrazně zvyšuje [4].

Dextromethorphan, nenarkotický syntetický analog kodeinu, patří do skupiny antitusik, tedy léčiv, které se využívají proti kašli a nachlazení [5]. Pro své psychotropní účinky při překračování terapeutických dávek je však často zneužíván [6].



Obrázek 1: Zdroje kontaminace životního prostředí farmaceutiky.  
Převzato a upraveno z [59].

Přítomnost léčiv v povrchové, podzemní i v pitné vodě má v důsledku jejich neustálého uvolňování do životního prostředí a biologicky aktivního charakteru samotných léčiv i jejich metabolitů toxické účinky na vodní organismy [7]. K odstranění xenobiotik, snížení jejich toxicity, k jejich stabilizaci či degradaci je využíváno metody fyto-remediace, která využívá k těmto účelům rostliny a s nimi spojené půdní organismy [8]. Zelené rostliny do sebe kontaminanty přijímají jako zdroj makronutrientů a jsou schopné je různými mechanismy detoxikovat [9]. Fyto-remediální techniky se dělí na fytoextrakci, fytodegradaci, fytostabilizaci, rhizodegradaci, fytovolatilizaci, rhizofiltraci [10].

Příjem kontaminantů rostlinou však rostlina toleruje jen do určité meze, poté dochází k vyvíjení oxidačního stresu na rostlinu a vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS) jako jsou hydroxylový radikál, peroxid vodíku, které jsou pro rostlinu toxické [11]. Pro jejich zneškodnění a zabránění oxidačního poškození buněk má rostlina enzymatický antioxidační systém, do kterého patří enzymy superoxiddismutasa (SOD), katalasa (CAT), askorbatperoxidasa (APX), glutathionreduktasa (GR), glutathionperoxidasy (GPX), guajakolperoxidasa (G-POD), a neenzymatický antioxidační systém, do kterého se řadí kyselina askorbová, fenolické látky a další [11][12].

## 2. Cíle práce

Hlavním cílem bakalářské práce bylo zhodnocení možnosti fytoextrakce analgetik kontaminujících životní prostředí, porovnání případné změny rychlosti fytoextrakce v přítomnosti dalšího farmaka a stanovení aktivity enzymů po příjmu jednotlivých farmak rostlinou. Jako modelová farmaka byly zvoleny ibuprofen a dextromethorphan. Fytoextrakce byla provedena s kukuřicí setou (*Zea mays*).

Dalším cílem bylo sledovat vliv farmak na metabolismus rostlin pomocí stanovení antioxidační kapacity a aktivit vybraných antioxidačních enzymů v listech a kořenech.

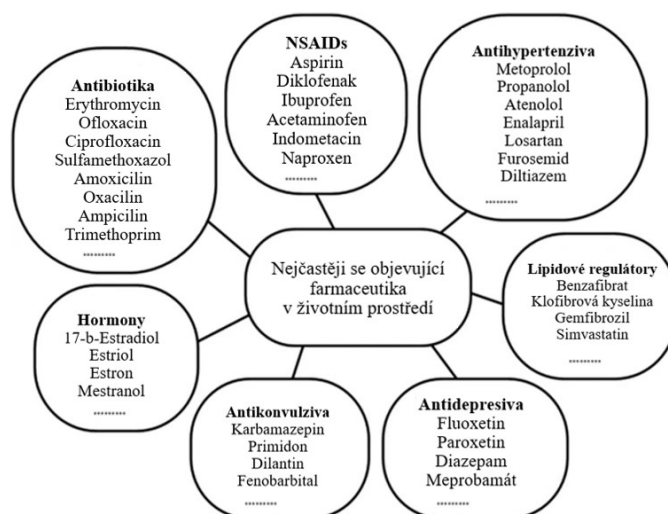
Postup práce:

- 1) Příprava sterilních *in vitro* kultur kukuřice seté (*Zea mays*).
- 2) Provedení fytoextrakčních experimentů s roztoky ibuprofenu a dextromethorphanu o koncentracích 5 mg/l.
- 3) Odběr vzorků z vodných roztoků z jednotlivých kultur po dobu 6 dnů po 24 hodinách.
- 4) Následná HPLC analýza odebraných vzorků.
- 5) Vyhodnocení a posouzení jednotlivých fytoextrakčních experimentů.
- 6) Stanovení antioxidační kapacity a aktivit vybraných antioxidačních enzymů v listech a kořenech experimentálních rostlin po ukončení fytoextrakčních experimentů.

### 3. Přehled problematiky

#### 3.1 Výskyt léčiv v životním prostředí

V životním prostředí byla detekována řada farmaceutik [2]. Zbytky léčiv byly často pozorovány v odpadních, povrchových a podzemních vodách, dokonce i ve vodě pitné [13]. Farmaceutika a produkty osobní péče (PPCP), tedy látky určené ke zdravotní péči člověka i zvířat, byly zjištěny v povrchových vodách po celém světě v koncentracích v rozmezí od ng/L až µg/L [2]. I přes takto nízké koncentrace mohou mít farmaka toxický vliv na vodní organismy z důvodu jejich neustálého uvolňování do životního prostředí [14]. Mezi PPCP se řadí léky volně prodejné i na předpis, veterinární léčiva, stejně tak ale i jejich následné metabolity a konjugáty včetně antibiotik, hormonů, antidepresiv, antihypertenziv, antikonvulziv, lipidových regulátorů a nesteroidních protizánětlivých léčiv (NSAIDs) [2]. Celosvětově se vyrobí několik tisíc PPCP ročně, jejich uvolňování do životního prostředí tedy nadále zůstává nevyhnutelným vedlejším produktem našeho životního stylu [15]. PPCP se do životního prostředí dostávají jako složky lidského a živočišného odpadu po neúplném vstřebání a vyloučení z těla, také mohou být důsledkem emisí ze zdravotnictví, průmyslu, zemědělství či odpadu z jednotlivých domácností [16]. Tato farmaka jsou navržena tak, aby byla schopna odolávat inaktivaci až do doby, kdy mají vyvolat svůj terapeutický účinek. Tato vlastnost podporuje bioakumulaci v prostředí a často i jejich toxické účinky na vodní i jiné ekosystémy [7].



Obrázek 2: Sedm terapeutických skupin farmak nejčastěji se vyskytujících v životním prostředí. Převzato a upraveno ze [60].

Jestliže léčiva sdílí stejný způsob účinku, může být toxicita jejich směsi vyšší než v případě, kdy je přítomno pouze jedno z nich [14]. Jedním z příkladů, kdy byl pozorován tento efekt, bylo při použití směsi protizánětlivých farmak, resp. ibuprofenu, diklofenaku a naproxenu. V případě směsi léčiv se objevila akutní toxicita již při koncentracích, kdy u léčiv samotných nebyla detekována žádná nebo jen minimální akutní toxicita [17].

### 3.1.1 Výskyt ibuprofenu v životním prostředí

Ibuprofen je třetím nejvíce užívaným léčivem ve světě. Byl zařazen na seznam „Esenciálních léčiv“ roku 2010 Světovou zdravotnickou organizací (WHO) [18]. Pro svou popularitu a častou využívanost se však jeho toxicita a koncentrace v čistírnách odpadních vod každým dnem zvyšuje. To může vést k závažným následkům z důvodu biologicky aktivního charakteru tohoto léčiva [19].

Terapeutická dávka ibuprofenu je stanovena v rozmezí 600 až 1200 mg za den. Po orálním podání se ibuprofen z 99 % váže na plazmatický albumin. Ibuprofen je z organismu vylučován buď v nezměněné formě vázaný na glukuronid a thiol (15 %), nebo jako metabolit (karboxyibuprofen, hydroxyibuprofen). Konjugáty jsou v prostředí hydrolyzovány [20]. Jiné metabolity ibuprofenu se však objevují v čistírnách odpadních vod. Patří mezi ně především 4-isobutyrylaldehyd, 1-(4-isobutylfenyl)-1-ethanol, 2-[4-(1-hydroxyisobutyl)fenyl] kyselina propionová, 4-ethylfenol a další. Ibuprofen a jeho metabolity byly tak detekovány v mnoha tělech vodních živočichů [21].

Na zvyšující se koncentraci tohoto léčiva v životním prostředí se nejvíce podílí činnost člověka a dalších živočichů. Po konzumaci není ibuprofen metabolizován zcela a spolu s jeho metabolity je exkretován z těla [22]. Metabolity vznikající jeho odbouráváním jsou více toxické než ibuprofen samotný. Toxický efekt ibuprofenu byl sledován na různých modelových organismech jako *Asteria rubens*, *Oryzias latipes*, *Mytilus galloprovincialis*, *Danio rerio* a další [23]. Také byl pozorován pokles kladení jiker u některých druhů ryb, zároveň však zvýšení počtu nakladených vajec u *Oryzias latipes* [18]. Dále ibuprofen iniciuje u výše zmíněných modelových organismů oxidativní stres, zvyšuje aktivitu katalasy, superoxiddismutasy, glutathion S-transferasy fáze II a glutathionreduktasy po expozici kratší než 7 dní [24]. Dochází k aerobní respiraci, skeletálním změnám a k poruchám imunitního systému při koncentraci 11,5 µg/l, vyšší koncentrace zvyšují expresi regulačních genů dráhy metabolismu kyseliny arachidonové a též dochází k vzrůstu prozánětlivé odpovědi [25].

Akutní toxicita ibuprofenu je závislá na dávce, při delší expozici tohoto analgetika byl pozorován cytotoxický a genotoxický efekt. Delší expozice způsobuje nerovnováhu v oxidativním stavu buňky, změny v chování, reprodukci, rychlosti růstu [4]. Pokud dojde ke konjugaci ibuprofenu s diacylglycerolem, dochází k inhibici dělení buněk a k nondisjunkci některých chromozomů [26]. Při sledování změn hormonů na buněčných liniích *Oryzias latipes*, *Daphenia magna* a *Moina macropa* byl pozorován vzrůst produkce 17- $\beta$  estradiolu a pokles produkce testosteronu [27].

### 3.2 Fytoremediace

Současným intenzivním zemědělstvím, rychlé urbanizaci a industrializaci dochází ke znečištění životního prostředí těžkými kovy, organickými sloučeninami, radionuklidy, antibiotiky i pesticidy. Fytoremediace je cenově dostupná, k životnímu prostředí šetrná technika, která využívá rostliny a s nimi spojené rhizosferní mikroorganismy k odstranění, transformaci, pohlcení, snížení toxicity, stabilizaci či degradaci sloučenin, které jsou uvolňovány do prostředí z různých zdrojů [1]. Je definovaná jako použití rostlin a půdních mikroorganismů ke snížení koncentrací kontaminantů nebo jejich škodlivých účinků v životním prostředí [8]. Zelené rostliny mají obrovskou schopnost přijímat znečišťující látky z prostředí a detoxikovat je různými mechanismy [8]. Příjem polutantů rostlinami je dán tím, že k růstu a dokončení životního cyklu potřebují jak makronutrienty jako dusík, fosfor, draslík, síru, tak i mikronutrienty (železo, zinek, mangan, měď) [9]. Ideální rostliny pro uskutečnění této techniky by měly být odolné vůči nepříznivým podmínkám toxickým účinkům kovů a kontaminantů, a zároveň být snadno kultivovatelné, s vysokou absorpční kapacitou a nebyť příliš atraktivní pro býložravce. Faktory, které ovlivňují příjem látek rostlinou a jejich distribuci v ní, jsou fyzikální a chemické vlastnosti sloučenin (rozpustnost ve vodě, molekulová hmotnost), charakteristika prostředí (teplota, pH, vlhkost půdy) a vlastnosti rostlin samotných (typy kořenových systémů, typy enzymů) [1]. V mnohých případech potřebují rostliny také pomocné prostředky k zvýšení účinnosti fytoremediace (např. EDTA, biouhli). Zmíněné látky napomáhají fytoremediaci snížením toxicity znečišťujících látek, či zvyšují dosažitelnost polutantů, nebo podporují růst rostlin [28].

Různé rostliny využívají rozdílné metody nebo jejich kombinace k remediaci půdy a vody v závislosti na tom, o jaký typ, formu či prostředí kontaminantu se jedná [28]. K remediaci znečištěné podzemní vody lze využít fytodegradace, fytovolatilizace, rhizofiltrace a rhizodegradace. Kontaminaci povrchových a odpadních vod lze řešit rhizofiltrací, fytodegradací nebo rhizodegradací. K čištění kontaminované půdy, sedimentů či usazenin

se využívá fytoextrakce, fytodegradace, fytostabilizace, rhizodegradace nebo fytovolatilizace. [10].

### 3.2.1 Rozdělení fytořediačních technik

#### *Fytoextrakce/Fytoakumulace*

Fytoextrakcí nebo fytoakumulací se rozumí příjem sloučeniny kořeny a jejich přesun do nadzemní části rostliny [8]. Fytoextrakce je odstranění kontaminantu z půdy, podzemní či povrchové vody rostlinami. Fytoakumulací je označován proces, kdy kontaminant není po příjmu rostlinou rychle nebo zcela degradován, ale dochází k jeho akumulaci v rostlině [1]. Hyperakumulátory jsou pak označovány rostliny, které v sobě shromažďují vysoké koncentrace toxických těžkých kovů. Jejich příjem kořeny je následován vytvořením kov-fytochelátového komplexu, který je přesunut do rostlinné vakuoly a zde je uložen [26].

#### *Fytodegradace /Rhizodegradace*

Rostliny mohou metabolizovat a eliminovat kontaminanty v rostlinných pletivech prostřednictvím procesu zvaném fytodegradace [26]. Toho je docíleno pomocí rostlinných enzymů či enzymových kofaktorů [1]. Enzymy účastníci se fytodegradace jsou peroxidasy, dehalogenasy, fosfatasy a nitroreduktasy [9]. Pokud je degradace polutantu provedena mikroorganismy v rhizosféře, je nazývána jako rhizodegradace [8].

#### *Fytostabilizace*

Fytostabilizace je užití některých rostlin k inaktivaci či imobilizaci polutantů v znečištěných půdách [26]. Tato technika se používá ke snížení mobility a biologické dostupnosti znečišťujících látek v životním prostředí, čímž se zabrání jejich migraci do podzemních vod nebo jejich vstupu do potravního řetězce [8]. Některé rostliny vytváří vazbu se zbytkem kontaminantu, který není dostupný ve své toxické formě, a nemůže být tak po akumulaci v rostlině uvolněn ze své pevné matrice [26].

#### *Rhizofiltrace*

Rhizofiltrací je označován proces odstranění kontaminantu za použití určitých rostlin ze znečištěných povrchových a odpadních vod. Absorpce kontaminantů rostlinou minimalizuje jejich pohyb v podzemních vodách [8].

#### *Fytovolatilizace*

Fytovolatilizace je příjem znečišťujících látek z půdy rostlinami a jejich následná přeměna na těkavou formu a uvolnění do atmosféry. Takto mohou být odstraňovány organické sloučeniny a těžké kovy jako rtuť a selen [8].

### 3.3 Nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAIDs)

Nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAIDs) představují skupinu chemicky heterogenních organických sloučenin, které se vyznačují analgetickými, antipyretickými a protizánětlivými vlastnostmi. Jejich mechanismus účinku vychází z inhibice biosyntézy chemických mediátorů zánětu prostaglandinů. Inhibice syntézy prostaglandinů pomocí NSAID je docíleno prostřednictvím blokace dvou izoform enzymu cyklooxygenázy (COX-1 a COX-2), zajišťujícího syntézu prostaglandinů z kyseliny arachidonové v místě postižené či zanícené tkáně [3]. COX-1 enzym je vytvářen téměř ve všech tkáních, je zodpovědný za regulaci základních procesů v buňce. COX-2 enzym může být indukován v mozkových tkáních, ledvinách a kostech. V těchto tkáních dochází k jeho zvýšené produkci při zánětu, čímž dochází k produkci prozánětlivých prostaglandinů [27]. Blokádou COX-2 pomocí NSAIDs dochází k protizánětlivému a analgetickému účinku (zvýšením prahu pro aktivaci nocireceptorů) [28].

V dnešní době jsou NSAIDs používány především na pooperační bolesti, s případným současným podáváním doplňkových opioidních léčiv, po operacích, po kterých je případný vznikající zánět největším příspěvkem k bolesti, jako jsou různé operace urologického, stomatologického, ENT, či ortopedického typu [28].

NSAIDs se vyznačují protizánětlivými vlastnostmi, které spočívají v jejich kyselém charakteru a v jejich značné schopnosti vázat se na proteiny [28].

Při vzniku zánětu dochází k úniku plazmatických proteinů z kapilár a tím způsobí kyselou hodnotu pH v extracelulárním prostoru v tkáních. Pokles lokální hodnoty pH zajistí zvýšení koncentrace neionizovaných NSAIDs, v závislosti na  $pK_a$  molekuly, a poskytne jejich vysokou koncentraci v postižených zanícených tkáních. V důsledku toho dojde k inhibici syntézy prostaglandinu primárně právě v zanícené tkáni [28]. Daná akumulace NSAID v tkáních vysvětluje obecně delší dobu trvání jejich účinku, než je předpokládáno z hodnot jejich eliminačních poločasů/poločasů eliminace z plazmy [29].

NSAIDs se používají pro utišení bolesti a zánětu při akutních i při chronických bolestech. Působí jak periferně, tak i centrálně. Jak je uvedeno výše, periferní nocireceptory jsou blokovány pomocí NSAIDs prostřednictvím inhibice COX enzymu, který zajišťuje přeměnu kyseliny arachidonové na prostaglandiny, a tím zabraňují senzitivaci nocireceptorů odpovídajícím na zranění. Centrální působení NSAIDs je uskutečněno prostřednictvím inhibice produkce prostaglandinu E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) přes COX-2 v zadním míšním rohu/laloku

a také v mozku aktivací medulárních a kortikálních oblastí, které snižují inhibici kaskády odpovědi na bolest [30].

NSAIDs jsou buď reverzibilně kompetitivní inhibitory (kromě aspirinu) střídavě blokuující obě izoformy COX-1 i COX-2 anebo selektivní inhibitory COX-2 izoformy. Do první zmíněné skupiny patří ibuprofen, diklofenak, ketorolak, ketoprofen, piroxicam a další, zatímco do skupiny selektivních inhibitorů patří celecoxib a rofecoxib [31].

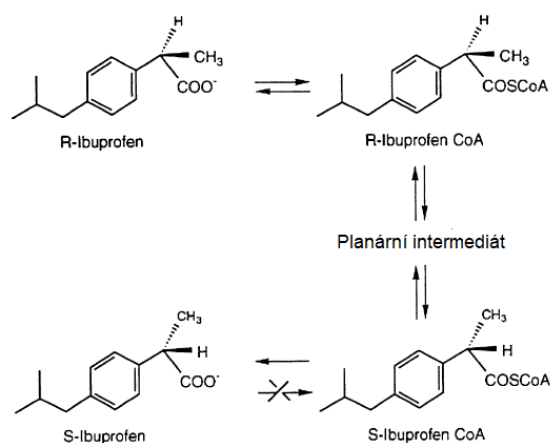
Užití NSAIDs jsou spojena s rizikem gastrointestinálních, renálních a kardiovaskulárních nežádoucích účinků. Bylo prokázáno, že tyto nežádoucí účinky jsou u NSAIDs závislé na dávce a jsou důsledkem jejich chronického užívání. Existují jen velmi omezená data, která by vypovídala o zvýšení nežádoucích účinků při akutním pooperačním užití NSAIDs [32]. Tyto účinky jsou u NSAIDs důsledkem vlastního mechanismu působení, jelikož jestliže dojde k inhibici syntézy prostaglandinu E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), který působí cytoprotektivně v gastrointestinálním traktu, dochází tímto k odhalení žaludeční sliznice pro následné podráždění a tvorbě vředů, což vede k riziku gastrointestinálního krvácení. Prostaglandiny také regulují průtok krve v ledvinách, inhibice jejich syntézy může mít tedy též za následek pokles funkce ledvin a vyústit v chronické onemocnění ledvin. Inhibice COX-2 také vede ke snížení syntézy prostaglandinů a větší produkci tromboxanu A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), což způsobuje zvýšení vazokonstrikce a tím i zvýšení rizika kardiovaskulárních příhod [30].

I přes prokázanou účinnost NSAIDs v tišení pooperační bolesti, jejich nežádoucí účinky vzbuzují obavy a omezují jejich použití u vysoce rizikových pacientů, zejména u starších pacientů a pacientů s renálními onemocněními [32]. NSAIDs by měly být užívány u starších pacientů s opatrností. Nebylo prokázáno, že by se u starších lidí projevovaly nežádoucí účinky častěji než u jiných pacientů v kontextu postoperační analgezie, avšak riziko závažných komplikací peptického vředového onemocnění bylo zvýšeno 2-5násobně u postarších pacientů přijímajících NSAIDs [29]. Dalším nežádoucím účinkem užívání NSAIDs je i akutnímu poškození ledvin. U starších pacientů dochází k poklesu počtu nefronů o 35 % a průtok krve ledvinami je snížen o 45-53 %. U dlouhodobé terapie NSAIDs se může projevit také zvýšená retence sodíku a vody, a to může vést k následnému riziku kardiovaskulárních onemocnění. NSAIDs s dlouhým poločasem jako je piroxicam a tenoxicam se mohou v postarších pacientech akumulovat a způsobovat tím snížení funkčnosti jater a ledvin [28].

### 3.3.1 Ibuprofen

Ibuprofen je jedním z nejčastěji používaných volně prodejných léčiv s analgetickým, antipyretickým a protizánětlivým účinkem v pořadí hned za aspirinem a paracetamolem. Využívá se především k zmírnění akutní bolesti, zánětu a horečky. Z výše zmíněných analgetik je ibuprofen brán za nejméně toxický, je jen velmi vzácně spojován s úmrtím či velmi závažnými nežádoucími účinky po jeho požití. Ibuprofen byl popsán jako NSAIDs, užívané po dlouhou dobu v klinické praxi a vykazující nejmírnější nežádoucí účinky [33].

Volně prodejný ibuprofen se vyskytuje ve formě diastereoizomerní směsi [33]. Tato směs je složena z poloviny S(+)-enantiomeru, který je farmakologicky aktivní jako inhibitor syntézy prostaglandinu, druhá polovina je tvořena R(-)-enantiomerem, který není tolik aktivní v inhibici syntézy prostaglandinů, ale může mít určité farmakologické vlastnosti významné pro protizánětlivé působení tohoto léčiva. 40-60 % R(-)-formy ibuprofenu je metabolicky přeměněno na S-enantiomer ve střevním traktu a v játrech po orálním podání [34]. Prvním krokem je aktivace R(-)-ibuprofenu s  $\text{ATP:Mg}^{2+}$  za vzniku AMP-derivátu, který je následně esterifikován koenzymem A působením acyl-CoA syntetázy. R-ibuprofen-CoA podléhá epimerizaci působením epimerasy za vzniku S-ibuprofen-CoA, který je následně hydrolyzován hydrolasou za vzniku S-ibuprofenu-CoA [35].



Obrázek 3: Přeměna R(-)-enantiomeru na S(+)-enantiomer prostřednictvím acylkoenzym thioesterázy. Převzato a upraveno z [61]

Ibuprofen působí různými mechanismy na zánětlivé dráhy a buněčné systémy, které se podílejí na akutním a chronickém zánětu. Principem jeho farmakodynamických účinků je, stejně jako u dalších NSAIDs, inhibice COX-1 a COX-2 enzymů, které syntetizují prozánětlivé prostanoidy [33]. Ibuprofen má, jako další NSAIDs, dva mechanismy působení analgezie; prostaglandin-dependentní a na prostaglandinu nezávislý mechanismus.

Mechanismus dependentní na prostaglandinu spočívá v interakci prostaglandinu E2 (PGE2), prostaglandinu I2 (PGI2) a prostaglandinu D2 (PGD2) s jejich příslušnými receptory přítomnými na nervech [36]. Jejich interakce aktivuje specifické kanály nebo enzymy regulující neuronální přenos signálů bolesti [37]. Jestliže dojde ke snížení produkce prostaglandinů vlivem působení NSAIDs, dochází ke snížení aktivace těchto kanálů či enzymů, a tím i následnému přenosu bolesti. Mechanismus nezávislý na prostaglandinu souvisí se zablokováním dalších komponent v odpovědi na bolest, jako jsou například periferní nociceptivní sodíkové kanály Nav1.7 a 1.8 [36]. Ibuprofen blokuje změny v těchto kanálech a současně tím sníží i hyperexcitabilitu neuronů [38]. NSAIDs také zmírňují působení ASIC iontových kanálů (acid-sensing), tvorbu neuropeptidů a tím dochází k zmenšení bolesti [33].

Ibuprofen má velice příznivý bezpečnostní profil a je účinným analgetikem v zásahu akutních i chronických bolestí, avšak stejně jako ostatní NSAIDs není bez rizika. Oproti ostatním NSAIDs má poměrně nízké riziko kardiovaskulárních příhod, ale je spojován s renálními a jaterními nežádoucími účinky, závisujícími na dávce, souběžném podávání jiných léků i na pacientovi samotném [39].

### 3.4 Antitusika

Kašel je důležitým obranným reflexem, pokud však přetrvává, pacienti začnou vyhledávat pomoc v podobě léčiv s antitusickým účinkem [40]. Antitusika se rozdělují především na dvě hlavní skupiny na základě místa jejich účinku: periferní a centrální. Periferní antitusika se dále dělí na lokální anestetika, nociceptiny, antagonisty TRPV1 receptorů, leukotrien receptorů, či antagonisty bradykinin receptorů. Mezi centrálně působící antitusika patří opiáty, jako jsou kodein, morfin a dihydrokodon. Dále sem patří také inhibitory GABA receptorů, kterými je například baclofen [41]. Dextromethorphan, o kterém je pojednáno níže, patří mezi inhibitory sigma receptorů stejně jako noscipin. I přes to, že se jedná o opioidové deriváty, váží se spíše na receptory sigma než na klasické opioidové, neřadí se tedy mezi opioidy [5].

#### 3.4.1 Dextromethorphan

Dextromethorphan (DXM, *d*-methorphan) je nenarkotický syntetický analog kodeinu, který je celosvětově využíván jako volně prodejné antitusikum. Je považován za léčivo bezpečné a účinné proti kašli a nachlazení v případě užívání terapeutických dávek. [5]

Dextromethorphan má širokou škálu farmakodynamických účinků v důsledku jeho aktivity

na řadu kanálů a receptorů. Antitusický účinek je pravděpodobně způsoben stimulací sigma-1 receptorů a v blokaci *N*-methyl-*D*-aspartátu (NMDA). [5], [42]

Dextromethorphan je primárně metabolizován cytochromem P450 za vzniku jeho hlavního metabolitu dextrophanu (DXO) [43]. Dextrophan je jediný známý metabolit, který vykazuje antitusické účinky a předpokládá se, že je zodpovědný za hlavní farmakologický účinek při užití terapeutických dávek [40]. DXM je především vylučován močí, převážně ve formě konjugátů jeho metabolitů (DXO, dextrophan-*O*-glukuronid) [5].

Jak již bylo zmíněno výše, i přesto, že je chemicky dextromethorphan derivát opiových alkaloidů, neváže se na opioidové receptory, mezi opioidy se tedy neřadí a nemá analgetické, euforizující ani účinky tlumící respirační funkce jako kodein či morfin [5]. Toto tvrzení však platí pouze při užití terapeutických dávek dextromethorphanu. Při nadužití tohoto léčiva má psychotropní účinky, a proto je tedy často zneužíván. Předávkování DXM vede k vizuálním a sluchovým halucinacím, disociativním účinkům, mánii, bludům, agresi, euforii a stavům dysforie [6].

### 3.5 Antioxidační systém rostlin

Během mnoha metabolických procesů probíhajících v rostlinách, jakými jsou fotosyntéza a buněčné dýchání, dochází k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS) [11]. K jejich tvorbě dochází i při kontaktu s určitými látkami v životním prostředí [44]. Ukazuje se, že mnoho sloučenin, které zůstávají v čištěných odpadních vodách, vyvolávají v rostlinách detoxikační procesy, které zahrnují zvýšenou aktivitu detoxikačních enzymů [45]. Různé faktory životního prostředí (např. sucho, teplota, ostré světlo) ovlivňují růst a vývoj rostlin. V případě, kdy tyto faktory překročí mez tolerance rostliny, rostlina je vystavena stresu, což má za následek změny strukturních, fyziologických i biochemických procesů. Během stresu jsou elektrony ve vysokoenergetickém stavu přeneseny na molekulární kyslík. To vede k tvorbě ROS, jako jsou singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ), superoxidové radikály ( $\text{O}_2^-$ ), hydroxylové radikály ( $\text{HO}^\bullet$ ), peroxidy a peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Jedná se o velice toxické sloučeniny, které jsou schopné ničit většinu buněčných makromolekul, včetně DNA [11]. Aby se vyrovnaly se zvýšenou produkcí ROS a zabránily tak oxidativnímu poškození, disponují rostliny systémem antioxidačních enzymů, které ROS, přítomné v různých buněčných prostorech, vychytávají. [28] Mezi enzymatický antioxidační systém patří enzymy superoxidodismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), katalasa (CAT, EC 1.11.1.6), askorbátperoxidasa (APX, EC 1.11.1.11),

glutathionreduktasa (GR, EC 1.8.1.7), glutathionperoxidasy (GPX, EC 1.11.1.9), guajakolperoxidasa (G-POD, EC. 1.11) [12][11].

Toxické efekty ROS jsou potlačovány i neenzymatickým antioxidačním systémem, do kterého se řadí kyselina askorbová, fenolické látky a mnoho dalších [11].

#### *Superoxiddismutasa (SOD)*

Superoxiddismutasa je metaloenzym, přítomný v různých buněčných prostorech, který je považován za první obranu proti oxidačnímu stresu. Katalyzuje přeměnu dvou superoxidových radikálů na peroxid vodíku, a tím je udržuje ve stabilním stavu [44]. SOD může ve svém aktivním centru obsahovat měď, zinek (Cu/ZnSOD), mangan (MnSOD), či železo (FeSOD). Cu/ZnSOD se nachází v cytosolu a v chloroplastech rostlinné buňky, MnSOD je v matrix mitochondrie a v peroxisomech [11].

#### *Katalasa (CAT)*

Katalasy jsou tetramerní enzymy obsahující hem, katalyzující přeměnu dvou molekul peroxidu vodíku na kyslík a vodu. Nacházejí se nejčastěji v peroxisomech. Katalasy jsou hlavními enzymy vychytávajícími a přímo přeměňujícími peroxid vodíku a jsou nepostradatelné pro detoxikaci rostlin od ROS při stresu. Zvýšení jejich aktivity je bráno jako adaptační schopnost rostlin, která pomáhá překonat narušení metabolismu v pletivech snížením toxických koncentrací peroxidu vodíku [11].

#### *Askorbátperoxidasa (APX)*

Askorbátperoxidasa je též enzym obsahující hem, který vychytává peroxid vodíku [46][44]. Avšak na rozdíl od katalasy, jejíž reakce nevyžaduje žádný reduktant, APX využívá askorbát jako donor elektronů k redukci peroxidu vodíku na vodu v organelách zahrnující chloroplasty, cytosol, mitochondrie a peroxisomy. K peroxidu vodíku má také větší afinitu než výše zmíněná katalasa [46].

#### *Guajakolperoxidasa (G-POD)*

Guajakolperoxidasa je enzym obsahující hem, který se účastní mnoha fyziologických procesů v rostlinách [47]. Guajakolperoxidasa využívá fenolické látky jako donory elektronů k eliminaci peroxidu vodíku [12]. Jedná se o peroxidasu, která oxiduje guajakol (*o*-methoxyfenol), využívá jej tedy jako redukční substrát. Nachází se v cytosolu, vakuolách a buněčné stěně a je předpokládán, že se účastní mnoha procesů spojených s růstem a vývojem rostliny [47].

#### *Glutathionperoxidasy (GPX)*

Glutathionperoxidasy jsou rodinou několika izoenzymů, které katalyzují redukci peroxidu vodíku a cytotoxických hydroperoxidů na alkoholy [48]. Kromě vychytávání peroxidu

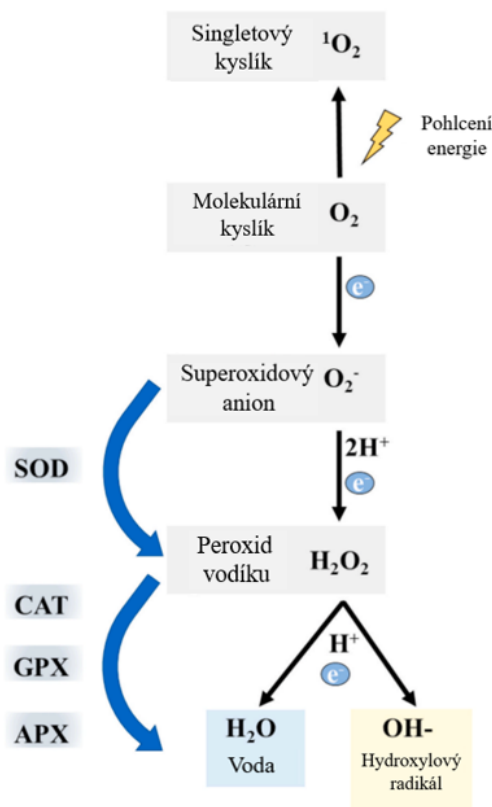
vodíku, GPX slouží také k detoxikaci produktů peroxidace lipidů, ke které dochází v důsledku činnosti ROS. Glutathionperoxidasy se rozdělují na tři typy: na selenu-dependentní GPX, GPX na selenu nezávislá a glutathiontransferasy [11].

### Fenolické látky

Fenolické látky jsou rozmanité sekundární metabolity hojně zastoupené v rostlinných pletivech [11]. Polyfenolické látky mají ideální chemickou strukturu pro vychytávání volných radikálů [49]. Jejich antioxidační vlastnosti vycházejí z jejich vysoké reaktivity jako vodíkové a elektronové donory, ze schopnosti od nich odvozených radikálů stabilizovat a delokalizovat nepárový elektron a z jejich schopnosti vázat do komplexu ionty kovů [50].

### Šikimátdehydrogenasa (SDH)

Šikimátdehydrogenasa je jedním z enzymů šikimátové dráhy, která se odehrává v plastidech a je centrem biosyntézy aromatických aminokyselin, folátů, vitaminů a dalších sekundárních metabolitů jako jsou fenolické látky v rostlinách i houbách. Rostliny využívají aromatické aminokyseliny nejen ke stavbě bílkovin, ale také jako prekurzory pro tvorbu velkého množství sekundárních metabolitů jako jsou např. flavonoidy [51]. Šikimátdehydrogenasa za přítomnosti NADP katalyzuje redukci 3-dehydrošikimátu na šikimát, což je esenciální reakce biosyntézy aromatických aminokyselin [52].



Obrázek 4: Schématické znázornění mechanismu přeměny ROS antioxidantními enzymy. SOD = superoxididismutasa; CAT = katalasa; GPX = glutathionperoxidasa; APX = askorbátperoxidasa. Převzato a upraveno z [62].

## 4. Experimentální část

### 4.1 Použité chemikálie a přístroje

#### 4.1.1 Použité chemikálie

2-amino-2-mehtyl-1-propanol (Sigma-Aldrich, USA)  
2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazin (Sigma-Aldrich, USA)  
3,3'-diaminobenzidin (Sigma-Aldrich, USA)  
ABTS roztok obsahující peroxid vodíku (Sigma-Aldrich, USA)  
Acetonitril (Sigma-Aldrich, USA)  
Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)  
Askorbát sodný (Sigma-Aldrich, USA)  
Bisakrylamid (Sigma-Aldrich, USA)  
Bradfordovo činidlo (Sigma-Aldrich, USA)  
Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, USA)  
Deionizovaná voda (Watek, IWA 5 roso, ČR)  
Dextromethorphan dibromid monohydrát (Sigma-Aldrich, USA)  
Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, USA)  
Dithiotreitol (Sigma-Aldrich, USA)  
Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema-Chemapol, ČSSR)  
Chlorid železitý (hexahydrát) (Sigma-Aldrich, USA)  
Ethanol, p.a. 96 % (Lach-Ner, ČR)  
Etylendiamintetraoctan disodný (dihydrát) (Sigma-Aldrich, USA)  
Fenazinmethosulfát (Sigma-Aldrich, USA)  
Fenol (Sigma-Aldrich, USA)  
Fenolové činidlo Folin-Ciocalteu (VWR Life Science, USA)  
Glycerol bezvodý (Lach-Ner, ČR)  
Glycin (Lach-Ner, ČR)  
Guajakol (Sigma-Aldrich, USA)  
Hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, USA)  
Hydrogenfosforečnan sodný (dihydrát) (Lachema-Chemapol, ČSSR)  
Hydroxid sodný (Penta, ČR)  
Chlorid sodný (Penta, ČR)  
Ibuprofen (Zentiva, ČR)

Kyselina chlorovodíková 35 % (Lach-Ner, ČR)  
Kyselina octová (Sigma-Aldrich, USA)  
Kyselina šikimová (Sigma-Aldrich, USA)  
Methanol, HPLC grade (Lab-Scan analytical sciences, Polsko)  
N,N,N',N'-tetramethyletylendiamin (Thermo, Japonsko)  
Nikotinamidadeninukleotidfosfát (Roche, Německo)  
Nitrotetrazoliová modř (Sigma-Aldrich, USA)  
Peroxid vodíku 30 % (Lach-Ner, ČR)  
Peroxisíran amonný (Sigma-Aldrich, USA)  
Polyvinylpolypyrrolidon (Sigma-Aldrich, USA)  
Riboflavin (Sigma-Aldrich, USA)  
Sacharosa (Penta, ČR)  
Savo Original (Unilever s.r.o., Velká Británie)  
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (VWR Life Science, USA)  
Uhlíčan sodný bezvodý (Lachema, ČR)  
Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a. nebo vyšší. Testovaná farmaka byly od firmy Zentiva (ibuprofen) a Sigma Aldrich (dextromethorphan dibromid monohydrát).

#### 4.1.2 Použité přístroje

analytické váhy

čtečka destiček (Multiscan GO)

laboratorní váhy/předvážky

laminární box s vertikálním prouděním vzduchu

kultivační box

mrazicí box Liebherr

lednice Liebherr

tlakový hrnc pro sterilizaci baněk a přípravu sterilní vody

kahan Fuego

ultrazvuková lázeň (Fisherbrand FB 15050)

HPLC (Shimadzu, Japonsko): vysokotlaké čerpadlo LC20AD, UV detektor SPD 20 A, kolona Agilent Eclipse XCB o rozměrech 150 × 4 mm (5 μm), předkolona C18 (Wartex), nástřikový kohout Rheodyne (USA), nástřiková smyčka (20 μl)

software Clarity (Data Apex, verze 8.5)

centrifuga (Labnet, Spectrafuge TM 16M)

Centrifuga (Hettich Universal 32)  
UV/VIS spektrofotometr (Ultrospec 2100 Pro)  
elektroforetická souprava Bio-Rad a Biometra

#### 4.1.3 Další použitý materiál

hliníková fólie k uzavření baněk  
automatické pipety  
injekční stříkačky  
stříkačka 50  $\mu\text{l}$  SYR N pro dávkování vzorků do HPLC  
kukuřice setá (*Zea mays*, odrůda DKC 3969, firma Monsanto ČR)

### 4.2 Příprava živného média

Bylo připraveno kultivační médium podle Murashiga a Skooga [53] neobsahující sacharidy tak, že v jednolitrovém odměrném válci bylo smícháno 500 ml destilované vody, 100 ml roztoku makroelementů o složení uvedeném v *Tabulce 1* a 5 ml roztoku mikroelementů dle *Tabulky 2*. K tomu byl přidán 1 ml roztoku komplexu železa (*Tabulka 3*). Pomocí 10% roztoku hydroxidu draselného bylo upraveno pH reakční směsi na 5,8. Směs byla přelita do baněk, které byly uzavřeny hliníkovou fólií a sterilizovány po dobu 20 minut v tlakovém hrnci.

Tabulka 1: Složení makroelementů pro přípravu kultivačního média

Látka	Koncentrace látky v médiu [mg/l]
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170

Tabulka 2: Složení mikroelementů pro přípravu kultivačního média

Látka	Koncentrace látky v médiu [mg/l]
KI	0,83
ZnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	8,6
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22,3
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025
NaMoO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,25
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025

Tabulka 3: Složení roztoku komplexu železa pro přípravu kultivačního média

Látka	Koncentrace látky v médiu [mg/l]
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27,8
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3

## 4.3 Kultivace rostlin

### 4.3.1 Příprava sterilní vody

Pro přípravu sterilní vody bylo odměrným válcem přelito 100 ml kohoutkové vody do odměrné baňky, baňka byla uzavřena hliníkovou fólií a byla ponechána v tlakovém hrnci po dobu 24 minut. Před dalším použitím byla voda ponechána zchladnout.

### 4.3.2 Kultivace rostlin

Nejprve bylo do dvanácti Erlenmeyerových baněk injekční stříkačkou vneseno 10 ml kultivačního média. Hrdla jednotlivých baněk byla uzavřena hliníkovou fólií. Poté byly jednotlivé Erlenmeyerovy baňky sterilizovány v tlakovém hrnci po dobu 20 minut a byly ponechány vychladnout přes noc.

Pro sterilizaci semen kukuřice byly připraveny 15% a 10% roztoky Sava. Do Erlenmeyerovy baňky se semínky kukuřice bylo přidáno 20 ml 70% ethanolu, obsah baňky byl kroužením promíchán a byla ponechána stát po dobu 1 minuty. Po odlití ethanolu byl postup opakován s 15% roztokem Sava. Obsah byl opět promíchán a baňka byla ponechána stát po dobu 10 minut. Analogický postup byl proveden s 10% roztokem Sava. Semena byla dále opláchnuta třikrát za sterilních podmínek sterilizovanou vodou.

Do připravených Erlenmeyerových baněk byla u plamene vnesena čtyři sterilní semínka kukuřice, baňky byly uzavřeny hliníkovou fólií a byly ponechány v kultivační místnosti při teplotě 24 °C a světelným režimem 12 h/12 h světlo/tma (zářivky 40 W/m<sup>2</sup>, Cool White), dokud rostliny nedosáhly požadované velikosti

## 4.4 Přidání farmak a odběr vzorků

### 4.4.1 Přidání farmak v první sérii

Navážka 5,0 mg ibuprofenu byla rozpuštěna ve 2 ml dimethylsulfoxidu v 2 ml odměrné baňce. Do šesti Erlenmeyerových baněk s již vyrostlými rostlinami kukuřice bylo v laminárním boxu přidáno 100 ml sterilizované vody. Před přidáním vody bylo nejprve odstraněno MS médium. K přidání množství vody bylo automatickou pipetou přidáno 200 µl připraveného roztoku ibuprofenu tak, aby bylo dosaženo výchozí koncentrace ibuprofenu 5 mg/l.

Analogický postup byl proveden se šesti dalšími baňkami, do kterých bylo pipetováno 200 µl připraveného roztoku dextromethorphanu pro dosažení výchozí koncentrace 5 mg/l, tvořeného z 6,83 mg dextromethorphanu dibromidu monohydrátu rozpuštěného v 2 ml destilované vody. Byly také připraveny dvě kontrolní baňky se sterilizovanou vodou, do kterých bylo přidáno 200 µl připraveného roztoku ibuprofenu a 200 µl připraveného roztoku dextromethorphanu. Jako kontrola byla označena Erlenmayerova baňka s rostlinou kukuřice, ke které nebylo přidáno žádné farmakum.

#### 4.4.2 Přidání farmak ve druhé sérii – studie směsné fytoextrakce

Ve druhé sérii bylo postupováno stejným způsobem jako v první sérii, s rozdílem, že do všech baněk s rostlinou kukuřice bylo přidáno jak 200 µl připraveného roztoku ibuprofenu (5 mg/l), tak i 200 µl připraveného roztoku dextromethorphanu (5mg/l).

#### 4.4.3 Odběr vzorků

Okamžitě po přidání daného farmaka bylo injekční stříkačkou sterilně odebráno 0,5 ml roztoku do příslušně označené mikrozkuřavky. Hrdlo baňky bylo uzavřeno v plamenu vyžíhanou hliníkovou fólií a baňka s rostlinou kukuřice byla opět umístěna do kultivační místnosti. Další odběry byly prováděny v intervalu 24 hodin po dobu 6 dní. Odběr byl prováděn i z baněk bez rostlin kukuřice pro kontrolu. Mikrozkuřavky s odebranými vzorky byly uchovávány v mrazícím boxu při -20°C.

### 4.5 Ukončení kultivace a následné zpracování rostlin

Po provedení posledního odběru byly rostliny omyty v destilované vodě, kořeny od listů byly separovány a zváženy. Poté byly z poloviny listů a kořenů připraveny směsné vzorky po 0,5 g a zamrazeny v kapalném dusíku a uchovávány při -80°C pro biochemické experimenty. Druhá polovina rostlinného materiálu byla skladována v mrazícím boxu při teplotě -20°C pro další zpracování.

### 4.6 Detekce a kvantifikace léčiva v kultivačním médiu pomocí HPLC/UV

Analýza jednotlivých odebraných vzorků média byla provedena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV detekcí. Jako mobilní fáze byla použita směs o složení methanol : acetonitril : 1% kyselina octová v poměru 1 : 1 : 1 (100 : 100 : 100 v/v/v). Průtok použitý při měření byl 1,0 ml za minutu. Použitá kolona byla Agilent Eclipse XCB 150 × 4 mm (5 µm). Měření bylo provedeno při 230 nm za laboratorní teploty. Analýzy byly prováděny přímým vstřikem 20 µl media po jeho předchozí centrifugaci (14000 rpm, průměr

rotoru 100 mm). Vyhodnocení kalibrační závislosti a stanovení koncentrací z chromatogramů byly zpracovány pomocí programu *Clarity* verze 8.5.

## 4.7 Biochemická analýza rostlin

### 4.7.1 Příprava rostlinných vzorků pro stanovení obsahu fenolických látek a antioxidační kapacity

Po ukončení kultivace byly rostliny vyndány z Erlenmeyerovy baňky pomocí pinzety, listy byly odděleny od kořenů nůžkami a zváženy. Poté byly jednotlivé vzorky listů i kořenů zmrazeny v kapalném dusíku a uchovány při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Pro extrakci byl vždy vzat vzorek listu s daným farmakem, byl převeden do třecí misky, ve které byl tloučkem homogenizován za přídavku kapalného dusíku. Následně byl přidán 50% ethanol v čtyřnásobném objemu navážky vzorku listu, směs byla promíchána a přelita do mikrozkušavky. Extrakty v mikrozkušavce byly centrifugovány při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $16\ 000\times g$ , po dobu 15 minut. Poté byl automatickou pipetou odebrán supernatant, který byl využit k dalším stanovením.

### 4.7.2 Stanovení antioxidační kapacity metodou FRAP

Principem stanovení antioxidační kapacity metodou FRAP dle [54] je redukce 2,4,6-tripyridyl-s-triazinu železitého ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) na tripyridyltriazin železnatý ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ), jejímž důkazem je za nízkého pH modré až šedé zbarvení roztoku. Pro toto stanovení bylo nejprve připraveno 100 ml čerstvého činidla FRAP složeného z navážky 0,0055 g TPTZ ve 25 ml 40mM HCl, 10 ml 20mM  $\text{FeCl}_3$  a 65 ml 300mM octanového pufru (pH = 3,6). Činidlo bylo zakryto hliníkovou fólií pro ochranu před světlem. Do mikrotitrační destičky bylo automatickou pipetou přidáno 40  $\mu\text{l}$  vhodně zředěného extraktu, k tomuto množství bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  připraveného FRAP činidla a reakční směs byla promíchána. Celé stanovení bylo prováděno v triplicátech. Mikrotitrační destička byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Následně byla změřena absorbance reakční směsi při 593 nm proti roztoku slepého vzorku, který byl tvořen 40  $\mu\text{l}$  50% ethanolu.

Kalibrace byla provedena s roztoky kyseliny askorbové o koncentracích v rozmezí 10-120  $\mu\text{mol/l}$ .

### 4.7.3 Stanovení fenolických látek

Pro stanovení fenolických látek metodou dle [54] bylo využito reakce fenolu s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Do mikrotitrační destičky bylo automatickou pipetou pipetováno 20  $\mu\text{l}$  vhodně zředěného rostlinného extraktu připraveného v 50% ethanolu.

K tomuto množství bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  10% (v/v) Folin-Ciocalteuova činidla a po 4 minutách inkubace při laboratorní teplotě 80  $\mu\text{l}$  75  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  roztoku uhličitanu sodného  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Stanovení bylo provedeno v triplikátech. Reakční směs byla inkubována při laboratorní teplotě po 30 minut a následně byla měřena absorbance při 760 nm proti absorbance roztoku slepého vzorku tvořeného 20  $\mu\text{l}$  50% ethanolu. Pro kalibraci byl rostlinný extrakt nahrazen roztokem fenolu o koncentracích v rozmezí 100–700  $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

#### 4.7.4 Příprava rostlinných extraktů pro stanovení enzymové aktivity

Rostlinný materiál (listy, kořeny) byl nejprve homogenizován ve třecí misce po přidání tekutého dusíku a ve čtyřnásobném množství oproti navážce vzorku extrakčního pufru složeného z 100mM Tris-HCl pufru (pH = 7,8), 1mM DTT, 1mM EDTA, 10 mM askorbátu sodného. K reakční směsi bylo také přidáno malé množství PVP, které je schopné vázat fenolické látky, které by potenciálně mohly inhibovat enzymovou aktivitu. Vzorky byly centrifugovány při 4 °C, 16 000 $\times$ g, po dobu 15 minut. Extrakt byl odebrán do mikrozkušavek pro další použití.

#### 4.7.5 Stanovení množství bílkovin dle Bradforda

Pro stanovení množství bílkovin v jednotlivých extraktech bylo použito stanovení dle Bradforda [55], které vychází z reakce bazických aminokyselin bílkoviny v extraktu s Bradfordovým činidlem, obsahujícím Coomassie brilliant blue G 250. Do každé jamky bylo vždy přidáno 20  $\mu\text{l}$  stanovovaného vzorku a 200  $\mu\text{l}$  Bradfordova činidla. Mikrotitrační destička byla ponechána 10 minut inkubovat, následně byla měřena absorbance při 595 nm a 450 nm. Kalibrace byla provedena s roztoky hovězího sérového albuminu (BSA). Celé stanovení bylo provedeno v triplikátech.

Z naměřených hodnot absorbance byla sestrojena kalibrační přímka a z té byla následně odečtena koncentrace proteinů ve stanovovaných vzorcích.

#### 4.7.6 Stanovení aktivity celkových volných a membránově vázaných peroxidas

Celkové volné a membránově vázané peroxidasy byly detekovány metodou dle [56]. Celkové peroxidasy byly stanoveny za využití barevného substrátu 3,3'-diaminobenzidinu (DAB). Do mikrotitrační destičky bylo k 20  $\mu\text{l}$  připraveného rostlinného extraktu přidáno 155  $\mu\text{l}$  50mM fosfátového pufru (pH 7,0), 5  $\mu\text{l}$  49mM roztoku peroxidu vodíku a 20  $\mu\text{l}$  činidla DAB, které bylo připraveno z 10 mg v 2,5 ml 96% ethanolu a následně sonikováno po dobu 5 minut. Změna absorbance byla měřena kontinuálně po dobu 5 minut při 430 nm za laboratorní teploty. Pro stanovení membránově vázaných peroxidas byl sediment po

centrifugaci promyt extrakčním pufrům o složení 100 mM Tris-HCl pufr (pH 7,8); 1 mM DTT; 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA; 10 mM askorbát sodný, s 1 M roztokem NaCl. Směs byla opět centrifugována a byl proveden analogický postup měření jako bylo popsáno u stanovení celkových volných peroxidů.

#### 4.7.7 Stanovení aktivity guajakolperoxidasy

Aktivita guajakolperoxidasy byla stanovena metodou dle [56]. Směs o složení 155  $\mu$ l 50mM fosfátového pufru (pH = 7,0), 5  $\mu$ l 49mM peroxidu vodíku a 20  $\mu$ l 9mM roztoku guajakolu byla přidána ke 20  $\mu$ l rostlinného extraktu v mikrotitrační destičce. Změna absorbance byla měřena kontinuálně po dobu 5 minut při 470 nm za laboratorní teploty. Molární absorpční koeficient odpovídal hodnotě 26600 M<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup> (Wu, 2010, Jebara, 2005).

#### 4.7.8 Elektroforetická separace za nativních podmínek

Pro provedení nativní elektroforézy byly nejprve připraveny 10% separační polyakrylamidové gely. Tyto gely byly po polymeraci převrstveny 4% zaostřovacím gelem. 10% separační gel byl vytvořen smíšením 7,9 ml destilované vody, 6,7 ml 30% roztoku akrylamidu/bis-akrylamidu (36,5:1), 5,0 ml 1,5 mol · l<sup>-1</sup> Tris-HCl pufru (pH = 8,8), 0,2 ml 10% (w/v) glycerol, 2  $\mu$ l TEMED. Nakonec bylo přidáno 200  $\mu$ l 10% peroxidisíranu amonného k iniciaci polymerace gelu. Reakční směs byla nalita mezi čtyři elektroforetická skla (10,0 × 8,0 cm), byl převrstven malým množstvím destilované vody a byl ponechán stát při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Po polymeraci byl převrstven 4% zaostřovacím gelem skládajícím se z 1,22 ml destilované vody, 0,26 ml 30% roztoku akrylamidu/bis-akrylamidu (36,5:1), 0,5 ml 0,5 mol · l<sup>-1</sup> Tris-HCl pufru (pH = 6,8), 0,0005 ml TEMED. Roztok SDS byl opět nahrazen 0,02 ml 10% roztokem glycerolu. Jako poslední bylo znovu přidáno 20  $\mu$ l 10% peroxidisíranu amonného, mezi elektroforetická skla byl vložen hřeben a gel byl inkubován při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Elektrodový pufr (pH 8,3) byl připraven z 3 g Tris, 18,8 g glycinu, 10 ml 10% glycerolu doplněn do 1 litru destilovanou vodou. Na gel byly nanášeny rostlinné extrakty (viz kap. 4.7.4) s obsahem 20% (w/v) sacharosy, tak aby v každé jamce bylo stejné množství proteinů stanovené metodou dle Bradforda (viz kap. 4.7.5).

Následně bylo přidáno 100  $\mu$ l 0,1% (w/v) bromfenolové modři do elektrodového pufru v horním prostoru elektroforetické aparatury. Po připojení zdroje stejnosměrného proudu byla započata elektroforéza při počátečním napětí 70 V, po doputování bromfenolové modři do separačního gelu bylo napětí zvýšeno na 140 V. Elektroforetická separace byla ukončena v okamžiku, kdy bromfenolová modř doputovala na konec gelu.

#### 4.7.8.1 Detekce aktivity a izoenzymů askorbátperoxidasy v gelu

Pro detekci aktivity askorbátperoxidasy metodou dle [57] byl nejprve gel vložen do 20 ml ekvilibračního pufru I, který byl složen z 50mM fosfátového pufru o pH = 7,0 a 2mM askorbátu. Následně byl gel inkubován po dobu 10 minut ve 20 ml ekvilibračního pufru II, složeného z 50mM fosfátového pufru (pH = 7,0), 4 mM askorbátu a 6 µl 30% peroxidu vodíku. Gel byl následně promyt v 20 ml 50mM fosfátového pufru (pH = 7,0) a byl ponořen do detekčního pufru o složení 50mM fosfátového pufru (pH = 7,8), 28mM TEMED, 2,45 mM nitroblue tetrazolium (NBT). Achromatický proužek na tmavém pozadí pak vyznačoval stanovovanou aktivitu askorbátperoxidasy přítomnou v daném gelu.

#### 4.7.8.2 Detekce aktivity a izoenzymů peroxidasy v gelu

Pro toto stanovení dle [56] byl gel ponořen do 0,01 g DAB, který slouží jako donor vodíku a umožňuje vizualizaci aktivity peroxidasy přítomných v gelu, rozpuštěného v roztoku 2,5 ml 96% ethanolu, 7 ml 100mM fosfátového pufru (pH = 7,0), 100 µl 30% peroxidu vodíku a doplněného destilovanou vodou do 10 ml. Před vložením gelu byl roztok krátce sonikován. Po vybarvení byl gel promyt v malém množství destilované vody. Aktivita peroxidasy byla detekována jako tmavě hnědě zbarvené proužky.

#### 4.7.8.3 Detekce aktivity a izoenzymů superoxiddismutasy v gelu

Pro stanovení aktivity superoxiddismutasy v gelu [56], které vychází z fotoreakce NBT za vzniku nerozpustného modrého formazanu, byla vytvořena reakční směs smíšením 1,5mM EDTA, 70mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6mM riboflavinu, 0,47% TEMED a 0,3% NBT. Směs byla až do doby použití obalena hliníkovou fólií pro ochranu před světlem. Petriho miska s reakční směsí a do ní ponořeným gelem byla po dobu 20 minut inkubována při laboratorní teplotě bez přístupu světla. Poté byl gel vložen do malého množství destilované vody a umístěn po dobu 15 minut pod zářivku o 9 W. Aktivita superoxiddismutasy byla detekována jako světlý proužek na tmavém pozadí.

#### 4.7.8.4 Detekce aktivity a izoenzymů šikimátdehydrogenasy v gelu

Pro stanovení aktivity šikimátdehydrogenasy metodou dle [58] byl gel inkubován v 10 ml reakční směsi o složení 100mM 2-amino-2-methyl-1-propanol-NaOH pufru (pH 9,0), 0,2mM NADP, 3mM šikimát, 0,1 mg/ml nitroblue tetrazolium, 5 µg/ml fenazin methosulfát a 5,45 ml destilované vody. Roztok byl před použitím krátce sonikován. Aktivita šikimátdehydrogenasy byla detekována jako modrý proužek v gelu.

## 5. Výsledky

### 5.1 Kalibrace ibuprofenu

Pro provedení kalibrace byly použity roztoky ibuprofenu rozpuštěného v methanolu o koncentracích 1, 2, 3, 5 a 7,5 mg/l. S využitím programu *Clarity* byla k jednotlivým naměřeným píkům z analýzy rostlinných vzorků média odečtena odpovídající koncentrace přítomného léčiva. Byla též vypočtena hodnota limitu detekce a limitu kvantifikace pro danou koncentraci. Hodnota limitu (LOD) detekce pro koncentraci 3 mg/l činila 0,28 mg/l a limit kvantifikace (LOQ) byl dopočten jako desetinásobek LOD, tedy 0,92 mg/l.

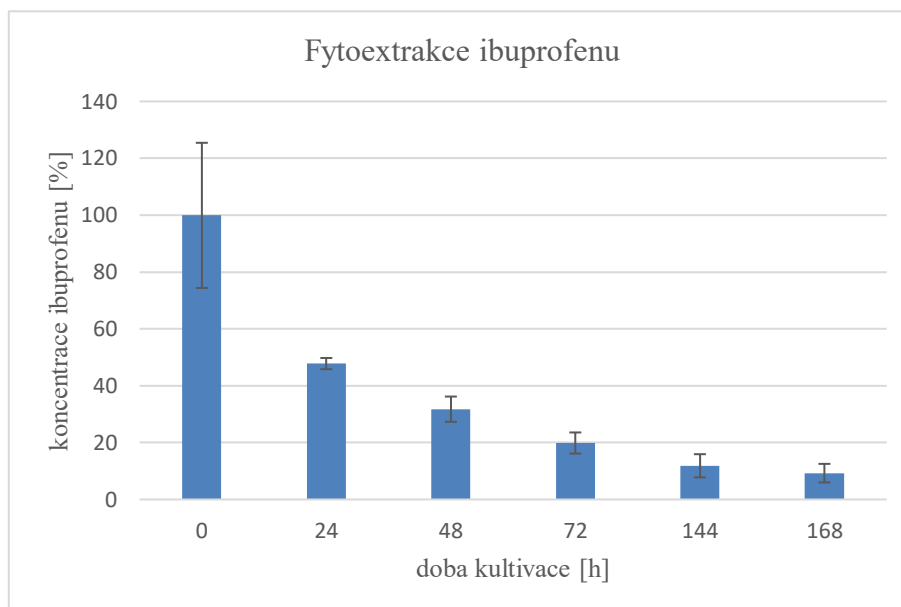
### 5.2 Výsledky fytoextrakce

#### 5.2.1 Výsledky fytoextrakce ibuprofenu

Tabulka 4: Pokles koncentrace ibuprofenu ve vodné fázi v průběhu kultivace jednotlivých rostlin *Zey mays*

Koncentrace ibuprofenu ve vodné fázi [mg/l]						
Vzorek	0 h	24 h	48 h	72 h	144 h	168 h
1	1,32	1,24	0,73	0,48	0,22	0,64
2	2,54	1,23	0,70	0,54	0,15	0,11
3	3,05	1,28	1,03	0,64	0,38	0,34
4	2,99	1,14	0,80	0,35	0,35	0,29
5	3,02	1,28	0,83	0,55	0,43	0,22
Průměr (smodch)	2,58 (0,66)	1,23 (0,05)	0,82 (0,11)	0,51 (0,10)	0,31 (0,11)	0,24 (0,08)
Medián	2,99	1,24	0,80	0,54	0,35	0,25

Graf 1: Pokles koncentrace ibuprofenu ve vodné fázi v průběhu kultivace rostlin s přidáním ibuprofenem



Pokles jednotlivých koncentrací ibuprofenu v průběhu kultivace zobrazuje *Graf 1*. Původně zamýšlené koncentrace ibuprofenu 5 mg/l nebylo dosaženo pravděpodobně důsledkem rychlé sorpce léčiva na kořeny rostliny. Jako 100 % byla proto zvolena průměrná koncentrace ibuprofenu ve vodné fázi všech pěti rostlin v době označené jako 0 h (*Graf 1*), tedy ihned po přidání příslušného analgetika. Po 24 h kultivace byl zaznamenán pokles koncentrace ve vodné fázi (v médiu) o 52 %. Další odběr, proveden po 48 h od přidání analgetika, vypovídal o poklesu koncentrace ibuprofenu o 16 %. Při odběru v 72 hodinách od přidání klesla koncentrace o 12 %, po 144 hodinách o 8 %.

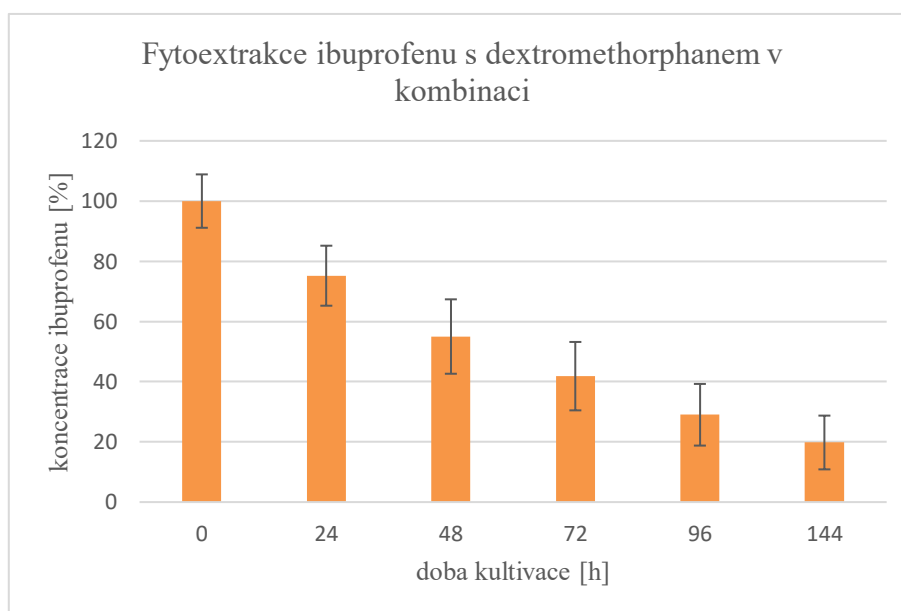
Kultivace byla ukončena po 168 hodinách, kdy koncentrace ibuprofenu klesla oproti předchozímu odběru o 3 %, respektive ze 100 % bylo ve vodné fázi detekováno pouze 9 % ibuprofenu. Z počáteční průměrné koncentrace ibuprofenu o hodnotě 2,58 mg/l byla po 168 hodinách detekována finální průměrná koncentrace 0,24 mg/l. Rozdíl počáteční a finální koncentrace tedy tvořil 2,34 mg/l (91 %). Rozdíl mezi počáteční koncentrací a koncentrací po 144 hodinách od přidání analgetika byl 2,28 mg/l, respektive 88 %.

## 5.2.2 Výsledky fytoextrakce ibuprofenu s dextromethorphanem v kombinaci

Tabulka 5: Pokles koncentrace ibuprofenu ve vodné fázi v průběhu kultivace pro jednotlivé rostliny *Zea mays*

Vzorek	Koncentrace ibuprofenu ve vodné fázi [mg/l]					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	144 h
1	2,17	1,74	1,14	1,05	0,63	0,45
2	2,60	2,05	1,43	1,01	0,51	0,44
3	2,69	1,85	1,63	1,34	1,10	0,77
4	2,91	2,00	1,20	0,78	0,55	0,32
5	2,81	1,72	1,21	0,79	0,62	0,25
6	2,59	2,50	2,07	1,62	1,17	0,90
Průměr (smodh)	2,63 (0,23)	1,98 (0,26)	1,45 (0,32)	1,10 (0,30)	0,76 (0,27)	0,52 (0,23)
Medián	2,64	1,93	1,32	1,03	0,62	0,45

Graf 2: Pokles koncentrace ibuprofenu ve vodné fázi v jednotlivých časech kultivace provedené v kombinaci s dextromethorphanem

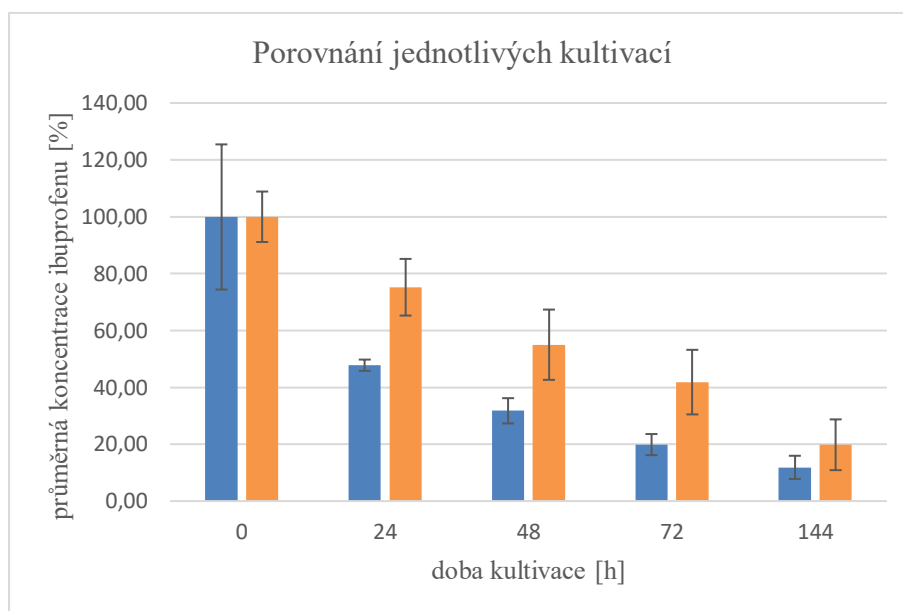


Pokles koncentrace ibuprofenu ve vodné fázi u jednotlivých rostlinných vzorků při kultivaci s dextromethorphanem v kombinaci je zobrazen na *Grafu 2*. Jako 100 % byla zvolena průměrná koncentrace u všech šesti rostlinných vzorků v čase 0 h stejně jako u kultivace s ibuprofenem samotným. Po uplynutí jednoho dne byl naměřen pokles této koncentrace o 25 %. Po 48 hodinách byl úbytek 20 %. V 72 hodinách klesla koncentrace ibuprofenu ve vodné fázi o 13 %, stejně tak i po 96 hodinách. Kultivace byla ukončena po 144 hodinách, kdy byl naměřen pokles koncentrace ibuprofenu o 9 %. Po 144 hodinách tedy z 100 % koncentrace ibuprofenu ve vodné fázi zbylo v průměru 20 %, což odpovídá snížení o 80 %,

respektive z počáteční koncentrace ibuprofenu, která byla rovna v průměru 2,63 mg/l, byla naměřena finální průměrná koncentrace ibuprofenu o hodnotě 0,52 mg/l. Rozdíl počáteční a finální koncentrace činil 2,11 mg/l.

### 5.2.3 Porovnání jednotlivých kultivací

Graf 3: Porovnání poklesu koncentrace ibuprofenu u kultivace rostlin s ibuprofenem samotným (modře) oproti kultivaci s kombinací ibuprofen s dextromethorphanem (oranžově)



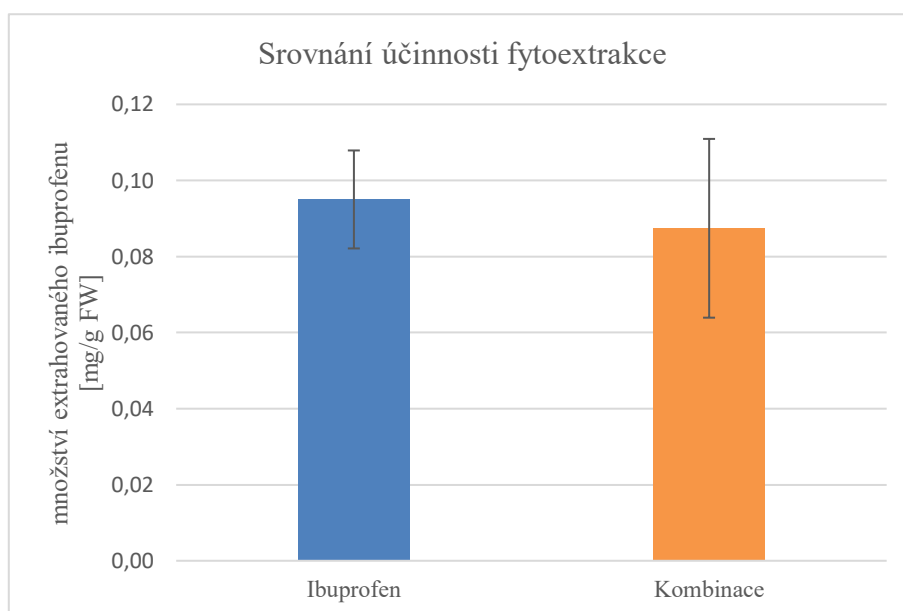
Porovnání jednotlivých kultivací rostlin zobrazuje *Graf 3*. Na grafu jsou patrné rozdíly mezi kultivacemi rostlin s ibuprofenem samotným a v kombinaci s dextromethorphanem. U kultivace rostlin s přidáním dextromethorphanem v médiu je pokles koncentrace ibuprofenu ve vodné fázi výrazně méně strmý než v případě, kdy bylo rostlinám podáno pouze analgetikum.

Koncentrace ibuprofenu po 24 hodinách již dosahuje hodnoty nižší o 52 %, kdežto v kombinaci s dextromethorphanem v médiu klesne pouze o 25 %. Po 48 hodinách byl pokles u samotného ibuprofenu v médiu z 48 % na 32 %, u kombinace ze 73 % na 50 %, po 72 hodinách na 20 % u ibuprofenu a 39 % u kombinované kultivace. Po 144 hodinách byl tento z počátku velmi výrazný rozdíl zdánlivě vyrovnán, u ibuprofenu samotného byla finální průměrná koncentrace 12 %, v případě kultivace v přítomnosti dextromethorphanu 20 %.

#### 5.2.4 Účinnost fytoextrakce

Po porovnání fytoextrakce jednotlivých kultivací byla stanovena její účinnost jako hmotnost extrahovaného ibuprofenu (mg) na gram čerstvé hmotnosti listu za 144 hodin, tedy po ukončení fytoextrakce. Účinnost fytoextrakce ibuprofenu kultivovaného samostatně byla 0,10 mg na gram čerstvé hmotnosti listu. Při kultivaci ibuprofenu společně s dextromethorphanem bylo dosaženo hodnoty 0,09 mg na gram čerstvé hmotnosti listu. Srovnání účinnosti fytoextrakce zobrazuje *Graf 4*.

Graf 4: Porovnání účinnosti fytoextrakce pro kultivaci ibuprofenu samotného a pro kultivaci ibuprofenu v kombinaci s dextromethorphanem. FW znamená čerstvá hmotnost listu.



### 5.3 Biochemická analýza rostlinného metabolismu

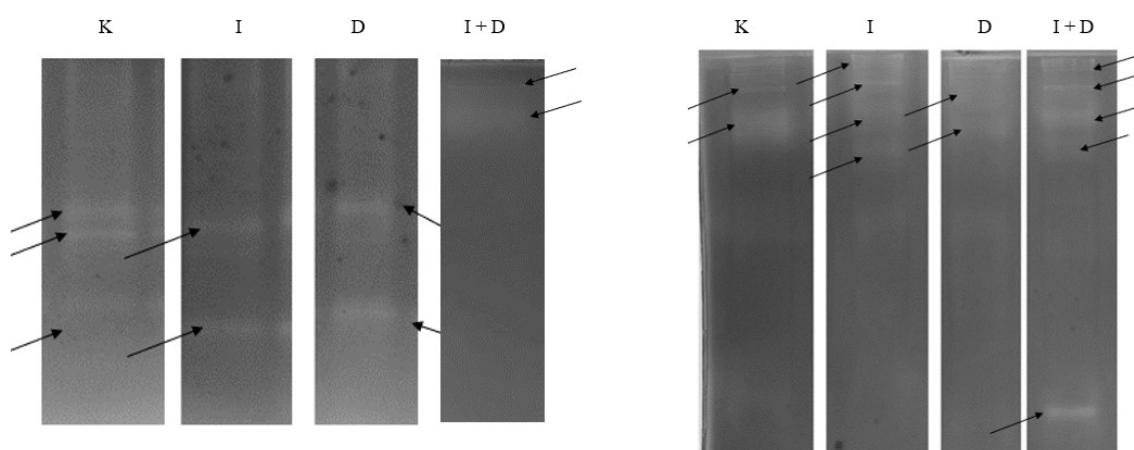
Rostliny z prvního experimentu byly analyzovány z hlediska obsahu fenolických látek, antioxidační kapacity a koncentrace proteinů. Aktivity a izoenzymového složení celkových volných a membránově vázaných peroxidas, askorbátperoxidasy, šikimátdehydrogenasy bylo detekováno pomocí elektroforetické separace za nativních podmínek. Aktivita celkových volných a membránově vázaných peroxidas a guajakolperoxidasy byla detekována spektrofotometricky jako závislost absorbance na čase. Z naměřených hodnot absorbance byla vybrána lineární část jejího nárůstu odpovídající tvorbě produktu a byla přepočítána na změnu absorbance za minutu. Výsledná aktivita byla vyjádřena v procentech vůči kontrolní skupině rostlin anebo pomocí molárního absorpčního koeficientu jako množství produktu v  $\mu\text{mol}$  vztaženého na čas v minutách (U) a vztažena na čerstvou hmotnost (FW).

### 5.3.1 Výsledky nativní elektroforézy

Pomocí nativní elektroforézy byla ve vzorcích listů a kořenů rostlin pěstovaných s jednotlivými léčivy detekována aktivita a izoenzymové složení askorbátperoxidasy, peroxidasy, superoxiddismutasy a šikimátdehydrogenasy. Intenzita zabarvení vyjadřuje u peroxidasy a šikimátdehydrogenasy aktivitu těchto enzymů, počet zobrazených pruhů značí počet jeho detekovaných izoforem. U superoxiddismutasy a askorbátperoxidasy je aktivita naopak detekovatelná z prázdného místa (tedy světlého proužku na tmavém pozadí) v gelu.

#### 5.3.1.1 Detekce aktivity askorbátperoxidasy v gelu

Metodou uvedenou v kapitole 4.7.8.1 byla stanovena aktivita askorbátperoxidasy ve



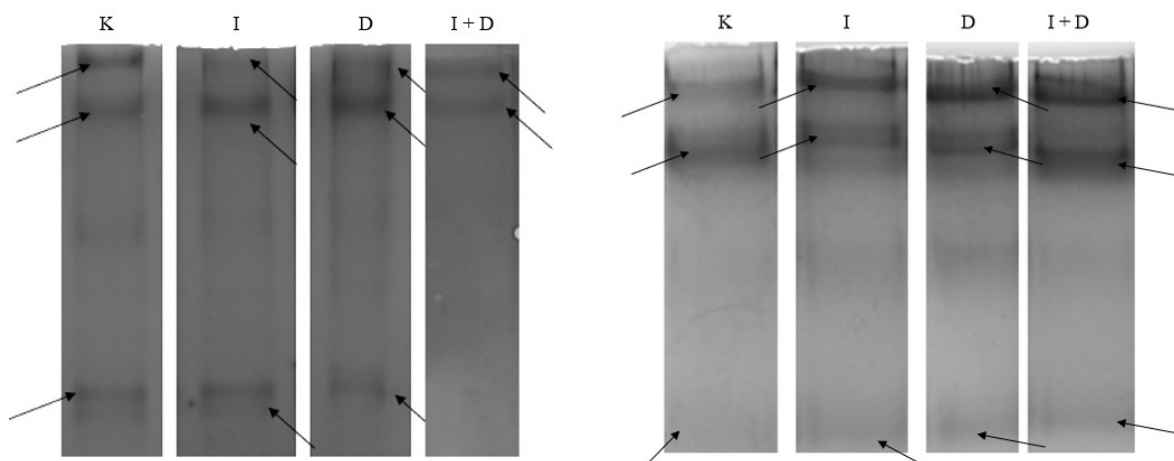
Obrázek 3: Detekce aktivity askorbátperoxidasy v gelu po elektroforetické separaci extraktů listů (vlevo) a kořenů (vpravo) rostlin pěstovaných s přidaným léčivem. K = kontrola bez přidaného léčiva, I = obsahující ibuprofen, D = obsahující dextromethorphan, I + D = obsahující ibuprofen v kombinaci s dextromethorphanem

vzorcích listů a kořenů rostlin pěstovaných s léčivem. *Obrázek 3* vlevo zobrazuje detekci askorbátperoxidasy v extraktech listů s přidanými léčivem. Jednotlivé izoformy tohoto enzymu jsou znázorněny šipkami, přičemž nejvíce izoforem bylo detekováno v *kontrole*, tedy v extraktu listu rostlin pěstovaných bez přidaného léčiva. Detekci v extraktech kořenů zobrazuje elektroforeogram vpravo. Je z něj patrné, že askorbátperoxidasa detekovaná v extraktech kořenů má mnohem více izoforem než v případě listů. Nejvíce izoforem bylo detekováno v případě ibuprofenu a dextromethorphanu v médiu. V kořenech rostlin pěstovaných s ibuprofenem v kombinaci s dextromethorphanem byla zaznamenána izoforma s nejvyšší pohyblivostí tohoto enzymu.

### 5.3.1.2 Detekce aktivity peroxidasy v gelu

Dle metody v kapitole 4.7.8.2 byla detekována aktivita peroxidasy v gelu, jak je znázorněno na *Obrázku 4*.

Elektroforeogram vlevo zobrazuje detekci peroxidasy v listech. Šípkami jsou znázorněny



*Obrázek 4: Detekce peroxidasy v gelu po elektroforetické separaci extraktů listů (vlevo) a kořenů (vpravo) rostlin pěstovaných s přidáním léčiv. K = kontrola bez přidaného léčiva, I = obsahující ibuprofen, D = obsahující dextromethorphan, I + D = obsahující ibuprofen v kombinaci s dextromethorphanem*

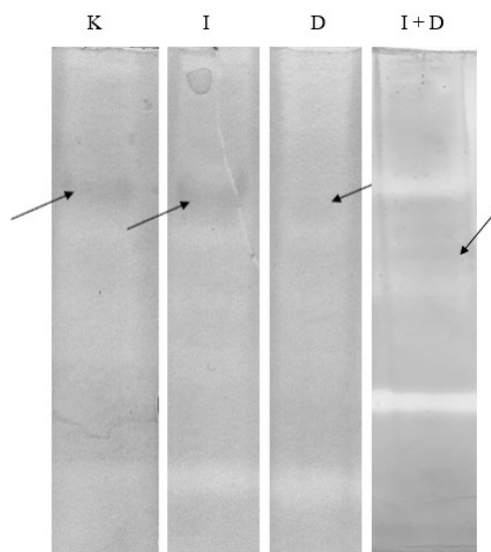
jednotlivé izoformy těchto enzymů, nejméně izoform bylo detekováno v případě kombinace ibuprofenu a dextromethorphanu. Největší aktivita peroxidasy byla detekována v případě kultivace rostlin s dextromethorphanem v médiu a v případě kultivace, kdy byl společně s ním přítomen i ibuprofen. Gel po provedené elektroforetické separaci extraktů kořenů ukazuje *Obrázek 4* (str. 38) vpravo. Je vidět mnohem intenzivnější zbarvení, tedy i mnohem vyšší aktivita peroxidasy v extraktech kořenů oproti extraktům listů. Největší aktivita byla detekována v případě extraktu, kde byla přítomna obě léčiva současně. Ve všech kořenech všech skupin rostlin byly detekovány 3 izoformy peroxidasy, v případě *kontroly* měla však izoforma s nejvyšší pohyblivostí nejnižší intenzitu zbarvení oproti kořenům rostlin pěstovaných s léčivem, a tedy měla nejnižší aktivitu.

### 5.3.1.3 Detekce aktivity superoxiddismutasy v gelu

Aktivita superoxiddismutasy nebyla v gelu po elektroforetické separaci pozorována ani v listech, ani v kořenech rostlin pěstovaných s přidáním léčiv.

#### 5.3.1.4 Detekce aktivity šikimátdehydrogenasy v gelu

Detekce aktivity šikimátdehydrogenasy v gelu po elektroforetické separaci zobrazuje *Obrázek 5*.



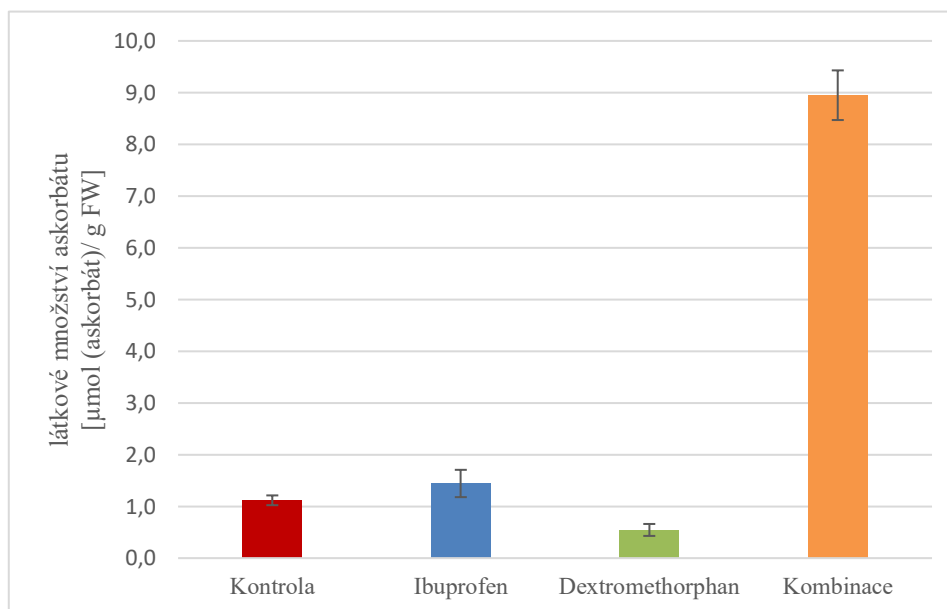
*Obrázek 5: Detekce aktivity šikimátdehydrogenasy v gelu po elektroforetické separaci v extraktech listů s přidanými léčivy (vlevo – černobíle; vpravo – barevně). K = kontrola bez přidaného léčiva, I = obsahující ibuprofen, D = obsahující dextromethorphan, I + D = obsahující ibuprofen v kombinaci s dextromethorphanem*

Aktivitu šikimátdehydrogenasy, která byla detekovaná v listech experimentálních rostlin, značí proužky zvýrazněné šipkami na *Obrázku 5*. Nejvyšší aktivita byla pozorována v listech rostlin pěstovaných s přidaným ibuprofenem a kontrolních listech rostlin pěstovaných bez přidaného léčiva. Naopak nejnižší aktivita byla pozorována v listech rostlin pěstovaných s dextromethorphanem. V případě stanovení tohoto enzymu nebyly pozorovány žádné jeho izoformy. Tmavší proužky značí aktivitu šikimátdehydrogenasy, na *Obrázku 5* jsou však patrná i prázdná místa v gelu, která poukazují pravděpodobně na aktivitu jiného enzymu přítomného v listech využívajícího některé substráty v reakční směsi. Aktivita šikimátdehydrogenasy nebyla detekována v kořenech rostlin.

### 5.3.2 Stanovení antioxidační kapacity

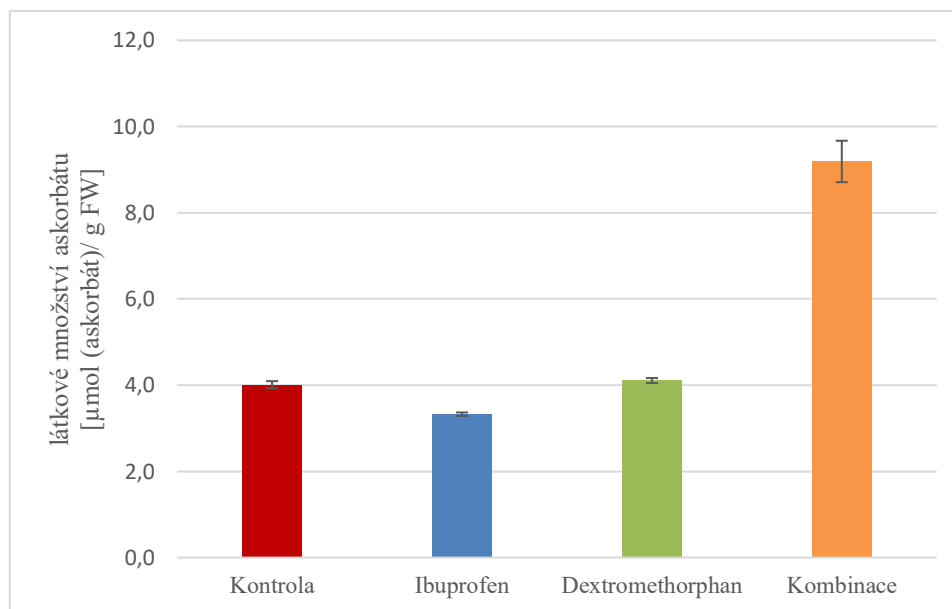
Výsledky stanovení antioxidační kapacity metodou FRAP (4.7.2) pro listy rostlin pěstovaných s léčivy zobrazuje *Graf 5*.

*Graf 5: Výsledky stanovení antioxidační kapacity pro listy rostlin pěstovaných s přidávanými léčivy a kontrolní skupiny rostlin (bez přidávaného léčiva) zjištěné metodou FRAP. FW znamená čerstvá hmotnost listů.*



Antioxidační vlastnosti jednotlivých extraktů jsou vyjádřeny jako látkové množství askorbátu přepočteného na gram čerstvé hmotnosti listu (FW). Antioxidační kapacita v extraktech listů stanovená touto metodou se nacházela v intervalu 0,50 – 8,95  $\mu\text{mol/g}$  FW. Nejvyšší antioxidační kapacita byla detekována v listech rostlin pěstovaných s ibuprofenem v kombinaci s dextromethorphanem, naopak nejnižší kapacita byla stanovena v listech rostlin, kde byl v médiu pouze dextromethorphan.

Graf 6: Výsledky stanovení antioxidační kapacity v kořenech rostlin pěstovaných s přidávanými léčivými a kořeny kontrolních rostlin (bez přidávaného léčiva) zjištěné metodou FRAP. FW znamená čerstvá hmotnost.

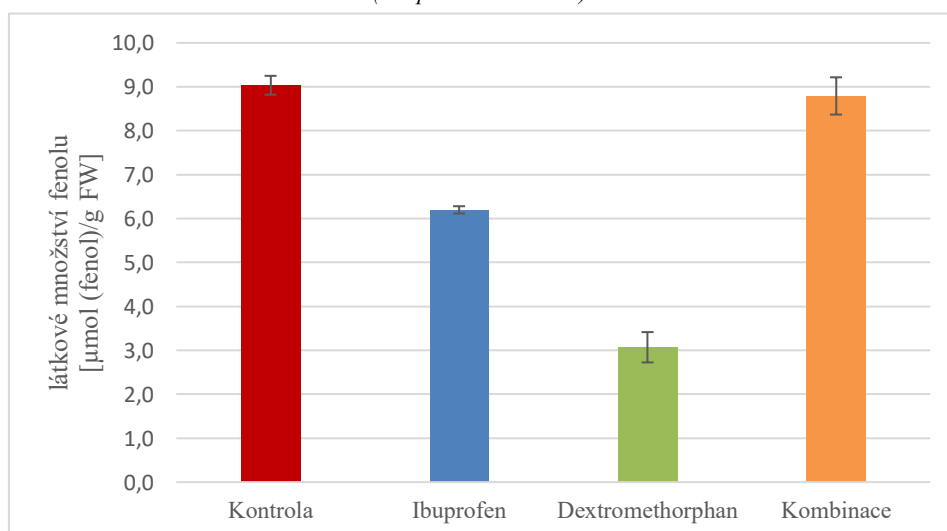


Graf 6 zobrazuje stanovení antioxidační kapacity stanovenou touto metodou pro kořeny experimentálních rostlin. Zde byly detekované antioxidační vlastnosti v intervalu 3,33 – 9,19  $\mu\text{mol/g FW}$ . Kořeny rostlin tedy vykazovaly vyšší hodnoty antioxidační kapacity, než bylo zjištěno v listech. Nejvyšší antioxidační kapacita byla opět stanovena v kořenech, kde byla přidána obě léčiva do média. Nejnižší hodnotu zde vykazoval kořeny rostlin pěstované s ibuprofenem.

### 5.3.3 Stanovení obsahu fenolických látek

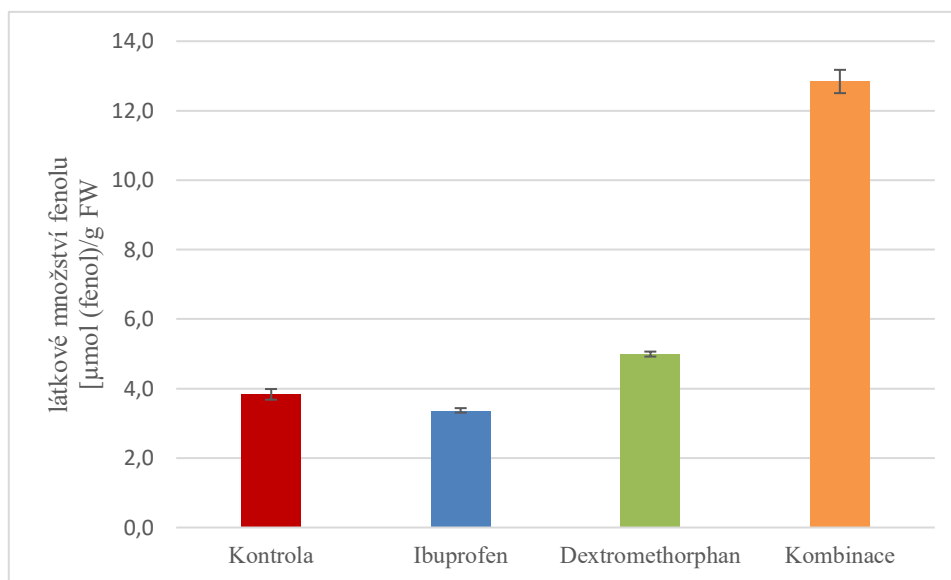
Obsah fenolických látek (4.7.3) v listech je zobrazen na Grafu 7.

Graf 7: Výsledky stanovení obsahu fenolických látek v listech rostlin pěstovaných s přidávanými léčivými v médiu a v kontrolních listech rostlin (bez přidávaného léčiva). FW znamená čerstvá hmotnost.



Je vyjádřen jako látkové množství fenolu přepočtené na gram čerstvé hmotnosti listu. Zjištěný obsah fenolických látek byl v extraktech listů v intervalu 3,1 – 9,0  $\mu\text{mol/g}$  FW. Nejvíce fenolických látek obsahovaly kontrolní listy rostlin pěstované bez přidaného léčiva, nejméně fenolických látek bylo detekováno v listech rostlin pěstovaných s ibuprofenem.

Graf 8: Výsledky stanovení fenolických látek v kořenech rostlin pěstovaných s léčivy a v kořenech kontrolních rostlin (bez přidaného léčiva). FW znamená čerstvá hmotnost.

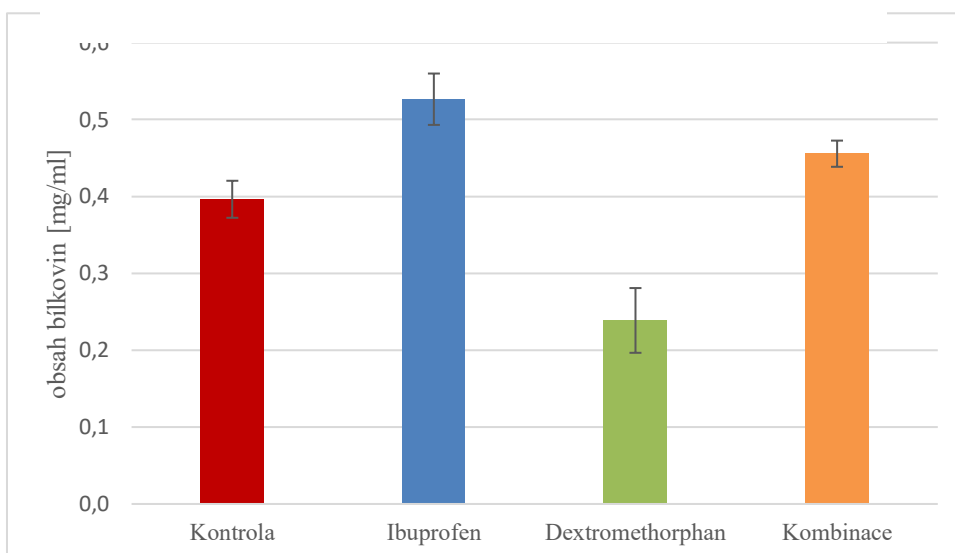


V kořenech experimentálních rostlin (Graf 8) byl obsah fenolických látek v intervalu 3,4 – 12,8  $\mu\text{mol/g}$  FW. Nejvyšší koncentrace fenolických látek byla detekována v kořenech rostlin pěstovaných v médiu obsahujícím obě léčiva. Nejméně fenolických látek bylo stanoveno v kořenech s přidaným ibuprofenem do média.

#### 5.3.4 Stanovení obsahu bílkovin metodou dle Bradforda

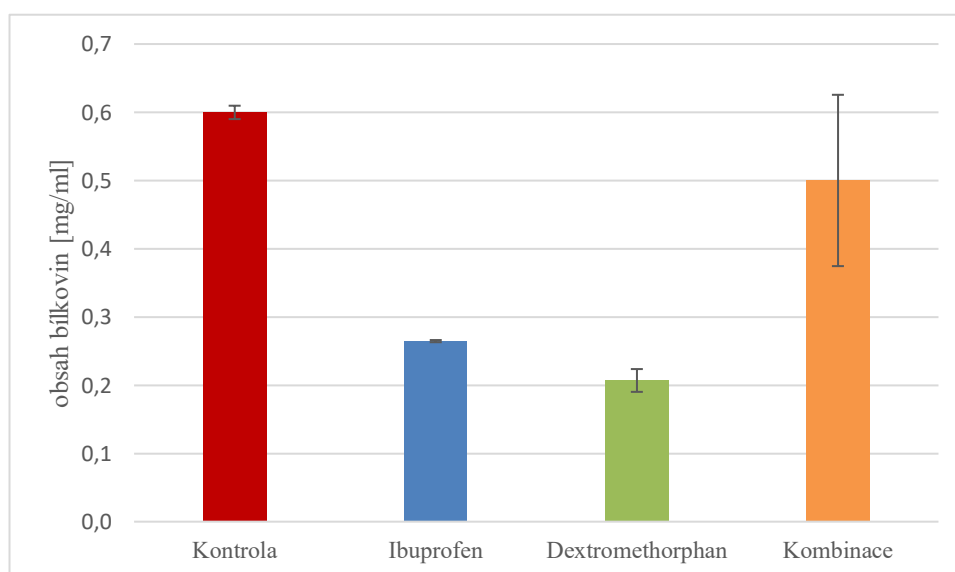
V extraktech listů a kořenů rostlin pěstovaných s léčivem bylo také stanoveno množství bílkovin metodou dle Bradforda popsanou výše (4.7.5). Graf 9 (str. 43) zobrazuje získané množství rozpustných bílkovin v extraktech listů. Největší obsah bílkovin byl detekován v listech rostlin s přidaným ibuprofenem do média. Nejnižší koncentrace bílkovin byla zjištěna v listech rostlin pěstovaných s dextromethorphanem. Stanovená koncentrace bílkovin byla v intervalu 0,24 – 0,53 mg/l.

Graf 9: Výsledky stanovení množství bílkovin v extraktech listů rostlin s přidáním léčivem do média a v extraktech kontrolních rostlin (bez přidání léčiva). Množství bílkovin je vztaženo na ml extraktu.



Výsledky stanovení množství bílkovin v extraktech kořenů představuje *Graf 10*. Obsah bílkovin byl zde v intervalu 0,2 – 0,6 mg/ml. Nejvyšší obsah bílkovin byl detekován v extraktech kořenů rostlin bez přidání léčiva do média a v kořenech, kde byl do média přidán ibuprofen s v kombinaci dextromethorphanem.

Graf 10: Výsledky stanovení obsahu bílkovin dle Bradforda v extraktech kořenů rostlin s přidáními léčiv do média a v kořenech kontrolních rostlin (bez přidání léčiva). Množství bílkovin je vztaženo na ml extraktu.

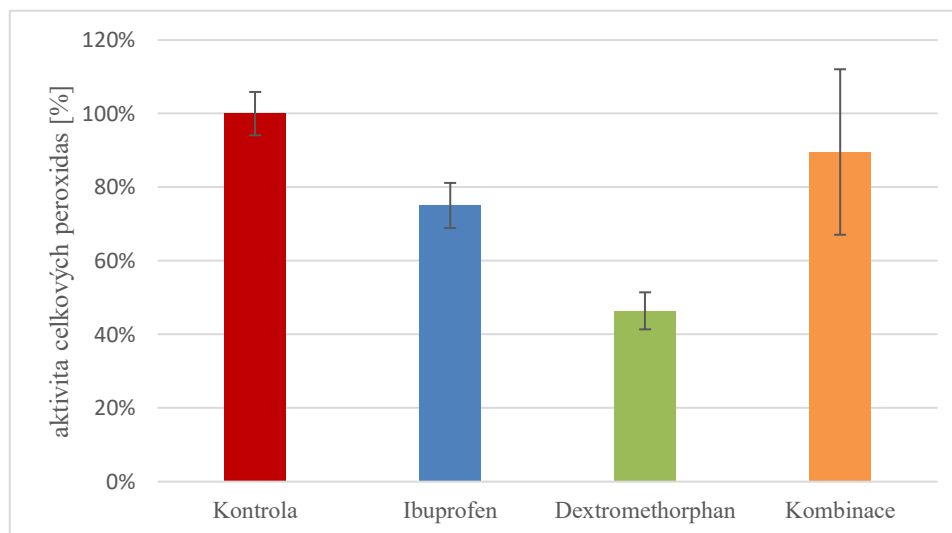


### 5.3.4 Výsledky spektroskopických stanovení

#### 5.3.4.1 Stanovení aktivity celkových volných a membránově vázaných peroxidas

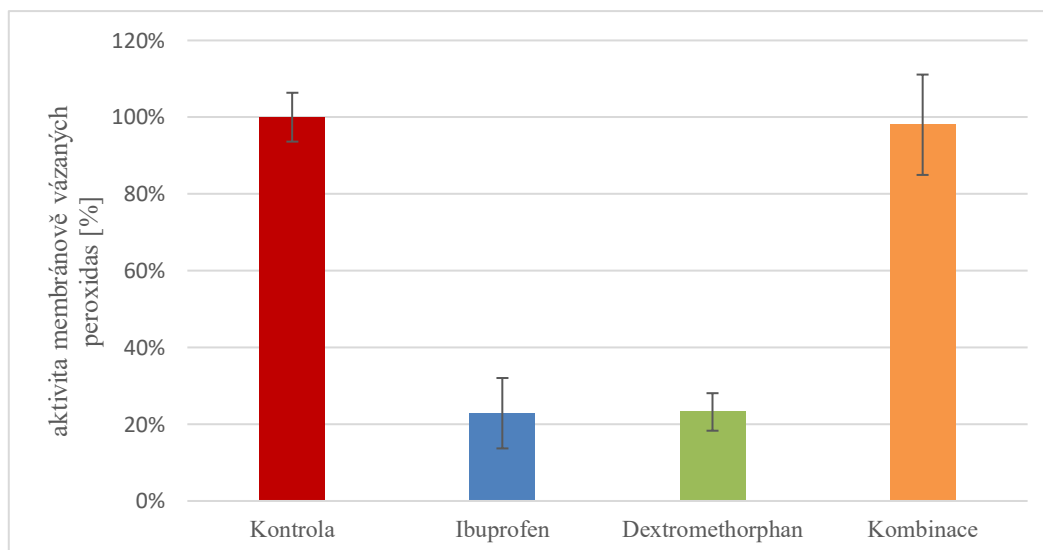
Stanovení aktivity celkových peroxidas a membránově vázaných peroxidas v listech rostlin s přidanými léčivy do média znázorňují *Graf 11* a *Graf 12*.

Graf 11: Výsledky stanovení celkových volných peroxidas v listech rostlin s přidanými léčivy do média a v kontrolních listech rostlin bez přidaného léčiva (Kontrola)



Aktivita celkových peroxidas v listech byla oproti kontrolní skupině, jejíž aktivita peroxidas byla zvolena jako 100 %, nejvyšší v listech rostlin s ibuprofenem v kombinaci s dextromethorphanem v médiu. Nejnižší procentuální zastoupení aktivity celkových peroxidas bylo detekováno v listech rostlin pěstovaných s dextromethorphanem.

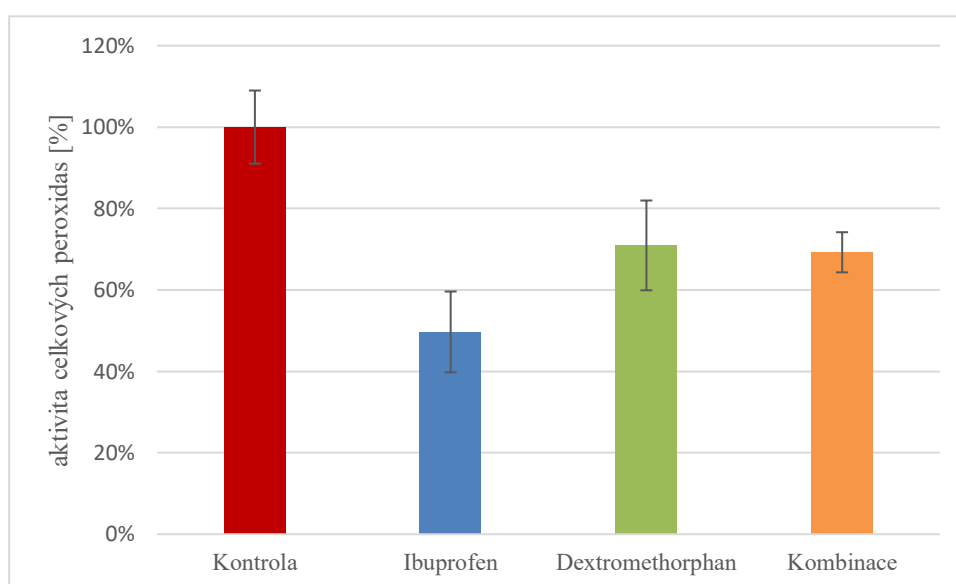
Graf 12: Výsledky stanovení membránově vázaných peroxidas v listech rostlin s přidanými léčivy do média a kontrolních listů rostlin bez přidaného léčiva do média (Kontrola)



*Graf 12* znázorňuje procentuální zastoupení aktivity membránově vázaných peroxidas v listech, kde byl oproti Kontrole (100 %) nejvyšší obsah stanoven v listech rostlin pěstovaných s oběma léčivy. Nejnižší aktivita membránově vázaných peroxidas byla detekována v listech rostlin pěstovaných pouze s ibuprofenem.

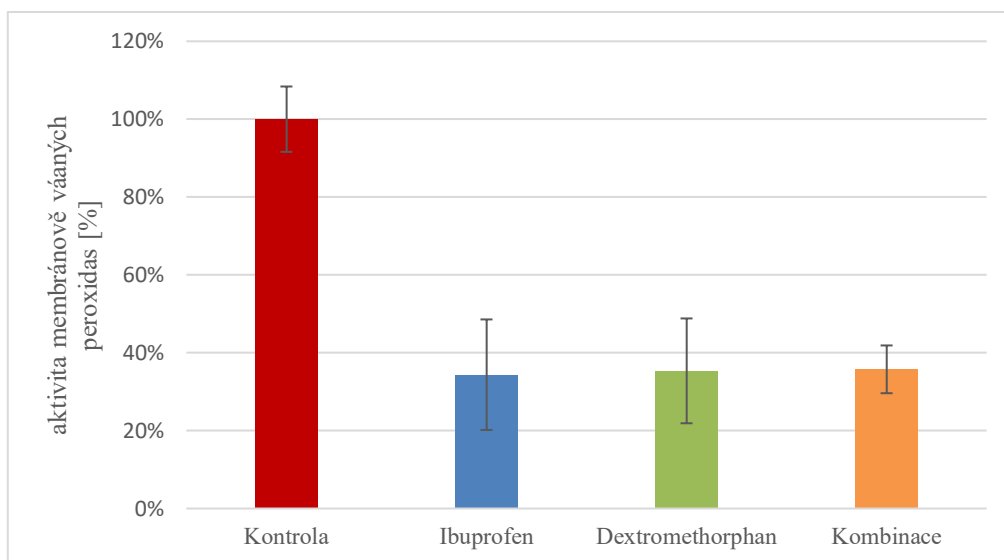
Stanovení aktivity celkových volných peroxidas v kořenech zobrazuje *Graf 13*. Oproti aktivitě celkových peroxidas v Kontrole (100 %) bylo největší procentuální zastoupení aktivity v kořenech rostlin s přidáním dextromethorphanem do média (86 %). Nejnižší aktivita byla v kořenech rostlin pěstovaných s ibuprofenem.

*Graf 13: Výsledky stanovení aktivity celkových volných peroxidas v kořenech rostlin pěstovaných s přidáním léčivy do média a bez přidání léčiva (Kontrola). Aktivita byla vztažena ke kontrolní skupině (100%).*



Procentuální zastoupení aktivity membránově vázaných peroxidas v kořenech (*Graf 14, str. 46*) bylo nejvyšší v kořenech rostlin pěstovaných v médiu obsahujícím obě léčiva (36 %), nejnižší obsah byl detekován v kořenech rostlin pěstovaných s přidáním ibuprofenem do média.

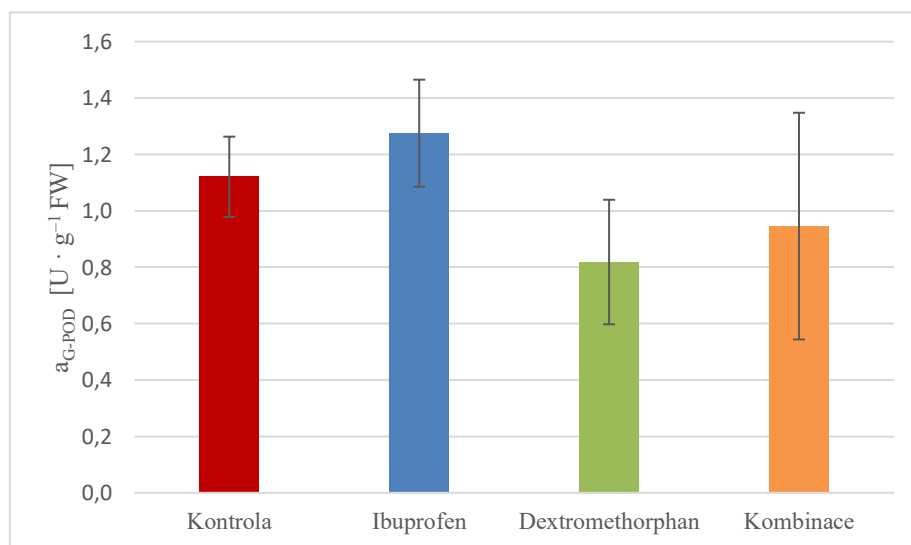
Graf 14: Výsledky stanovení membránově vázaných peroxidas v kořenech s přidávanými léčivými do média a v kořenech bez přidávaného léčiva (Kontrola). Aktivita byla vztažena ke kontrolní skupině (100%).



#### 5.3.4.2 Stanovení aktivity guajakolperoxidasy

V kořenech byla detekována aktivita guajakolperoxidasy (Graf 15) metodou popsanou v 4.7.7

Graf 15: Výsledky stanovení aktivity guajakolperoxidasy v extraktech kořenů s přidávanými léčivými a extraktu kořenu bez přidávaného léčiva (Kontrola). FW znamená čerstvá hmotnost.



Nejvyšší aktivita guajakol peroxidasy byla stanovena v kořenech rostlin obsahujícím ibuprofen v médiu a v kořenech kontrolních rostlin. Nejmenší aktivita byla detekována v kořenech rostlin pěstovaných s dextromethorphanem. Stanovená aktivita guajakolperoxidasy byla v intervalu 0,8 – 1,3 U na gram čerstvé hmotnosti kořenu. V extraktech listů nebyla aktivita guajakolperoxidasy detekována.

## 6. Diskuze

Po fytoextrakci za využití kukuřice seté (*Zea mays*) zůstal ve vodném roztoku média po 144 hodinách ibuprofen o průměrné koncentraci 0,24 mg/l v případě kultivace rostlin pouze s ibuprofenem a 0,52 mg/l u kultivace rostlin s ibuprofenem v kombinaci s dextromethorphanem. Pokles průměrné počáteční koncentrace byl po 144 hodinách u ibuprofenu o 88 %. U kultivace rostlin v přítomnosti dextromethorphanu byl rozdíl průměrné počáteční a průměrné finální koncentrace ibuprofenu 80 %. Účinnost fytoextrakce ibuprofenu byla 0,10 mg na gram čerstvé hmotnosti listu. Účinnost fytoextrakce ibuprofenu v přítomnosti dextromethorphanu byla 0,09 mg na gram čerstvé hmotnosti listu. Fytoextrakční účinnost byla tedy za přítomnosti dextromethorphanu snížena. V obou provedených kultivacích byla potvrzena účinná absorpce ibuprofenu rostlinami *Zea mays*.

V této práci byl stanoven obsah fenolických látek a antioxidační kapacita metodou FRAP v listech a kořenech rostlin kukuřice po provedené fytoextrakci. Nejvyšší obsah fenolických látek a stejně tak i největší antioxidační kapacitu vykazovaly listy a kořeny rostlin, které byly pěstovány v médiu s oběma léčivy. K objektivnějšímu stanovení antioxidační kapacity by bylo vhodné měřit antioxidační vlastnosti v extraktech listů a kořenů i jinými metodami založenými na dalších principech (zhášení radikálů, přenos protonu) jako je např. ABTS nebo DPPH. Nejvyšší obsah fenolických látek a antioxidační kapacita kořenů rostlin vystavených kombinaci léčiv v médiu naznačuje odpověď obranného a antioxidačního systému rostlin na přítomnost xenobiotika v médiu. Fenolické látky mohou být zapojovány do tvorby ligninu, a tedy zesílení buněčné stěny kořenů a snahy snížit příjem léčiva do rostlinného pletiva.

Také bylo stanoveno množství bílkovin metodou dle Bradforda. Největší množství bílkovin obsahoval extrakt listů rostlin pěstovaných s ibuprofenem a extrakt kořenů rostlin pěstovaných s kombinací léčiv.

Aktivita a izoenzymové složení celkových volných a membránově vázaných peroxidas byly stanoveny spektrofotometricky i po elektroforetické separaci za nativních podmínek. Aktivita celkových volných peroxidas byl nejvyšší v kořenech rostlin obsahujícím dextromethorphan v médiu a v kořenech rostlin pěstovaných s oběma léčivy. Stejně tak i aktivita volných peroxidas byla nejvyšší v kořenech rostlin pěstovaných s dextromethorphanem a jeho kombinací s ibuprofenem. Naopak v listech rostlin s dextromethorphanem v médiu byla aktivita celkových peroxidas nízká oproti kontrolní skupině, membránově vázané peroxidasy měly oproti kontrolní skupině větší aktivitu pouze v listech rostlin pěstovaných s ibuprofenem v kombinaci s dextromethorphanem. Obecně rostliny pěstované s léčivy samostatně

nevykazovaly velkou aktivitu peroxidas. V kořenech byla aktivita membránově vázaných peroxidas ve všech skupinách rostlin přibližně stejné hodnoty.

Efektivita fytoextrakce samotného ibuprofenu byla relativně vysoká. Tomu odpovídá i stanovení fenolických látek, antioxidační kapacity a aktivity peroxidas, které byly v případě samotného ibuprofenu (ale i dextromethorphanu) srovnatelné anebo nižší než v kontrolních rostlinách. Pravděpodobně tedy jednotlivá farmaka nepředstavují pro rostliny takovou stresovou zátěž jako jejich kombinace. V případě kombinace léčiv lze předpokládat jejich vzájemnou interakci a vznik nových "metabolitů", které mohou působit toxičtěji než původní látky.

V gelech po nativní elektroforéze byla detekována aktivita askorbátperoxidasy, přičemž bylo možno vidět několik izoform tohoto enzymu. Nejvíce izoform vykazovaly kořeny, nejvyšší pohyblivost jedné z těchto izoform byla detekována v kořenech rostlin pěstovaných s oběma léčivy. Askorbátperoxidasa je jeden z klíčových enzymů podílejících se na detoxifikaci reaktivních forem kyslíku, katalyzující přeměnu peroxidu vodíku na vodu. Vyšší počet izoform a aktivita v kořenech rostlin pěstovaných s kombinací léčiv opět naznačuje vyšší stresovou zátěž těchto rostlin.

Aktivita superoxiddismutasy byla pod limitem detekce. Dále byla stanovena aktivita šikimatdehydrogenasy v listech, přičemž nejvyšší aktivita byla detekována v listech rostlin pěstovaných s přidaným ibuprofenem. Při stanovení šikimatdehydrogenasy bylo možno pozorovat prázdná místa v gelu značící aktivitu jiného enzymu. K určení, o přesně jaký enzym se jedná, by bylo zapotřebí využít dalších detekčních metod. V kořenech byla aktivita šikimatdehydrogenasy pod limitem detekce dané metody.

Nejvyšší aktivitu guajakolperoxidasy vykazovaly kořeny rostlin s přidaným ibuprofenem v médiu, nejmenší pak extrakt s dextromethorphanem. V porovnání s obsahem fenolických látek (jako substrátů daného enzymu) bylo pořadí odlišné, resp. nejvyšší zastoupení fenolických látek obsahovaly kořeny rostlin pěstované s oběma léčivy, nejmenší pak skupina s ibuprofenem, což může značit jejich využití jako donorů elektronů k eliminaci peroxidu vodíku.

Aktivitu guajakolperoxidasy nebylo možné detekovat danou metodou v extraktech listů, hodnoty byly pod limitem detekce.

Pro přesnější stanovení účinnosti fytoextrakce, aktivity enzymů a k určení, které ze dvou léčiv vyvolává v případě kombinace vyšší antioxidační odpověď, by bylo zapotřebí určit i množství dextromethorphanu extrahovaného rostlinou za využití metody HPLC s UV detekcí.

## 7. Závěr

- Byla zpracována rešerše shrnující témata fytoextrakce, znečištění životního prostředí farmaceutiky, nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAIDs), antitusika a antioxidační systém rostlin.
- Byla provedena fytoextrakce ibuprofenu pro kultivaci ibuprofenu samotného a pro kultivaci ibuprofenu s dextromethorphanem v kombinaci. Účinnosti fytoextrakce pro jednotlivé kultivace byly porovnány, fytoextrakční účinnost byla snížena za přítomnosti dextromethorphanu.
- V extraktech listů a kořenů s léčivou po provedené fytoextrakci byla stanovena antioxidační kapacita metodou FRAP a obsah fenolických látek, přičemž nejvyšších hodnot vždy dosáhly extrakty obsahující obě léčiva.
- Bylo stanoveno množství bílkovin metodou dle Bradforda. Nejvíce bílkovin obsahoval extrakt listů rostlin pěstovaných s přidaným ibuprofenem v médiu a extrakt kořenů rostlin s ibuprofenem v kombinaci s dextromethorphanem v médiu.
- Byla provedena nativní elektroforéza a následná detekce aktivity askorbátperoxidasy, peroxidasy a šikimátdehydrogenasy v gelech. Aktivita superoxiddismutasy byla pod limitem detekce.
- Spektroskopicky byla detekována aktivita guajakolperoxidasy a procentuální zastoupení celkových i membránově vázaných peroxidas. Aktivita guajakolperoxidasy byla porovnána s obsahem fenolických látek, aktivita peroxidasy byla porovnána s jejich aktivitou a izoenzymovým složením detekovaným v gelech po elektroforetické separaci za nativních podmínek.

## **8. Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli panu doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc. za vedení mé bakalářské práce a odbornou pomoc. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Kateřině Bělonožníkové, Ph.D. za pomoc a rady jak při laboratorních experimentech, tak i při psaní práce.

## 9. Literatura

- [1] S. Susarla, V.F. Medina, S.C. Mccutcheon, Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination, 2002. [www.elsevier.com/locate/ecoleng](http://www.elsevier.com/locate/ecoleng).
- [2] L. Cizmas, V.K. Sharma, C.M. Gray, T.J. McDonald, Pharmaceuticals and personal care products in waters: occurrence, toxicity, and risk, *Environ Chem Lett.* 13 (2015) 381–394. <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0524-4>.
- [3] R. van Rensburg, H. Reuter, An overview of analgesics: Nsaids, paracetamol, and topical analgesics part 1, *South African Family Practice.* 61 (2019) S4–S10. <https://doi.org/10.1080/20786190.2019.1610228>.
- [4] M. Parolini, A. Binelli, A. Provini, Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*, *Ecotoxicol Environ Saf.* 74 (2011) 1586–1594. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2011.04.025>.
- [5] A.R. Silva, R.J. Dinis-Oliveira, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dextromethorphan: clinical and forensic aspects, *Drug Metab Rev.* 52 (2020) 258–282. <https://doi.org/10.1080/03602532.2020.1758712>.
- [6] J. Banken, H.R. Foster, Dextromethorphan : An Emerging Drug of Abuse, Undefined. (2008).
- [7] J. Kumirska, Special issue “Pharmaceutical residues in the environment,” *Molecules.* 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25122941>.
- [8] H. Ali, E. Khan, M.A. Sajad, Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications, *Chemosphere.* 91 (2013) 869–881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>.
- [9] P. Soudek, Š. Petrová, D. Benešová, J. Kotyza, T. Vaněk, FYTOREMEDIACE A MOŽNOSTI ZVÝŠENÍ JEJICH ÚČINNOSTI, 2008.
- [10] Phytoremediation of Contaminated Soil and Ground Water at Hazardous Waste Sites - Bruce E. Pivetz - Knihy Google, (n.d.). [https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=fXSugnKAha0C&oi=fnd&pg=PA3&ots=bgJTnzde9m&sig=ZY6U3gD69JwY4BSIDPJior3fJvE&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=fXSugnKAha0C&oi=fnd&pg=PA3&ots=bgJTnzde9m&sig=ZY6U3gD69JwY4BSIDPJior3fJvE&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false) (accessed August 22, 2022).
- [11] P. Ahmad, C.A. Jaleel, M.A. Salem, G. Nabi, S. Sharma, Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress, *Crit Rev Biotechnol.* 30 (2010) 161–175. <https://doi.org/10.3109/07388550903524243>.
- [12] I. Leitão, M.P. Mourato, L. Carvalho, M.C. Oliveira, M.M. Marques, L.L. Martins, Antioxidative response of lettuce (*Lactuca sativa*) to carbamazepine-induced stress, *Environmental Science and Pollution Research.* 28 (2021) 45920–45932. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13979-3>.
- [13] Y. Li, J. Zhang, G. Zhu, Y. Liu, B. Wu, W.J. Ng, A. Appan, S.K. Tan, Phytoextraction, phytotransformation and rhizodegradation of ibuprofen associated with *Typha angustifolia* in a horizontal subsurface flow constructed wetland, *Water Res.* 102 (2016) 294–304. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.06.049>.
- [14] A. Pereira, L. Silva, C. Laranjeiro, C. Lino, A. Pena, Selected pharmaceuticals in different aquatic compartments: Part II-Toxicity and environmental risk assessment, *Molecules.* 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25081796>.
- [15] D.J. Caldwell, F. Mastrocco, L. Margiotta-Casaluci, B.W. Brooks, An integrated approach for prioritizing pharmaceuticals found in the environment for risk assessment, monitoring and advanced research, *Chemosphere.* 115 (2014) 4–12. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2014.01.021>.

- [16] W.C. Li, Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil, *Environmental Pollution*. 187 (2014) 193–201. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2014.01.015>.
- [17] B. Petrie, R. Barden, B. Kasprzyk-Hordern, A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring, *Water Res.* 72 (2015) 3–27. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2014.08.053>.
- [18] S. Chopra, D. Kumar, Ibuprofen as an emerging organic contaminant in environment, distribution and remediation, *Heliyon*. 6 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04087>.
- [19] M. Parolini, A. Binelli, A. Provini, Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*, *Ecotoxicol Environ Saf.* 74 (2011) 1586–1594. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2011.04.025>.
- [20] A. Marchlewicz, U. Guzik, K. Hupert-Kocurek, A. Nowak, S. Wilczyńska, D. Wojcieszewska, Toxicity and biodegradation of ibuprofen by *Bacillus thuringiensis* B1(2015b), *Environmental Science and Pollution Research*. 24 (2017) 7572–7584. <https://doi.org/10.1007/S11356-017-8372-3/TABLES/5>.
- [21] G. Rácz, Z. Csenki, R. Kovács, Á. Hegyi, F. Baska, L. Sujbert, I. Zsákovics, R. Kis, R. Gustafson, B. Urbányi, B. Szende, Subacute toxicity assessment of water disinfection byproducts on zebrafish, *Pathol Oncol Res.* 18 (2012) 579–584. <https://doi.org/10.1007/S12253-011-9479-3>.
- [22] C.G. Daughton, T.A. Ternes, Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change?, *Environ Health Perspect.* 107 (1999) 907–938. <https://doi.org/10.1289/EHP.99107S6907>.
- [23] N.B. Mohd Zanuri, M.G. Bentley, G.S. Caldwell, Assessing the impact of diclofenac, ibuprofen and sildenafil citrate (Viagra®) on the fertilisation biology of broadcast spawning marine invertebrates, *Mar Environ Res.* 127 (2017) 126–136. <https://doi.org/10.1016/J.MARENRES.2017.04.005>.
- [24] M. Gonzalez-Rey, M.J. Bebianno, Does non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) ibuprofen induce antioxidant stress and endocrine disruption in mussel *Mytilus galloprovincialis*?, *Environ Toxicol Pharmacol.* 33 (2012) 361–371. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2011.12.017>.
- [25] K.M. Jeffries, S.M. Brander, M.T. Britton, N.A. Fangué, R.E. Connon, Chronic exposures to low and high concentrations of ibuprofen elicit different gene response patterns in a euryhaline fish, *Environmental Science and Pollution Research*. 22 (2015) 17397–17413. <https://doi.org/10.1007/S11356-015-4227-Y/FIGURES/5>.
- [26] A. Kafle, A. Timilsina, A. Gautam, K. Adhikari, A. Bhattarai, N. Aryal, Phytoremediation: Mechanisms, plant selection and enhancement by natural and synthetic agents, *Environmental Advances*. 8 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100203>.
- [27] R.N. DuBois, S.B. Abramson, L. Crofford, R.A. Gupta, L.S. Simon, L.B.A. van de Putte, P.E. Lipsky, Cyclooxygenase in biology and disease, *The FASEB Journal*. 12 (1998) 1063–1073. <https://doi.org/10.1096/FASEBJ.12.12.1063>.
- [28] F. Camu, C. Vanlersberghe, Pharmacology of systemic analgesics, *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 16 (2002) 475–488. <https://doi.org/10.1053/bean.2002.0262>.
- [29] E.M. Laska, A. Sunshine, I. Marrero, N. Olson, C. Siegel, N. McCormick, The correlation between blood levels of ibuprofen and clinical analgesic response, *Clin Pharmacol Ther.* 40 (1986) 1–7. <https://doi.org/10.1038/CLPT.1986.129>.
- [30] A. Gupta, M. Bah, NSAIDs in the Treatment of Postoperative Pain, *Curr Pain Headache Rep.* 20 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11916-016-0591-7>.

- [31] M.K. Stasiowska, S.C. Ng, A.N. Gubbay, R. Clegg, Postoperative pain management, [Http://Dx.Doi.Org/10.12968/Hmed.2015.76.10.570](http://dx.doi.org/10.12968/Hmed.2015.76.10.570). 76 (2015) 570–575. <https://doi.org/10.12968/HMED.2015.76.10.570>.
- [32] S.R. Southworth, E.J. Woodward, A. Peng, A.D. Rock, An integrated safety analysis of intravenous ibuprofen (Caldolor<sup>&reg;</sup>) in adults, *J Pain Res.* 8 (2015) 753–765. <https://doi.org/10.2147/JPR.S93547>.
- [33] K.D. Rainsford, Ibuprofen: Pharmacology, efficacy and safety, *Inflammopharmacology.* 17 (2009) 275–342. <https://doi.org/10.1007/s10787-009-0016-x>.
- [34] G.G. Graham, K.M. Williams, Metabolism and pharmacokinetics of ibuprofen, *Aspirin and Related Drugs.* (2016) 157–180. <https://doi.org/10.1201/9780203646960.CH5>.
- [35] D.R. Brocks, F. Jamali, The Pharmacokinetics of Ibuprofen in Humans and Animals, *Ibuprofen.* (1999) 87–142. <https://doi.org/10.4324/9781482295382-4>.
- [36] K.D. Rainsford, Ibuprofen: Pharmacology, Therapeutics and Side Effects, *Ibuprofen: Pharmacology, Therapeutics and Side Effects.* (2012). <https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0496-7>.
- [37] H. Vanegas, H.G. Schaible, Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord, *Prog Neurobiol.* 64 (2001) 327–363. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00063-0](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00063-0).
- [38] H.J. Gould, J.D. England, R.D. Soignier, P. Nolan, L.D. Minor, Z.P. Liu, S.R. Levinson, D. Paul, Ibuprofen blocks changes in nav 1.7 and 1.8 sodium channels associated with complete freund’s adjuvant-induced inflammation in rat, *Journal of Pain.* 5 (2004) 270–280. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2004.04.005>.
- [39] G.V. Joseph, V.P. Pascal, D.A. Paladini, G. Varrassi, J. v Pergolizzi, P. Dowling, A. Paladini, Ibuprofen Safety at the Golden Anniversary: Are all NSAIDs the Same? A Narrative Review, (n.d.). <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.10075727>.
- [40] P. v. Dicipinigaitis, A.H. Morice, S.S. Birring, L. McGarvey, J.A. Smith, B.J. Canning, C.P. Page, Antitussive drugs-past, present, and future, *Pharmacol Rev.* 66 (2014) 468–512. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005116>.
- [41] S.M. Reynolds, A.J. Mackenzie, D. Spina, C.P. Page, The pharmacology of cough, *Trends Pharmacol Sci.* 25 (2004) 569–576. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2004.09.009>.
- [42] C.P. Taylor, S.F. Traynelis, J. Siffert, L.E. Pope, R.R. Matsumoto, Pharmacology of dextromethorphan: Relevance to dextromethorphan/quinidine (Nuedexta<sup>®</sup>) clinical use, *Pharmacol Ther.* 164 (2016) 170–182. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.04.010>.
- [43] N. Nagai, T. Kawakubo’, F. Kanekoi, M. Ishii, R. Shinohara, Y. Saito, H. Shimamura’, A. Ohnishi, H. Ogata, PHARMACOKINETICS AND POLYMORPHIC OXIDATION OF DEXTROMETHORPHAN IN A JAPANESE POPULATION, *BIOPHARMACEUTICS 19 DRUG DISPOSITION.* 17 (1996) 421–433. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-081X\(199607\)17:5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-081X(199607)17:5).
- [44] B. Pourrut, M. Shahid, C. Dumat, P. Winterton, E. Pinelli, Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants, *Rev Environ Contam Toxicol.* 213 (2011) 113–136. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9860-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9860-6_4).
- [45] R. Gorovits, I. Sobol, K. Akama, B. Chefetz, H. Czosnek, Pharmaceuticals in treated wastewater induce a stress response in tomato plants, *Sci Rep.* 10 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58776-z>.
- [46] N.A. Anjum, P. Sharma, S.S. Gill, M. Hasanuzzaman, E.A. Khan, K. Kachhap, A.A. Mohamed, P. Thangavel, G.D. Devi, P. Vasudhevan, A. Sofu, N.A. Khan, A.N. Misra, A.S. Lukatkin, H.P. Singh, E. Pereira, N. Tuteja, Catalase and ascorbate peroxidase—representative H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-detoxifying heme enzymes in plants, *Environmental Science and*

- Pollution Research. 23 (2016) 19002–19029. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7309-6>.
- [47] L. Ghamsari, E. Keyhani, S. Golkhoo, Kinetics Properties of Guaiacol Peroxidase Activity in *Crocus sativus* L. Corm during Rooting, \*Corresponding Author, 2007. <http://IBJ.pasteur.ac.ir>.
- [48] D.P. Dixon, L. Cummins, D.J. Cole, R. Edwards, Glutathione-mediated detoxification systems in plants, *Curr Opin Plant Biol.* 1 (1998) 258–266. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(98\)80114-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(98)80114-3).
- [49] H. Schroeter, C. Boyd, J.P.E. Spencer, R.J. Williams, E. Cadenas, C. Rice-Evans, MAPK signaling in neurodegeneration: Influences of flavonoids and of nitric oxide, *Neurobiol Aging.* 23 (2002) 861–880. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00075-1](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00075-1).
- [50] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends Plant Sci.* 2 (1997) 152–159. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2).
- [51] L. Ding, D. Hofius, M.R. Hajirezaei, A.R. Fernie, F. Börnke, U. Sonnewald, Functional analysis of the essential bifunctional tobacco enzyme 3-dehydroquinase dehydratase/shikimate dehydrogenase in transgenic tobacco plants, *J Exp Bot.* 58 (2007) 2053–2067. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm059>.
- [52] J. Peek, D. Christendat, The shikimate dehydrogenase family: Functional diversity within a conserved structural and mechanistic framework, *Arch Biochem Biophys.* 566 (2015) 85–99. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.006>.
- [53] N. Sharma, R. Singh, R. Pandey, In vitro propagation and conservation of *Bacopa monnieri* L., *Methods in Molecular Biology.* 1391 (2016) 153–171. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3332-7\\_11/COVER](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3332-7_11/COVER).
- [54] M. Tupec, V. Hýšková, K. Bělonožníková, J. Hraníček, V. Červený, H. Ryšlavá, Characterization of some potential medicinal plants from Central Europe by their antioxidant capacity and the presence of metal elements, *Food Biosci.* 20 (2017) 43–50. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2017.08.001>.
- [55] B. MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.* 72 (1976) 248–254. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1976.9999>.
- [56] P. Spoustová, V. Hýšková, K. Müller, R. Schnablová, H. Ryšlavá, N. Čerovská, J. Malbeck, M. Cvikrová, H. Synková, Tobacco susceptibility to Potato virus Y (NTN) infection is affected by grafting and endogenous cytokinin content, *Plant Sci.* 235 (2015) 25–36. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2015.02.017>.
- [57] R. Mittler, B.A. Zilinskas, Detection of Ascorbate Peroxidase Activity in Native Gels by Inhibition of the Ascorbate-Dependent Reduction of Nitroblue Tetrazolium, *Anal Biochem.* 212 (1993) 540–546. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1993.1366>.
- [58] J. Diaz, F. Merino Diaz, J. Merino, Shikimate dehydrogenase from pepper (*Capsicum annum*) seedlings. Purification and properties, *Physiol Plant.* 100 (1997) 147–152. <https://doi.org/10.1111/J.1399-3054.1997.TB03465.X>.
- [59] A.B.A. Boxall, The environmental side effects of medication, *EMBO Rep.* 5 (2004) 1110. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOR.7400307>.
- [60] M. Magureanu, N.B. Mandache, V.I. Parvulescu, Degradation of pharmaceutical compounds in water by non-thermal plasma treatment, *Water Res.* 81 (2015) 124–136. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2015.05.037>.
- [61] G.G. Graham, M.S. Roberts, R.O. Day, K.D. Rainsford, Pharmacokinetics and metabolism of the salicylates, *Aspirin and Related Drugs.* (2016) 97–155. <https://doi.org/10.1201/9780203646960-8>.

- [62] T.R. Tavanti, A.A.R. de Melo, L.D.K. Moreira, D.E.J. Sanchez, R. dos S. Silva, R.M. da Silva, A.R. dos Reis, Micronutrient fertilization enhances ROS scavenging system for alleviation of abiotic stresses in plants, *Plant Physiology and Biochemistry*. 160 (2021) 386–396. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.01.040>.