

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

Studijní program: Chemie  
Studijní obor: Medicinální chemie



Anna Schmidová

Záchyt a translokace buspironu v kulturách vyšších rostlin  
Uptake and translocation of buspirone in higher plant cultures

Bakalářská práce

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

Praha, 2022

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala 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.

V Praze dne

Podpis

## Abstrakt

Tato bakalářská práce se věnuje fytoextrakci anxiolytika buspironu z živného média a dále studiu vlivu tohoto abiotického stresu na rostlinný metabolismus. Byly provedeny dva experimenty s kukuřicí setou (*Zea mays*), která byla hydroponicky kultivována ve sterilním médiu po dobu 10 a 14 dní. Po přidání roztoku média s obsahem buspironu o koncentracích 10 a 5 mg · L<sup>-1</sup> byly odebírány vzorky média v jednodenních intervalech ze všech experimentálních rostlin. Následně byla v médiu sledována klesající koncentrace buspironu pomocí metody HPLC/UV s reverzní fází při vlnové délce 240 nm.

Při prvním experimentu s počáteční koncentrací buspironu v roztoku média 10 mg · L<sup>-1</sup> byl zjištěn jeho úbytek o 65 % za 96 hodin, během kterých fytoextrakce probíhala. Celkový pokles koncentrace buspironu pro druhý experiment, kdy jeho počáteční koncentrace v roztoku média činila 5 mg · L<sup>-1</sup> byl za 144 hodin fytoextrakce 53 %.

Po ukončení fytoextrakčních experimentů byla v listech a kořenech rostlin stanovena aktivita celkových volných peroxidas, membránově vázaných peroxidas, guajakol-peroxidasy a ABTS-peroxidasy. Dále bylo provedeno stanovení obsahu fenolických látek, které se řadí do skupiny tzv. sekundárních metabolitů a jejichž účinky souvisí s antioxidačním systémem rostlin. V gelech po nativní elektroforetické separaci byly detekovány aktivity a izoenzymové složení peroxidas a šikimátdehydrogenasy. Všechny stanovené hodnoty byly porovnány s kontrolními rostlinami pěstovanými bez přítomnosti buspironu v médiu.

Klíčová slova: buspiron, fytoremediace, vyšší rostliny, fytoextrakce, rostlinné enzymy

# Abstract

This bachelor thesis is devoted to the phytoextraction of the anxiolytic buspirone from a cultivation medium and to the study of the effect of plant stress on the plant metabolism. Two experiments were carried out with maize (*Zea mays*) grown hydroponically in a sterile medium for 10 and 14 days. After the addition of a solution of medium containing buspirone at concentrations of 10 and 5 mg · L<sup>-1</sup>, samples of medium were collected at 1-day intervals from all experimental plants. The decreasing concentration of buspirone in the medium was monitored by reversed phase HPLC/UV at a wavelength of 240 nm.

In the first experiment with 10 mg · L<sup>-1</sup> as the initial concentration of buspirone in the medium, a 65 % decrease was observed over the 96 hours during which the phytoextraction was carried out. The overall decrease in buspirone concentration was 53 % in 144 hours of phytoextraction in the second experiment with an initial concentration of 5 mg · L<sup>-1</sup> in the medium.

After the completion of the phytoextraction experiments, the activities of total peroxidases, membrane-bound peroxidases, guaiacol peroxidase and ABTS-peroxidase were determined in the leaves and roots of the plants. Furthermore, the content of phenolic substances, which belong to the group of so-called secondary metabolites and their effects are related to the antioxidant system of plants, was determined. Peroxidase and shikimate dehydrogenase activities and isoforms were detected in gels after native electrophoretic separation. All measured values were compared with control plants grown without buspirone in the medium.

Key words: buspirone, phytoremediation, higher plants, phytoextraction, plant enzymes

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat především svému školiteli doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc. za jeho odborné vedení a cenné rady v průběhu práce a RNDr. Kateřině Bělonožníkové, Ph.D. za možnost pracovat pod jejím dohledem v laboratoři rostlinné biochemie.

Dále bych ráda poděkovala své rodině za její podporu, pomoc a poskytnutí zázemí po celou dobu mého studia.

# Obsah

Abstrakt .....	3
Abstract .....	4
Poděkování .....	5
Obsah.....	6
Použité zkratky .....	8
1. Úvod.....	9
2. Cíle práce .....	11
3. Teoretická část .....	12
3.1. Anxiolytika .....	12
3.1.1. Benzodiazepinová anxiolytika .....	12
3.1.2. Nebenzodiazepinová anxiolytika .....	12
3.2. Fytoremediace .....	14
3.2.1. Fytoextrakce .....	16
3.2.2. Fytotransformace.....	16
3.2.3. Fytostabilizace.....	17
3.2.4. Fytodegradace a rhizodegradace .....	17
3.2.5. Rhizofiltrace .....	17
3.2.6. Fytovolatilizace .....	17
3.2.7. Výhody a nevýhody fytoremediace.....	18
3.3. Osud farmak v čistírně odpadních vod .....	18
3.4. Antioxidační systém rostlin .....	18
4. Experimentální část.....	20
4.1. Přístrojové vybavení .....	20
4.2. Chemikálie.....	20
4.3. Rostlinný materiál.....	22
4.4. Pracovní postup .....	22
4.4.1. Sadba a kultivace sterilních rostlin.....	22
4.4.2. Přidání kontaminantu k rostlinám a odběr vzorků .....	23
4.4.3. Analýza vzorků pomocí HPLC .....	24
4.5. Příprava rostlinných extraktů pro stanovení enzymových aktivit .....	24
4.6. Stanovení množství proteinů dle Bradforda .....	24
4.7. Stanovení aktivity peroxidas .....	24

4.7.1.	Aktivita celkových volných peroxidas .....	25
4.7.2.	Aktivita membránově vázaných peroxidas .....	25
4.7.3.	Stanovení aktivity guajakol-peroxidasy .....	25
4.7.4.	Stanovení aktivity ABTS-peroxidasy.....	25
4.8.	Stanovení fenolických látek.....	25
4.9.	Nativní elektroforéza .....	26
4.9.1.	Příprava gelů pro elektroforézu.....	26
4.9.2.	Příprava rostlinných extraktů a průběh elektroforézy .....	26
4.9.3.	Detekce aktivity peroxidas v gelu .....	27
4.9.4.	Detekce aktivity šikimátdehydrogenasy v gelu.....	27
5.	Výsledky a diskuse .....	28
5.1.	Kalibrace HPLC .....	28
5.2.	Účinnost fytoextrakčních experimentů.....	29
5.2.1.	První experiment .....	29
5.2.2.	Druhý experiment.....	30
5.2.3.	Porovnání experimentů .....	32
5.3.	Analýza metabolismu rostlin .....	33
5.3.1.	Stanovení koncentrace proteinů .....	33
5.3.2.	Aktivita celkových volných peroxidas a membránově vázaných peroxidas.....	34
5.3.3.	Stanovení aktivity guajakol-peroxidasy a ABTS-peroxidasy .....	35
5.3.4.	Stanovení fenolických látek .....	37
5.3.5.	Detekce aktivity peroxidas po elektroforetické separaci.....	38
5.3.6.	Detekce aktivity šikimátdehydrogenasy po elektroforetické separaci .....	39
6.	Závěr .....	41
7.	Literatura.....	42

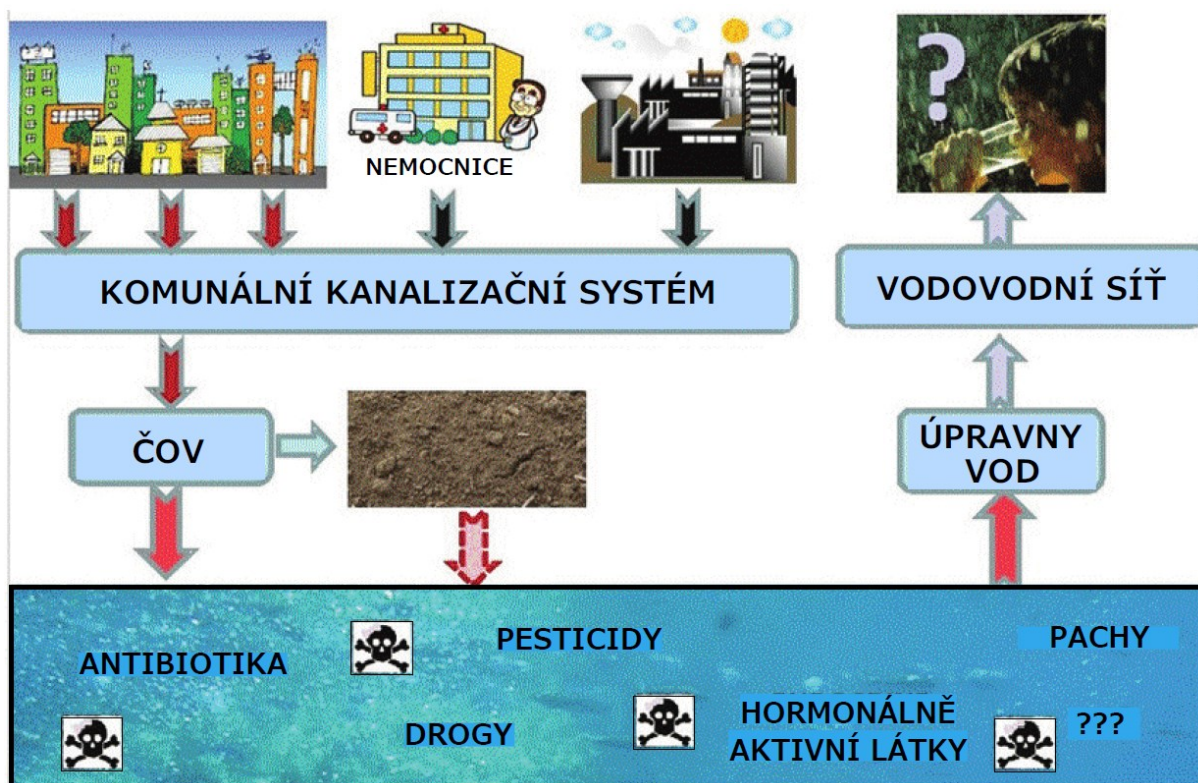
## Použité zkratky

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)
ATC	Anatomicko-terapeuticko-chemický systém klasifikace
AUFS	Celkový rozsah měřitelných absorbancí (z angl. absorbance unit full scale)
BSA	Hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)
ČOV	Čistírna odpadních vod
ČR	Česká republika
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DTT	Dithiothreitol
Na <sub>2</sub> EDTA	Ethylendiamintetraoctan disodný
EC	Číslo enzymové klasifikace (z angl. enzyme commission number)
FW	Čerstvá hmotnost (z angl. fresh weight)
GABA	Kyselina $\gamma$ -aminomáselná
GAD	Generalizovaná úzkostná porucha (z angl. generalized anxiety disorder)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)
LOD	Mez detekce (z angl. limit of detection)
LOQ	Mez stanovitelnosti (z angl. limit of quantification)
NADP	Nikotinamidadeninukleotidfosfát
MNA	Přirozená atenuace (z angl. monitored natural attenuation)
MS médium	Médium podle Murashiga a Skooga
PPCPs	Farmaka a produkty osobní péče (z angl. pharmaceuticals and personal care products)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
ROS	Reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)
SSRI	Selective serotonin reuptake inhibitors (selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu)
SNRI	Serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors (inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
UV	Ultrafialové záření (z angl. ultraviolet)



# 1. Úvod

Dnešní doba spojená s rychlým rozvojem medicíny s sebou přináší řadu výhod, ale i nevýhod co se týče používání jak léčiv, tak i jiných, přírodě cizích látek. Kvůli nebezpečí, které tyto látky a jejich metabolity způsobují tím, že vstupují do ekosystému, začal rozsáhlý vývoj a testování různých technologií vedoucí k dekontaminaci vody a půdy [1]. Biologicky aktivní substance se do přírody mohou dostávat z odpadních vod, jak z lidské moči, ale také například nesprávnou likvidací zbylých léčiv v domácnostech nebo používáním zvířecích exkrementů k hnojení půdy. Tyto skutečnosti negativně působí na povrchové vody, které nejsou ani po průchodu ČOV dostatečně vyčištěny a stávají se z nich povrchové vody, které jsou kontaminovány různými xenobiotiky. I když jsou většinou koncentrace různých léčiv ve vodě velmi nízké a nevykazují tak zvýšené zdravotní riziko pro člověka, mohou být nebezpečné pro vodní i suchozemské organismy [2]. Na obrázku č. 1 je schematicky znázorněn koloběh kontaminantů a možné hrozby v městském vodním cyklu.



Obrázek č. 1: Hrozby pro udržitelnost městského vodního cyklu v důsledku nárůstu zátěže xenobiotiky, přeloženo do češtiny [3].

Buspiron patří do farmakoterapeutické skupiny anxiolytik. Používá se ke krátkodobé léčbě úzkostných poruch, obzvláště ke generalizované úzkostné poruše (GAD) anebo jako

adjuvantní terapie depresivních poruch. Bylo prokázáno vyloučení 29 až 63 % dávky buspironu v moči a 18 až 38 % dávky ve stolici do 1 dne ve formě metabolitů. Pokus byl proveden značeným  $^{14}\text{C}$  s jednorázovou dávkou buspironu [4]. Tento fakt dokazuje, že také buspiron anebo jeho metabolity se dostávají močí a stolicí do odpadních vod. Součástí této bakalářské práce je několik experimentů zkoumající míru fytoextrakce buspironu pomocí kukuřice seté (*Zea mays*) jako model dekontaminace buspironu z povrchových vod a půdních lokalit. Fytoextrakce je jednou fytořediačních technik a představuje ekologicky a finančně nejvhodnější možnost dekontaminace polutantů z půd a vody [5].

## 2. Cíle práce

Jako cíle práce byly vytyčeny následující body:

- Hlavním cílem bakalářské práce je zhodnocení fytoextrakce anxiolytika buspironu a porovnání případně změny rychlosti fytoextrakce v závislosti na jeho koncentraci. Jako modelová rostlina byla vybrána kukuřice setá (*Zea Mays*).
- Dalším cílem bylo sledovat vliv buspironu na metabolismus rostlin pomocí stanovení aktivity a izoenzymového zastoupení peroxidasy a šikimátdehydrogenasy a dále obsahu fenolických látek v listech a kořenech.

## 3. Teoretická část

### 3.1. Anxiolytika

Anxiolytika představují skupinu farmak definované schopností potlačovat patologickou úzkost, obavy, strach a psychické napětí. Tato skupina léčiv zahrnuje řadu látek, které se liší mechanismem účinku a místem působení, především na GABAergní receptorový systém (benzodiazepiny), serotoninergní systém (SSRI, SNRI, buspiron) a na glutamatergní systém (pregabalin, gabapentin). Nejčastěji používanými léčivy jsou látky ze skupiny serotoninergních farmak a benzodiazepinů [6].

Terapeuticky se pro léčbu úzkosti používají i jiná léčiva s anxiolytickými a sedativními účinky. Můžeme sem zařadit např. hypnotika, antidepressiva, některá antipsychotika, antihistaminika, betablokátory, celková anestetika, svalová relaxancia či herbální léčiva [6].

Podle ATC klasifikace léčiv patří anxiolytika mezi psycholeptika, které se za rok 2019 umístily na 7. místě v ČR s necelými 10 miliony dodávek balení. V porovnání s rokem 2011, kdy dodávky činily přibližně 11 milionů balení, distribuce psycholeptik klesla o 4 %, nicméně i přes to je zjevné, že psycholeptika jsou vysoce využívaná léčiva. Finančně tato skupina dokonce předčila analgetika, které byly na počet distribuovaných balení na 1. místě [7, 8].

#### 3.1.1. Benzodiazepinová anxiolytika

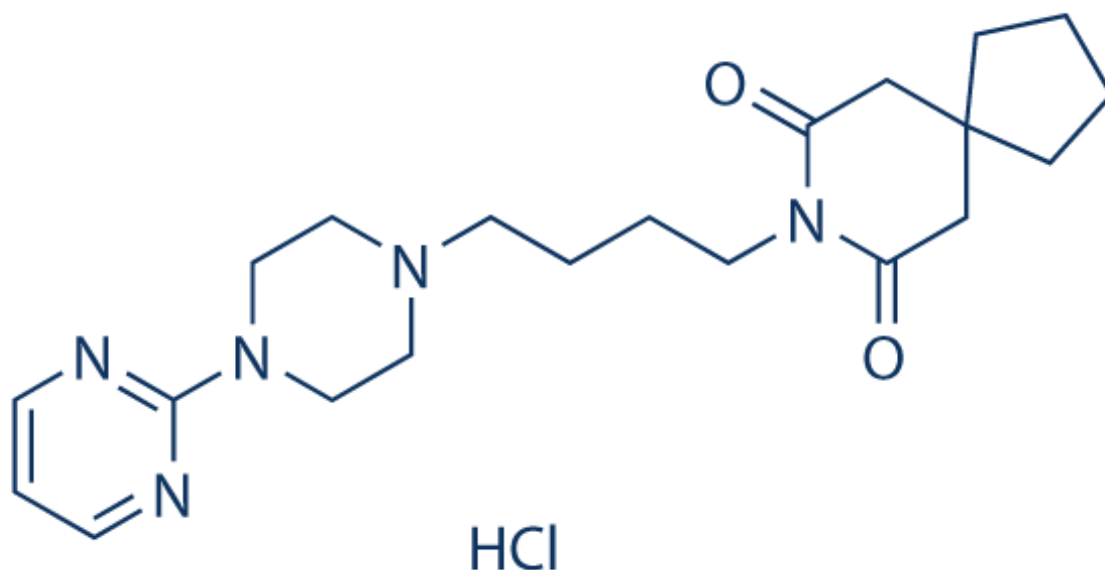
Benzodiazepiny klasifikujeme podle trvání účinku (krátkodobé, střednědobé a dlouhodobé) nebo podle rychlosti nástupu účinku (rychlý, střední a pomalý). Mechanismus účinku je založen na navázání látky na postsynaptický GABA-A receptor a alosterické modulaci inhibičních účinků GABAergního systému. Vyvolávají tak účinky sedativní, anxiolytické, myorelaxační, hypnotické a amnestické. Hlavními zástupci jsou alprazolam, bromazepam, diazepam, midazolam a další [6].

#### 3.1.2. Nebenzodiazepinová anxiolytika

Do této skupiny řadíme farmaka s antihistaminickým účinkem, například hydroxyzin, který má taktéž antiserotoninergní působení, což objasňuje jeho anxiolytické účinky.

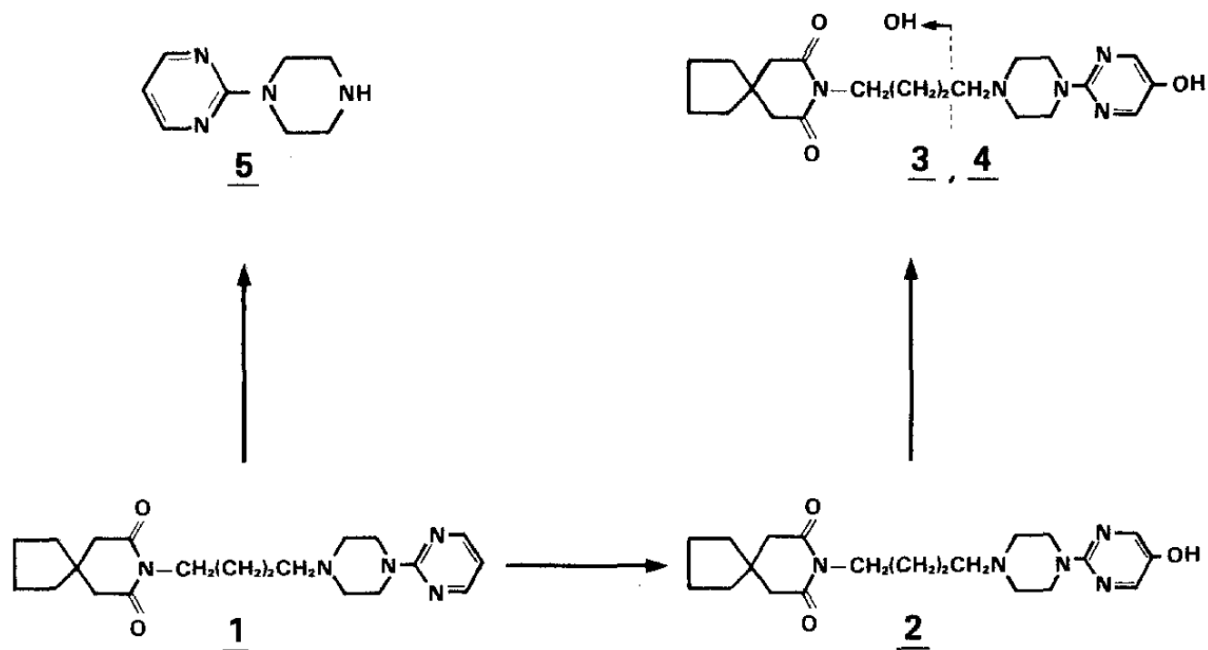
Dalším zástupcem nebenzodiazepinových anxiolytik je buspiron, který se řadí mezi deriváty aspirodekanedionu. Jeho struktura je zobrazena na obrázku č. 2 (strana 13). Působí jako parciální antagonist serotoninových 5-TH<sub>1A</sub> receptorů, takto moduluje serotoninergní systém. Buspiron má také schopnost se vázat na presynaptické dopaminergní receptory, není

však zřetelné, zda tento fakt ovlivňuje jeho anxiolytický účinek. Na benzodiazepinové GABA receptory nemá žádný účinek [6].



Obrázek č. 2: Molekula buspiron hydrochloridu [9].

Jak již bylo zmíněno výše, buspiron se dostává ve formě metabolitů do moči a stolice. Na obrázku č. 3 (strana 14) je znázorněn buspiron (1) – čísla v kulaté závorce odkazují na čísla struktur na obrázku č. 3, který je metabolizován především cytochromem P450 3A4. Hlavním metabolitem je 5-OH-buspiron (2), který je biologicky inaktivní. Další oxidací vznikají z 5-OH-buspironu dva hydroxyderiváty (3, 4). Dealkylací buspironu vzniká metabolit 1-(2-pyrimidinyl)-piperazin (5), ten je ovšem biologicky aktivní, jeho anxiolytický účinek se rovná čtvrtině až pětina prvotní látky a jeho poločas eliminace je zhruba dvakrát delší [4].



Obrázek č. 3: Metabolické schéma buspironu. (1) Buspiron, (2) 5-OH-buspiron, (3, 4) hydroxyderiváty buspironu, (5) 1-(2-pyrimidinyl)-piperazin [10].

Buspiron se v ČR prodává pod obchodním názvem Buspiron-EGIS, užívá se perorálně ve 2-3 dílčích dávkách denně. Denní dávka je stanovována individuálně, nesmí však překročit 60 mg, doporučená zahajovací dávka je 15 mg denně. Léčivo je pro požadovaný účinek nutné podávat opakovaně, jeho účinky se neprojevují dříve než po 7 až 14 dnech užívání [4].

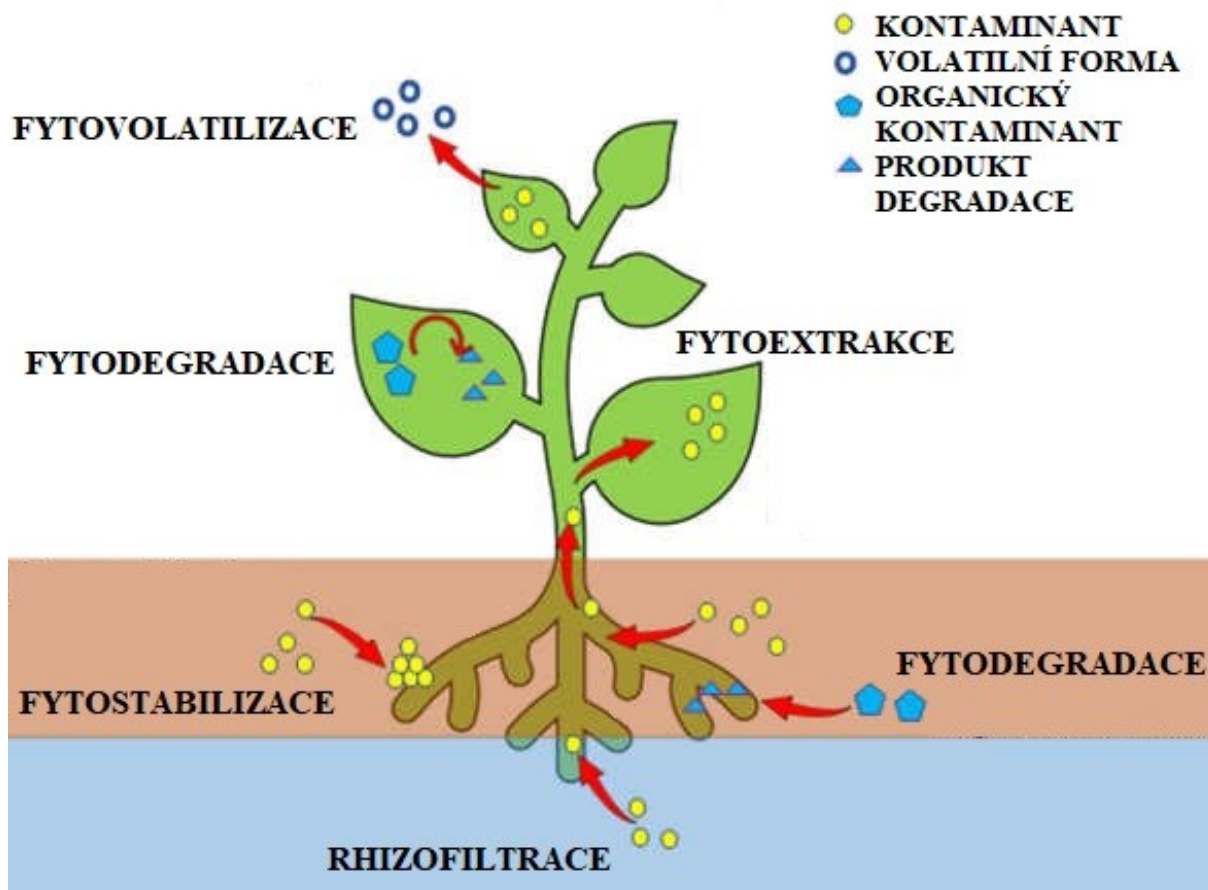
### 3.2. Fytoremediace

Proces, který přirozeně probíhá v životním prostředí, jehož cílem je přeměňování určitých kontaminantů, se nazývá přirozená atenuace (MNA). Tyto procesy jsou schopny bez lidského zásahu omezit množství, toxicitu, mobilitu, objem nebo koncentraci znečišťujících látek obsažených v půdě, vodě i ve vzduchu. Na rozdíl od atenuace, fytoremediace se využívá se záměrem odstranění a transformace těchto látek pomocí zelených rostlin, nebo jejich asociovanými mikroorganismy či půdními doplňky [1]. Průběh růstu a výživy vyšších rostlin je spojen s řadou biologických, chemických a fyzikálních procesů, které jsou základem pro fytoremediační mechanismy. Důležitými faktory biologické dostupnosti kontaminantů pro úspěšnost těchto mechanismů jsou především lipofilita látky, typ půdy a stáří kontaminace [11]. Dalšími okolnostmi nutné posoudit před samotnou sanací oblasti jsou doba trvání samotné sanace, případné znečištění rostlinstva a potravního řetězce [12].

Je známo několik způsobů fytořemediace, které se odlišují mechanismem, nicméně v přírodě lze nalézt i jejich kombinaci. Druhy fytořemediačních metod jsou uvedeny v tabulce č. 1 a jsou také znázorněny na obrázku č. 4 (strana 16).

Tab. č. 1: Stručný přehled typů fytořemediace a jejich aplikace [12].

Metoda	Mechanismus	Využití
Fytoextrakce	Příjem a akumulace látky rostlinnou tkání, sklizeň rostliny a její další zpracování	Půda, povrchové vody
Fytotransformace	Chemická modifikace organických sloučenin metabolismem rostliny	Povrchové a podzemní vody
Fytostabilizace	Vysrážení látky (kovu) exudáty kořenů, snížení jejich dostupnosti	Půda, podzemní vody, důlní hlušina
Fytodegradace a rhizodegradace	Zvýšení mikrobiální degradace v rhizosféře	Půda, voda v rhizosféře
Rhizofiltrace	Příjem látky do kořenů rostliny	Povrchové a vyčerpané vody
Fytovolatilizace	Celkový výpar selenu, rtuti a těkavých uhlovodíků rostlinou	Půda, podzemní vody
Vegetativní pokryv	Výpar dešťové vody rostlinami z důvodu zabránění louhování kontaminantů v místech likvidace	Půda



Obrázek č. 4: Fytoremediace, přeloženo do češtiny [13].

### 3.2.1. Fytoextrakce

Fytoextrakci používají rostliny k transportu a nahromadění kontaminantů (hlavně kovů) z půdy do kořenů, nadzemních výhonků a listů. Po dostatečně dlouhé době přichází sběr rostlin a jejich likvidace. Na místo nich se půda může opět osít dalšími rostlinami až do požadovaného snížení koncentrace kovů [12, 14]. Rostliny, jejichž schopnost akumulovat kovy v úrovních 100x vyšších, než jsou koncentrace stanovené v obyčejných neakumulujících rostlinách, se nazývají hyperakumulátory. Je známo asi 450 rostlinných druhů se způsobilostí hyperakumulace [1].

### 3.2.2. Fytotransformace

Hlavními degradačními substancemi fytotransformace jsou enzymy v kořenech rostlin [1]. Po příjmu polutantů často dochází ke změně na látky stabilnější, s nižší toxicitou nebo s nižší mobilitou [12], nicméně není vyloučena ani transformace na látky s obdobnou či



vyšší ekotoxicitou. Mezi hlavní kontaminanty zpracovávané v rostlinách fytotransformací se řadí např. herbicidy, chlorované alifatické uhlovodíky a explosiva [1].

### **3.2.3. Fytostabilizace**

Další metodou je fytostabilizace, jejímž cílem je zamezení pohyblivosti a migrace vodních a půdních kontaminantů jejich redoxní přeměnou, převedením do nerozložitelného stavu nebo zabudováním do rostlinné struktury tak, že se nedostanou zpět do prostředí, protože s rostlinou představují stabilní masu [12]. Při korekci znečištěných ploch se uplatňuje jako závěrečný krok po jiných obnovujících technologiích. Touto technikou jsou zpracovávány v rostlinách především kovy a hydrofobní organické sloučeniny, které nejsou degradovatelné [1].

### **3.2.4. Fytodegradace a rhizodegradace**

Při fytodegradaci a rhizodegradaci dochází k rozkladu působením proteinů a enzymů produkovaných rostlinami nebo půdními organismy, které jsou s rostlinami v symbióze [12]. Kořeny vylučují živiny potřebné pro tyto půdní organismy (bakterie, kvasinky, houby) a zlepšují tak okolní půdní prostředí rostliny odbouráváním kontaminantů. Nevýhodou degradací je jejich dvousečná zbraň, kdy přeměnou může dojít ke zvýšení toxicity [1].

Je pravděpodobné, že v některých případech probíhá kombinace uvedených způsobů. Například PCB může být degradováno jak buňkami rostlin (fyto-degradace), tak mikroorganismy v rhizosféře (rhizo-degradace) [5].

### **3.2.5. Rhizofiltrace**

Rhizofiltrace zahrnuje zachycení polutantu kořenovou soustavou rostlin z povrchových nebo vyčerpaných podzemních vod. Výhodou této metody je její cenová dostupnost při dekontaminaci velkých objemů a povrchů (např. čištění povrchových vod v oblasti Černobylu) [1].

### **3.2.6. Fytovolatilizace**

Fytovolatilizace je proces, při kterém je polutant přijat kořenovou soustavou rostliny a je transportován do její nadzemní části, kde je pomocí enzymů převeden na těkavou formu a dochází k jeho transpiraci do ovzduší. De facto dochází pouze k přesunu polutantů narozdíl od předchozích procesů [1].

### **3.2.7. Výhody a nevýhody fytořemediace**

Na rozdíl od dekontaminace za použití těžké techniky, během fytořemediace nedochází k poškození okolí, je z hlediska přístupnosti přijatelnější a také je značně finančně výhodnější mimo jiné proto, že využívá jako zdroj energii slunečního záření.

Navzdory výše popsaných výhod, mají fytořemediační techniky i řadu nevýhod. Důležitou okolností je fakt, že i přes velkou pestrost metod je fytořemediace v počátcích svého širšího rozvinutí. Z hlediska aplikovatelnosti je hlavní nevýhodou různorodost kontaminovaného místa (půda, klima, mikroorganismy). To může zapříčinit vystavení rostliny různým stresovým faktorům a ovlivnit tak výsledky pokusů [12, 15].

### **3.3. Osud farmak v čistírně odpadních vod**

Kromě farmak se do ČOV také vodním tokem dostávají tzv. produkty osobní péče. Množství obou těchto skupin (PPCPs) je důsledně sledováno, neboť jsou považovány za toxické látky vyskytující se v životním prostředí a je potřeba vyhodnocovat jejich environmentální riziko [16].

Průběh čištění odpadních vod v ČOV má několik kroků. Prvním je mechanické čištění, během kterého dochází k oddělení nerozpuštěných pevných částic sedimentací nebo cezením na přístrojích k tomu určených. Druhým krokem je biologické čištění, pro jeho funkci je nutná přítomnost mikroorganismů, jejichž působením dochází k rozkladu organických látek. Směs mikroorganismů v odpadní vodě společně s organickými a anorganickými látkami se nazývá aktivovaný kal. Důležitým faktorem pro optimální průběh degradačních procesů je dostatečné množství kyslíku, které je zajištěno provzdušňováním aktivační nádrže. Poté následují kroky snižující obsah těžkých kovů, sloučenin fosforu nebo sloučenin dusíku ve vodě [17].

### **3.4. Antioxidační systém rostlin**

Rostliny musí být schopné se vypořádat s řadou environmentálních stresů, které vedou především k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS). Tyto volné radikály mají sklony k oxidaci různých buněčných biomolekul (např. proteiny, nukleové kyseliny, lipidy), které vedou k procesům buněčné smrti, stárnutí a k rakovinotvornému bujení. Environmentální stresy můžeme rozlišovat podle původu na biotické (např. patogenní mikroorganismy, houby, plevele, jiní predátoři) a na abiotické (např. látky znečišťující ovzduší a půdu, extrémní teplo nebo sucho, mechanické poškození). Rostliny si tedy vyvinuly složitý antioxidační systém, který

se skládá z různých enzymatických i neenzymatických sloučenin, zabraňující těmto procesům [18].

Mezi hlavní enzymy podílející se na eliminaci ROS je řazena superoxiddismutasa (EC 1.15.1.1), glutathionperoxidasav (EC 1.11.1.9) a katalasa (EC 1.11.1.6). Dále to jsou peroxidasy (EC 1.11.1.7) nacházející se jako volné v cytosolu, ale také vázané na povrchu membrán.

Kyselina askorbová a glutathion hrají nezastupitelnou roli v neenzymatickém antioxidačním systému živých organismů. Řada dalších rostlinných antioxidantů ale také patří do skupiny tzv. sekundárních metabolitů, které lze rozdělit do tří základních skupin, a to na fenolické látky obsahující hydroxyaryl, terpenoidy neboli polymery izoprenu, a alkaloidy, jejímž společným rysem je přítomnost dusíku. Ačkoli se nazývají „sekundární“, jejich absence může zapříčinit dlouhodobé zhoršení až zahynutí rostliny [18].

## 4. Experimentální část

### 4.1. Přístrojové vybavení

- Analytické váhy Entris (Sartorius Lab Instruments, Německo)
- Centrifuga Universal R32 (Hettich, Německo) – 16000g
- Centrifuga Spectrafuge TM 16M (Labnet, USA) – 14000 otáček/min, průměr rotoru 100 mm
- Čtečka mikrotitračních destiček Multiscan go (Thermo Scientific, USA)
- Elektroforetická souprava (Bio-Rad, USA)
- Kahan Fuego pro (WLD-TEC, Německo)
- Kultivační box – kultivační místnost, udržovaná teplota 24 °C, světelný režim 12 hodin světlo a 12 hodin tma, zajištěný zářivkami COOL WHITE 40 W/m<sup>2</sup> ve vzdálenosti 40 cm
- Laminární box s vertikálním prouděním FBB 120 (Labox, ČR)
- Mrazicí box (Liebherr, Německo) – udržovaná teplota -20 °C
- pH metr UltraBasic UB-10 (Denver Instruments Company, USA)
- Spektrofotometr Ultrospec 2100 (Amersham Pharmacia Biotech, USA)
- Systém HPLC (Shimadzu, Japonsko) – vysokotlaké čerpadlo LC20AD, UV detektor SPD 20 A, nástřík kohoutem Rheodyne (USA), kolona Agilent Eclipse XDB o rozměrech 150 x 4 mm (5 μm), předkolona C18 (Watrex), vyhodnocovací software Clarity (DataApex, verze 8.5)
- Tlakový hrnc Rapid Cook (Morphy Richards, Velká Británie) – sterilizace laboratorního nádobí a medií
- Ultrazvuková lázeň FB 15050 (Fisherbrand®, Velká Británie)

### 4.2. Chemikálie

- 2-amino-2-methyl-1-propanol (Sigma-Aldrich, USA)
- 3,3'-diaminobenzidin (Sigma-Aldrich, USA)
- ABTS roztok obsahující H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (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)
- Buspiron hydrochlorid, p.a.  $\geq 99$  % (Sigma-Aldrich, USA)
- Deionizovaná voda (Watek, IWA 5 roso, ČR)
- Dithiothreitol (Sigma-Aldrich, USA)
- Ethanol, p.a. 96 % (Lach-Ner, ČR)
- Ethylendiamintetraoctan 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)
- Kyselina chlorovodíková 35 % (Lach-Ner, ČR)
- Kyselina šikimová (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina trihydrogenfosforečná,  $\geq 85\%$  (Sigma-Aldrich, USA)
- Methanol, HPLC grade (Lab-Scan analytical sciences, Polsko)
- N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin (Thermo, Japonsko)
- Nikotinamidadeninukleotidfosfát (Roche, Německo)
- Nitrotetrazoliová modř (Sigma-Aldrich, USA)
- Peroxid vodíku 30 % (Lach-Ner, ČR)
- Peroxodisíran amonný (Sigma-Aldrich, USA)
- Polyvinylpyrrolidon (Sigma-Aldrich, USA)
- Sacharosa (Penta, ČR)
- Savo Original (Unilever s.r.o., Velká Británie)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (VWR Life Science, USA)
- Uhličitan sodný bezvodý (Lachema, ČR)

- Chemikálie použité k přípravě média podle Murashiga a Skooga (Lach-Ner, ČR) byly kvality p.a. Přesné složení média je uvedeno v tabulce č. 2.

Tab. č. 2: Složení média podle Murashiga a Skooga [19].

Složka média	Chemikálie	Koncentrace [mg · L <sup>-1</sup> ]
Makrosložky	KNO <sub>3</sub>	1900
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	440
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	370
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
Mikrosložky	MnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	22,3
	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	8,3
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
	KI	0,83
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,25
	CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,025
	CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,025
	Na <sub>2</sub> EDTA	37,2
	FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	27,8

### 4.3. Rostlinný materiál

- Kukuřice setá (*Zea mays*) – kultivar DKC 3969 (Monsanto ČR)

### 4.4. Pracovní postup

#### 4.4.1. Sadba a kultivace sterilních rostlin

Před samotnou sadbou byly sterilizovány semena kukuřice seté (*Zea mays*), jejich ponořením do 70% (v/v) roztoku ethanolu na 30 vteřin, pro požadované odmaštění. Následně byly sterilizovány po dobu 10 minut v 20% (v/v) roztoku Sava, 20 minut v 10% (v/v) roztoku Sava a poté propláchnuty třikrát sterilní destilovanou vodou. Do 500ml Erlenmeyerových baněk bylo pomocí injekční stříkačky vneseno 15 ml MS média, jehož složení bylo podle tabulky č. 2. Do každé z takto připravených baněk byla za sterilních podmínek v laminárním boxu vyseta 4 semena a hrdlo bylo uzavřeno hliníkovou fólií. Baňky byly přeneseny do kultivační místnosti, kde rostly do požadovaného vzrůstu (první experiment 10 dnů a druhý

experiment 14 dnů). Takto bylo připraveno 6 baňek s rostlinami a 1 baňka s rostlinami pro kontrolní měření (viz obrázek č. 5).



Obrázek č. 5: Baňky s rostlinami požadovaného věku před přidáním kontaminantu (léčiva bupironu).

#### 4.4.2. Přidání kontaminantu k rostlinám a odběr vzorků

Původní médium, které se nacházelo v baňkách, bylo odstraněno a nahrazeno 100 ml nového sterilního MS média. K rostlinám bylo přidáno při prvním experimentu 100  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku bupironu o koncentraci  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , výsledná koncentrace v baňce tak činila  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . U druhého experimentu bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku bupironu o koncentraci  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , výsledná koncentrace v baňce se rovnala  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Neprodleně poté byl odebrán první vzorek sterilní injekční stříkačkou média, stejným způsobem byly odbírány vzorky po další dny. Odebrané vzorky byly uchovány v mrazicím boxu. Po dokončení experimentů byly osušené rostliny zváženy a vzorky z listů a kořenů byly v hliníkové fólii zamrazeny v tekutém dusíku a skladovány při teplotě  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **4.4.3. Analýza vzorků pomocí HPLC**

Odebrané vzorky byly analyzované vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Měření probíhalo za následujících podmínek: jako mobilní fáze byla použita směs voda/methanol/kyselina fosforečná v poměru 60:40:0,1 (v/v/v), průtok mobilní fáze  $1,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , citlivost přístroje (range) při hodnotě 0,0007 AUFS a detekce UV při 240 nm. Mobilní fáze byla před použitím ultrazvukována v lázni po dobu 15 minut.

Před samotným měřením byly vzorky ponechány po dostatečně dlouhou dobu ve stojánku a poté centrifugovány po dobu 5 minut (14000 otáček/min, průměr rotoru 100 mm). Taktéž byla změřena sada kalibračních roztoků buseronu o koncentracích 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 a 15,0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  za stejných podmínek.

#### **4.5. Příprava rostlinných extraktů pro stanovení enzymových aktivit**

Rostlinný materiál (listy a kořeny) byl nejprve zhomogenizován v třecí misce s kapalným dusíkem, a poté bylo přidáno čtyřnásobné (listy) nebo třínásobné (kořeny) množství extrakčního pufru (100 mM Tris-HCl pufr, pH 7,8; 1 mM DTT; 1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; 10 mM askorbát sodný). Dále bylo přidáno 4 mg PVP a směs byla centrifugována při zrychlení 16000g a teplotě 4 °C po dobu 15 minut [20]. Jako rostlinný extrakt pro stanovení enzymových aktivit a obsahu proteinů byl použit supernatant.

#### **4.6. Stanovení množství proteinů dle Bradforda**

Ve všech připravených rostlinných extraktech bylo stanoveno množství proteinů. Do mikrotitrační destičky bylo odpipetováno 20  $\mu\text{L}$  vhodně zředěného rostlinného extraktu a 200  $\mu\text{L}$  Bradfordova činidla. Mikrotitrační destička byla inkubována 10 min a následně byla měřena absorbance při 595 nm a 450 nm. Změřením roztoků hovězího sérového albuminu (BSA) v rozsahu 0,1 – 0,5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  byla provedena kalibrace [21].

#### **4.7. Stanovení aktivity peroxidas**

V odebraných vzorcích listů a kořenů po fytoextrakčních experimentech byly stanoveny aktivity následujících enzymů, které byly porovnány s kontrolními vzorky rostlin, ke kterým nebyl přidán polutant (buseron).



#### **4.7.1. Aktivita celkových volných peroxidas**

Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 155  $\mu\text{L}$  50 mM fosfátového pufru, pH 7,0; 5  $\mu\text{L}$  30% (v/v) roztoku  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 20  $\mu\text{L}$  4  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  roztoku DAB v 96% (v/v) ethanolu a 20  $\mu\text{L}$  rostlinného extraktu. Ihned poté byla kontinuálně měřena absorbance po dobu 5 minut při 430 nm za laboratorní teploty. Stanovení bylo provedeno dvakrát v triplikátech [20].

#### **4.7.2. Aktivita membránově vázaných peroxidas**

Sediment získaný přípravou extraktu (viz 4.5.) byl promyt v extrakčním pufru (100 mM Tris-HCl pufr, pH 7,8; 1 mM DTT; 1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; 10 mM askorbát sodný) s 1 M NaCl. Směs byla poté centrifugována za stejných podmínek (viz 4.5.). Získaný supernatant byl použit pro stanovení aktivity membránově vázaných peroxidas. Aktivita byla měřena stejným způsobem jako při stanovení celkových volných peroxidas (viz 4.7.1.) [20]. Stanovení bylo provedeno třikrát v triplikátech.

#### **4.7.3. Stanovení aktivity guajakol-peroxidasy**

Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 155  $\mu\text{L}$  50 mM fosfátového pufru, pH 7,0; 5  $\mu\text{L}$  30% (v/v) roztoku  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 20  $\mu\text{L}$  9 mM roztoku guajakolu a 20  $\mu\text{L}$  rostlinného extraktu. Ihned poté byla kontinuálně měřena absorbance po dobu 5 minut při 470 nm za laboratorní teploty [20]. Molární absorpční koeficient odpovídal hodnotě 26600  $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [22]. Stanovení bylo provedeno dvakrát v triplikátech.

#### **4.7.4. Stanovení aktivity ABTS-peroxidasy**

Pro zjištění aktivity ABTS-peroxidasy bylo do mikrotitrační destičky pipetováno 155  $\mu\text{L}$  50 mM fosfátového pufru, pH 7,0; 5  $\mu\text{L}$  30% (v/v) roztoku  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 20  $\mu\text{L}$  komerčního roztoku ABTS obsahující  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 20  $\mu\text{L}$  rostlinného extraktu. Ihned poté byla kontinuálně měřena absorbance po dobu 5 minut při 414 nm za laboratorní teploty [23]. Molární absorpční koeficient odpovídal hodnotě 31100  $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [24]. Stanovení proběhlo dvakrát v triplikátech.

### **4.8. Stanovení fenolických látek**

Rostlinný materiál (listy a kořeny) byl nejprve homogenizován v třecí misce s kapalným dusíkem a poté bylo přidáno čtyřnásobné (listy) nebo třínásobné (kořeny) množství 50% (v/v) ethanolu. Směs byla centrifugována při 16000g a teplotě 4 °C po dobu 15 minut [20]. Jako rostlinný extrakt pro stanovení byl použit supernatant.

Do mikrotitrační destičky bylo odebráno 20  $\mu\text{L}$  rostlinného extraktu a 100  $\mu\text{L}$  10% (v/v) Folinova činidla. Po 4 minutách inkubace při laboratorní teplotě bylo přidáno 80  $\mu\text{L}$  roztoku  $75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$  a po dalších 30 minutách inkubace za stejných podmínek byla změřena absorbance při 760 nm.

Kalibrace proběhla nahrazením extraktu roztokem fenolu v rozmezí 0–700  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Z naměřených hodnot byla sestrojena kalibrační křivka, ze které byly odečteny hodnoty fenolických látek ve zkoumaných vzorcích [25].

## **4.9. Nativní elektroforéza**

### **4.9.1. Příprava gelů pro elektroforézu**

Pro nativní elektroforézu byl připraven 10% polyakrylamidový separační gel smíšením 7,9 mL destilované vody; 6,7 mL 30% roztoku akrylamidu/bis-akrylamidu (36,5 : 1); 5,0 mL  $1,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl pufru, pH 8,8; 2  $\mu\text{L}$  TEMED a 0,2 mL 10% (w/v) roztoku glycerolu. Jako poslední bylo přidáno 200  $\mu\text{L}$  10% peroxodisíranu amonného, který iniciuje polymeraci gelu a směs byla nalita mezi čtyři dvojice elektroforetických skel a převrstvena destilovanou vodou. Po 30 min při laboratorní teplotě gel zpolymeroval a byl převrstven 4% zaostřovacím gelem, který byl vytvořen smíšením 1,22 mL destilované vody; 0,26 mL 30% roztoku akrylamidu/bis-akrylamidu (36,5 : 1); 0,5 mL  $0,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl pufru, pH 6,8; 0,5  $\mu\text{L}$  TEMED; 0,02 mL 10% (w/v) roztoku glycerolu a naposledy 20  $\mu\text{L}$  10% peroxodisíranu amonného. Pro vytvoření jamek k dávkování vzorků byl vložen mezi elektroforetická skla hřeben, který byl vyjmut po 30 min polymerace při laboratorní teplotě.

### **4.9.2. Příprava rostlinných extraktů a průběh elektroforézy**

Rostlinný materiál (listy a kořeny) byl pro elektroforetické stanovení zpracován stejným způsobem jako pro stanovení enzymových aktivit (viz 4.5.). Ke 200  $\mu\text{L}$  připraveného extraktu bylo do mikrozkušavky přidáno 40 mg sacharózy, aby její výsledná koncentrace byla 20% (w/v). Do jamek gelu bylo aplikováno množství připraveného extraktu tak, aby obsahovaly stejné množství proteinů stanovené metodou dle Bradforda (viz 4.6.). Gely byly vloženy do elektroforetické vany s elektrodovým pufrem připravený smíšením 10 mL 10% (w/v) glycerolu, 18,8 g glycinu, 3 g Tris a doplněn do 1 L destilovanou vodou (pH 8,3). Do horního prostoru elektroforetické aparatury bylo k elektrodovému pufru před zahájením elektroforézy přidáno 100  $\mu\text{L}$  0,1% (w/v) bromfenolové modři. Elektroforéza byla zahájena zapojením ke zdroji stejnosměrnému proudu s počáteční hodnotou napětí 70 V. Ve chvíli, kdy do separačního gelu doputovala bromfenolová modř, hodnota napětí byla zvýšena na 140 V. Vzápětí poté, kdy

bromfenolová modř doputovala na konec gelu, byla elektroforetická separace ukončena. Po vyjmutí gelů ze skel elektroforetické aparatury byly opláchnuty destilovanou vodou a vloženy do detekčních směsí (viz níže).

#### **4.9.3. Detekce aktivity peroxidas v gelu**

Pro zobrazení peroxidas byla připravena detekční směs obsahující 0,01 g 3,3'-diaminobenzidinu (DAB), který byl rozpuštěn v 2,5 mL 96% (v/v) ethanolu. Dále bylo přidáno 7 mL 100 mM fosfátového pufru, pH 7,0; 100  $\mu$ L 30% (v/v)  $H_2O_2$  a 0,4 mL destilované vody, aby celkový objem činil 10 mL. Roztok byl sonikován v ultrazvukové lázni po dobu 5 min. Gel byl inkubován v tomto roztoku do požadovaného vzhledu za laboratorní teploty a poté byl promyt destilovanou vodou [20].

#### **4.9.4. Detekce aktivity šikimátdehydrogenasy v gelu**

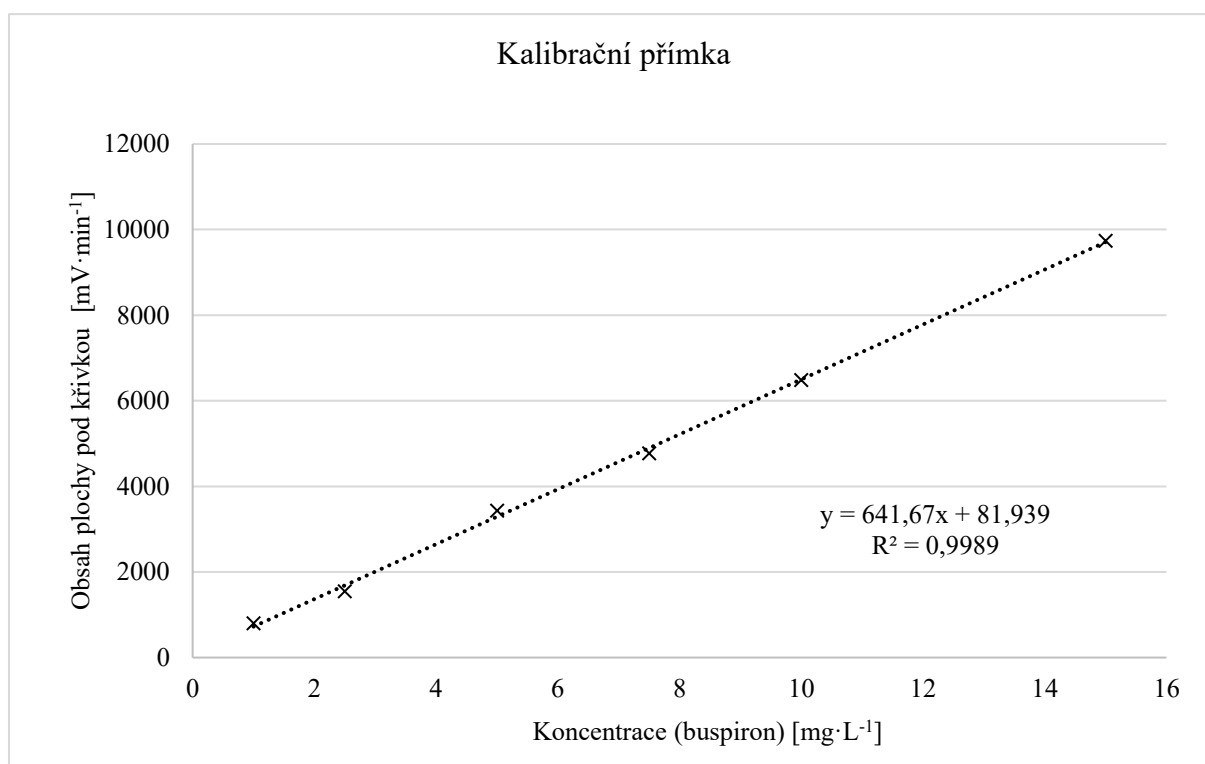
Po elektroforetické separaci byl gel vložen do reakční směsi obsahující 100 mM 2-amino-2-methyl-1-propanol-NaOH pufru, pH 9; 3 mM kyseliny šikimové; 0,2 mM NADP; 0,1 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> nitrotetrazoliové modři a 5  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> fenazin methosulfátu. V této směsi byl gel inkubován do požadovaného vzhledu za laboratorní teploty a poté byl promyt destilovanou vodou [26].

## 5. Výsledky a diskuse

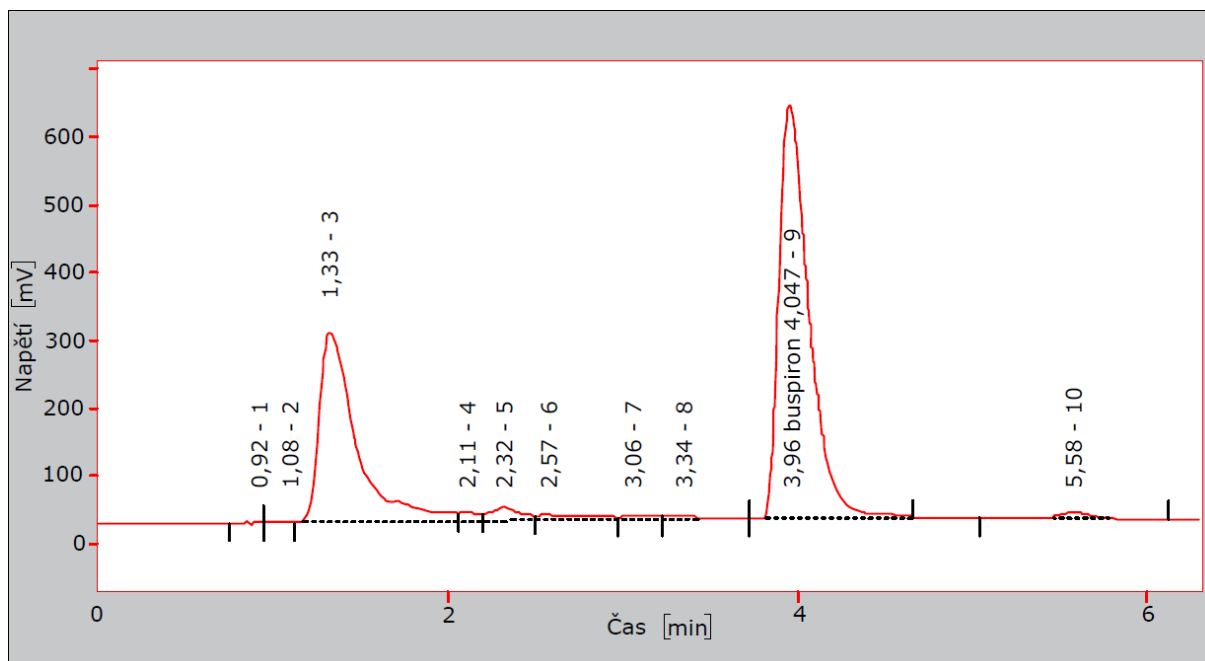
### 5.1. Kalibrace HPLC

Po změření sady vzorků obsahující kalibrační roztoky bupironu o koncentracích 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 a 15,0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , byly hodnoty vyneseny do kalibrační přímky, která je zobrazena v grafu č. 1. Tato kalibrační přímka byla použita pro vyjádření koncentrací ve vzorcích média, které byly odebrány během kultivací. Z šumu základní linie odpovědi přístroje byla vyjádřena hodnota LOD 0,06  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  a LOQ 0,19  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Graf č. 1: Kalibrační přímka bupironu.



Obrázek č. 6 (strana 29) zobrazuje chromatogram odebraného vzorku z prvního experimentu bezprostředně po kontaminaci bupironem. Pík, který se nachází v 4. minutě odpovídá bupironu, píky elující mezi 1. a 2. minutou jsou složky MS média.



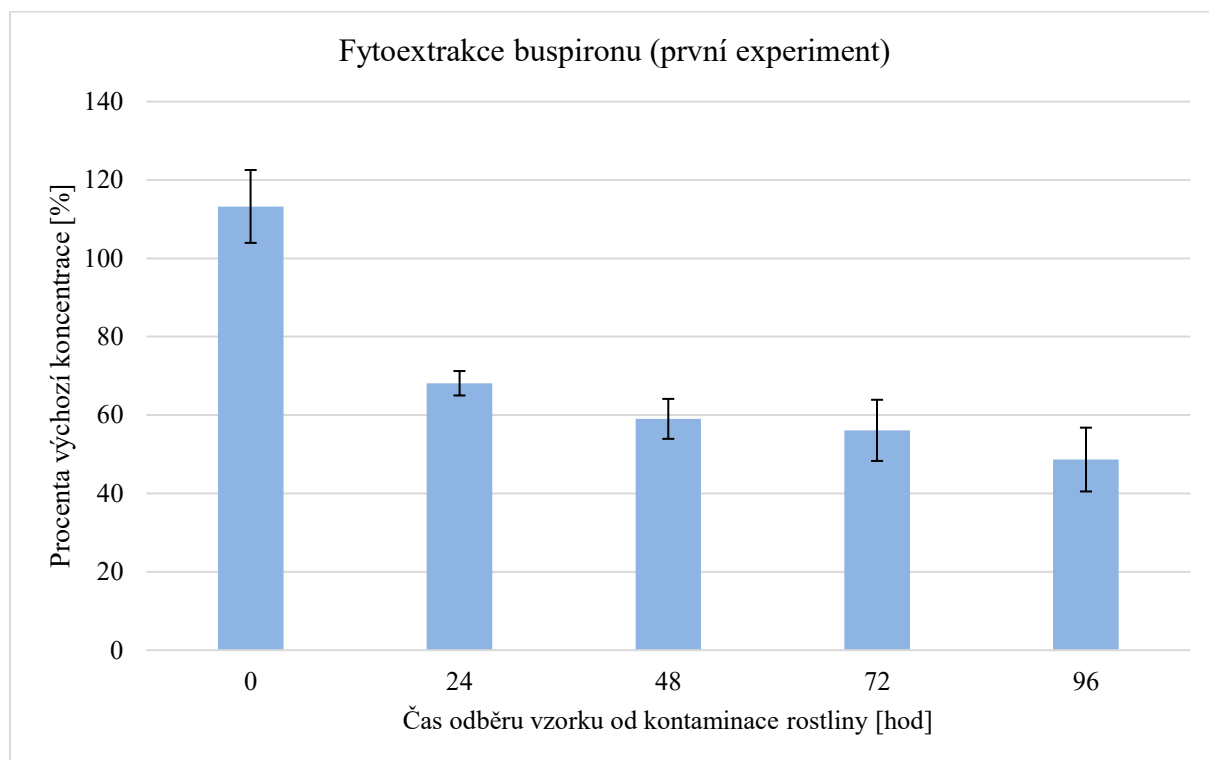
Obrázek č. 6: Chromatogram buspironu v kultivačním médiu.

## 5.2. Účinnost fytoextrakčních experimentů

### 5.2.1. První experiment

První experiment byl proveden na 6 baňkách s rostlinami a přidáním buspironu o výsledné koncentraci  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , které proběhlo po 14 dnech od vysetí kukuřice seté. Zároveň byl buspiron přidán i do 1 kontrolní baňky, jejíž obsah se skládal ze 100 ml média a rostlinu neobsahoval. Odběry probíhaly hned po kontaminaci léčivem a poté po 24, 48, 72 a 96 hodinách. V grafu č. 2 (strana 30) jsou vyneseny procentuální průměrné hodnoty výchozí koncentrace buspironu v závislosti na čase, ve kterém byly vzorky média odebírány, včetně směrodatných odchylek.

Graf č. 2: Závislost množství buspironu přítomného v MS médiu (vyjádřené v procentech výchozí požadované koncentrace, tj.  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) na čase.



Po přidání  $100 \mu\text{l}$  zásobního roztoku buspironu o koncentraci  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , aby výsledná koncentrace v baňce činila  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  se skutečná výchozí koncentrace stanovená pomocí HPLC systému s UV detekcí lišila. Průměrná koncentrace přidaná do 6 baněk s rostlinami byla  $11,3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , v grafu č. 2 je z této příčiny vynesena prvotní hodnota jako 113 %. Tato odchylka mohla být způsobena částečným odpařením média při jeho sterilizaci.

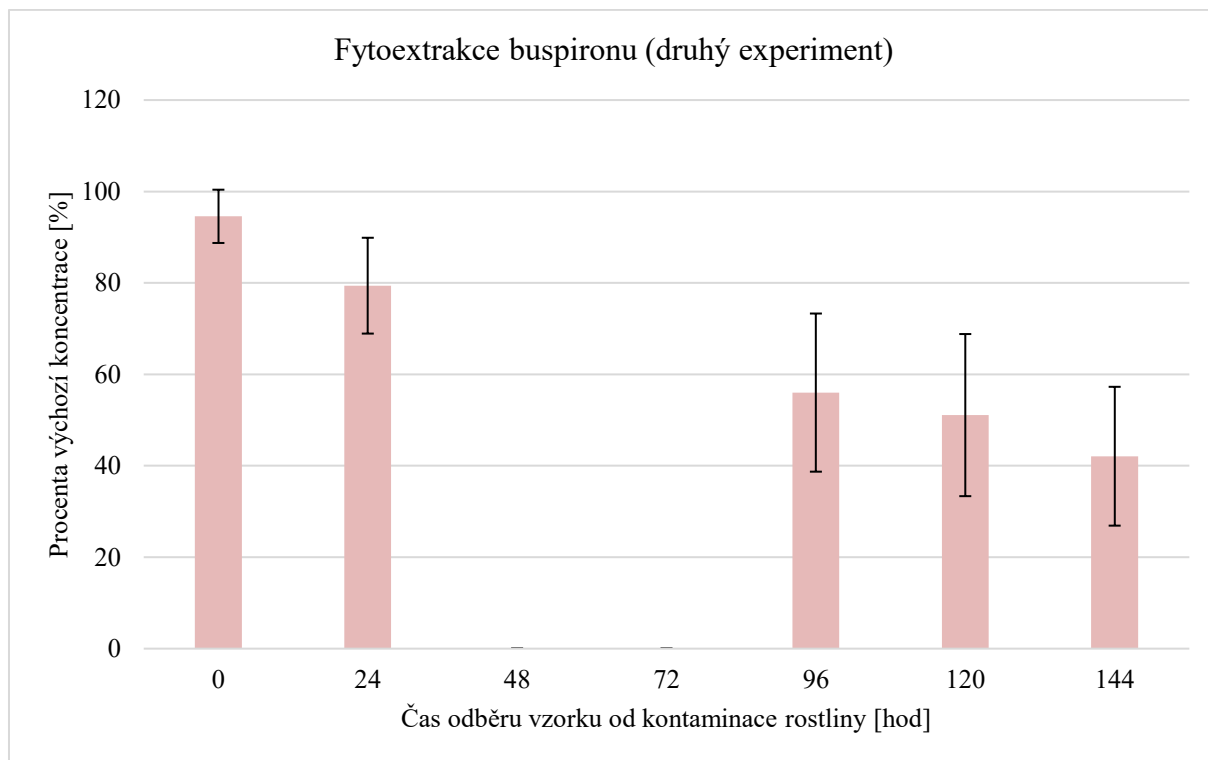
Z grafu č. 2 je patrné, že největší pokles léčiva ve vzorku byl zaznamenán po 24 hodinách, kdy koncentrace poklesla o 45 %. Další dny byl pokles již menší, a to o 9 %, 3 % a 7 % vzhledem k předchozímu dni. Je pravděpodobné, že úbytek by nadále pokračoval za podobných účinností. Celkový pokles koncentrace buspironu za 96 hodin byl 65 %. Celková fytoextrakční účinnost byla průměrně  $0,06 \text{ mg}$  buspironu na 1 gram čerstvé hmotnosti rostliny za celou dobu experimentu.

### 5.2.2. Druhý experiment

Druhý experiment byl proveden taktéž na 6 baňkách s rostlinami, ale s přidáním buspironu o výsledné koncentraci  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  proběhlo po 10 dnech od vysetí kukuřice seté. Odběry média probíhaly hned po kontaminaci a poté po 24, 96, 120 a 144 hodinách. V grafu

č. 3 jsou vyneseny procentuální průměrné hodnoty výchozí koncentrace v závislosti na čase, ve kterém byly vzorky odebrány.

Graf č. 3: Závislost množství buspironu přítomného v MS médiu (vyjádřené v procentech výchozí požadované koncentrace, tj.  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) na čase.



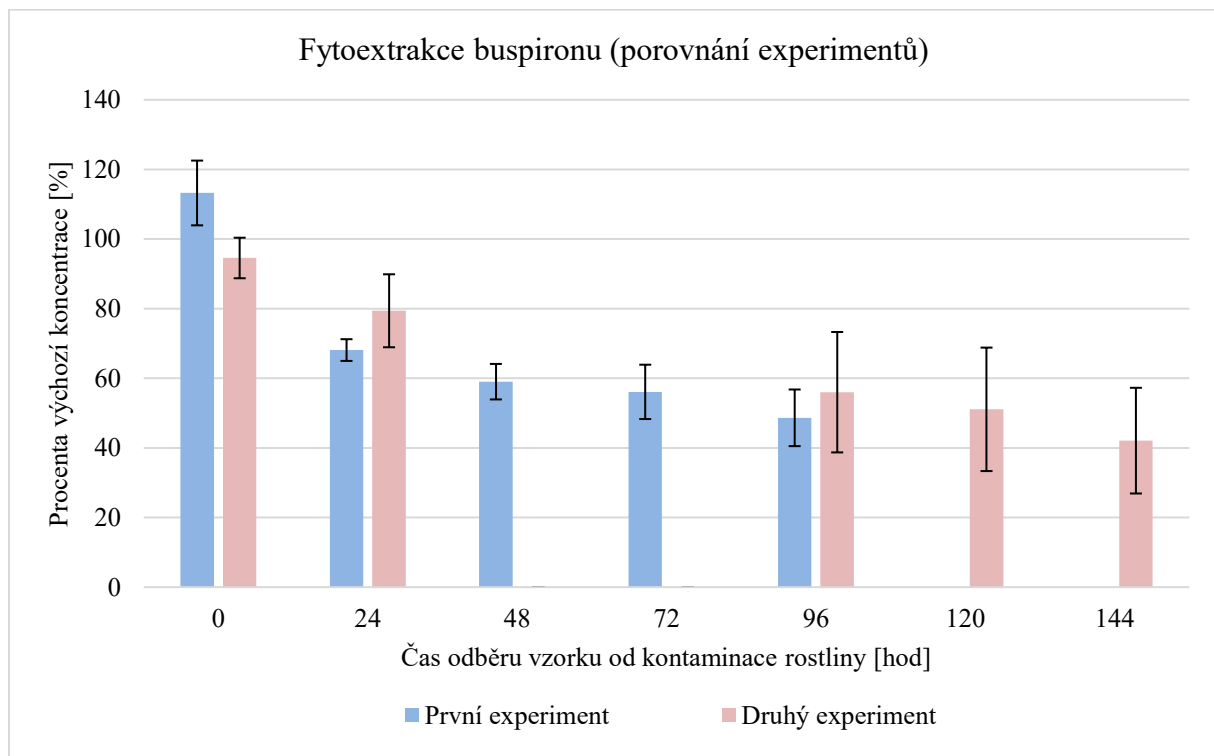
Po přidání  $100 \mu\text{l}$  zásobního roztoku buspironu o koncentraci  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , aby výsledná koncentrace v baňce činila  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  se skutečná výchozí koncentrace stanovená pomocí HPLC systému s UV detekcí také jako při prvním experimentu lišila. Průměrná koncentrace přidaná do 6 baněk s rostlinami byla  $4,7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , v grafu č. 3 je z této příčiny vynesena prvotní hodnota jako 95 %. Tato odchylka mohla být způsobena okamžitou adsorpcí léčiva na kořeny rostlin.

Pokles mezi prvním a druhým odběrem není tak markantní jako u prvního experimentu, činil pouze 15 %. Třetí odběr proběhl až po 96 hodinách, účinnost fytoextrakce se v tomto případě rovnala 23 %. Poslední dva dny se úroveň poklesu také snížila, a to o 5 % a 9 % vzhledem k předchozímu dni. Je pravděpodobné, že stejně jako v předchozím případě by úbytek i nadále pokračoval za podobných účinností. Celkový pokles koncentrace buspironu za 144 hodin byl 53 %. Celková fytoextrakční účinnost byla průměrně  $0,05 \text{ mg}$  buspironu na 1 gram čerstvé hmotnosti rostliny za celou dobu experimentu.

### 5.2.3. Porovnání experimentů

Byly uskutečněny 2 experimenty po 6 kultivacích, jedna kultivační baňka obsahovala 4 rostliny kukuřice seté (*Zea mays*), experimenty se lišily v počáteční koncentraci přidaného buspironu. Pokles mezi prvním a druhým odběrem obou experimentů je značně rozdílný, u druhého experimentu dosáhl hodnoty 15 %, tedy třikrát méně než s dvojnásobnou koncentrací. Odběr v 96 hodině byl oproti tomu vyšší u druhého experimentu, výsledky však nemusí být přesné, kvůli velké směrodatné odchylce. Příčinou mohlo být postupné odumírání rostlin, které bylo zjevné na jejich fyziologickém stavu (např. změna barvy, vadnutí). Pokud by byla celková účinnost druhého experimentu posuzována za dobu 96 hodin jako u prvního experimentu, celkový pokles by dosáhl 39 %. Fytoextrakce s dvojnásobně menší koncentrací proběhla s 60% účinností v porovnání s prvním experimentem. Pro srovnání byla celková fytoextrakční účinnost druhého experimentu vypočítána také pro celkovou dobu odpovídající prvnímu experimentu, tj. 96 hodin. Hodnota fytoextrakční účinnosti se rovnala 0,03 mg buspironu na 1 gram čerstvé hmotnosti rostliny, což je ve srovnání s prvním experimentem poloviční hodnota. Rostliny z obou dvou experimentů extrahovaly za 96 hodin stejné množství buspironu, odpovídající vstupní koncentraci, odlišný byl pouze průběh.

Graf č. 4: Porovnání dvou experimentů fytoextrakce buspironu. V prvním experimentu byla počáteční koncentrace buspironu v médiu dvojnásobná oproti druhému experimentu.





Fytoextrakce anxiolytika buspironu se zdá být účinnější než fytoextrakce karbamazepinu, který se používá při léčbě epilepsie. Jeho pokles za stejných experimentálních podmínek a dobu 96 hodin byl pouze 10 % při počáteční koncentraci  $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Nicméně jako nejúčinnější se zdá být fytoextrakce nesteroidního antiflogistika ibuprofenu, provedena taktéž za stejných experimentálních podmínek a počáteční koncentrací  $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , jehož koncentrace v médiu nebyla už po 48 hodinách detekována [27].

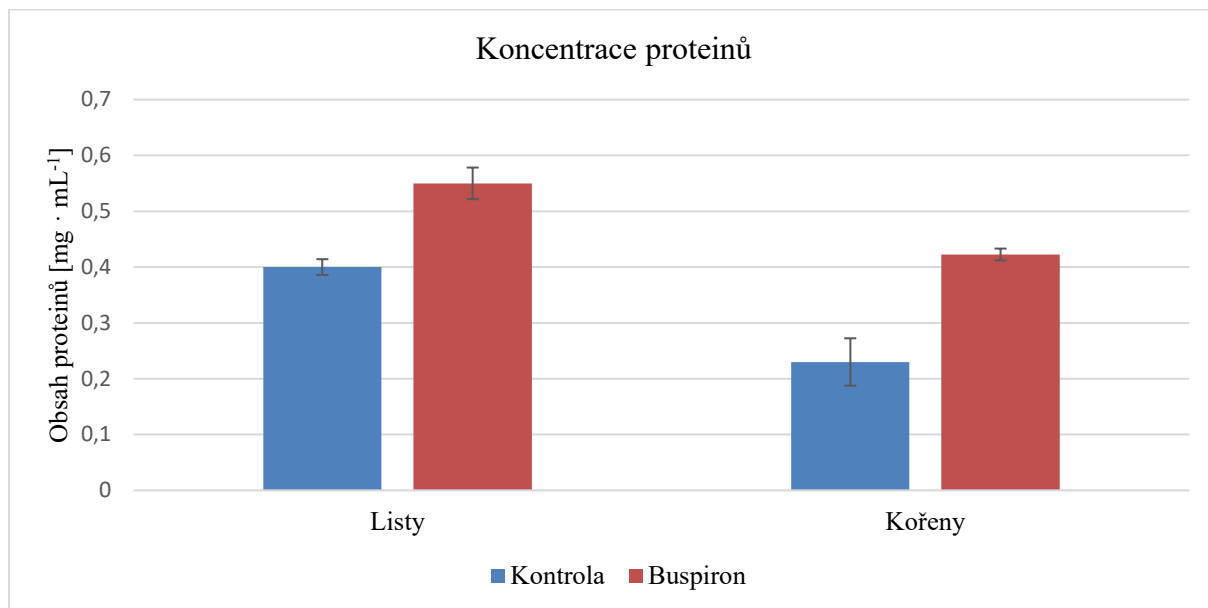
### **5.3. Analýza metabolismu rostlin**

Rostliny z prvního experimentu byly analyzovány z hlediska koncentrace proteinů, aktivit peroxidas, obsahu fenolických látek a aktivity šikimátdehydrogenasy. Aktivita peroxidas byla sledována spektrofotometricky jako závislost absorbance na čase. Z naměřených hodnot absorbance byla vybrána právě lineární část růstu absorbance odpovídající tvorbě příslušného produktu. Poté byla vypočítána změna absorbance za čas a výsledná aktivita byla vyjádřena buď 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 na čerstvou hmotnost (FW).

#### **5.3.1. Stanovení koncentrace proteinů**

Z naměřené kalibrační křivky byly odečteny hodnoty koncentrace proteinů v listech a kořenech rostlin a byly vyneseny do grafu č. 5. Průměrná zjištěná hodnota proteinů v kořenech byla  $0,23 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (kontrolní rostlina) a  $0,61 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (buspiron). V listech hodnoty odpovídaly  $0,40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (kontrolní rostlina) a  $0,55 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (buspiron). Vyšší množství proteinů v rostlinách kontaminovaných buspironem může souviset se zvýšenou biosyntézou proteinů zapojených do obranného systému rostlin.

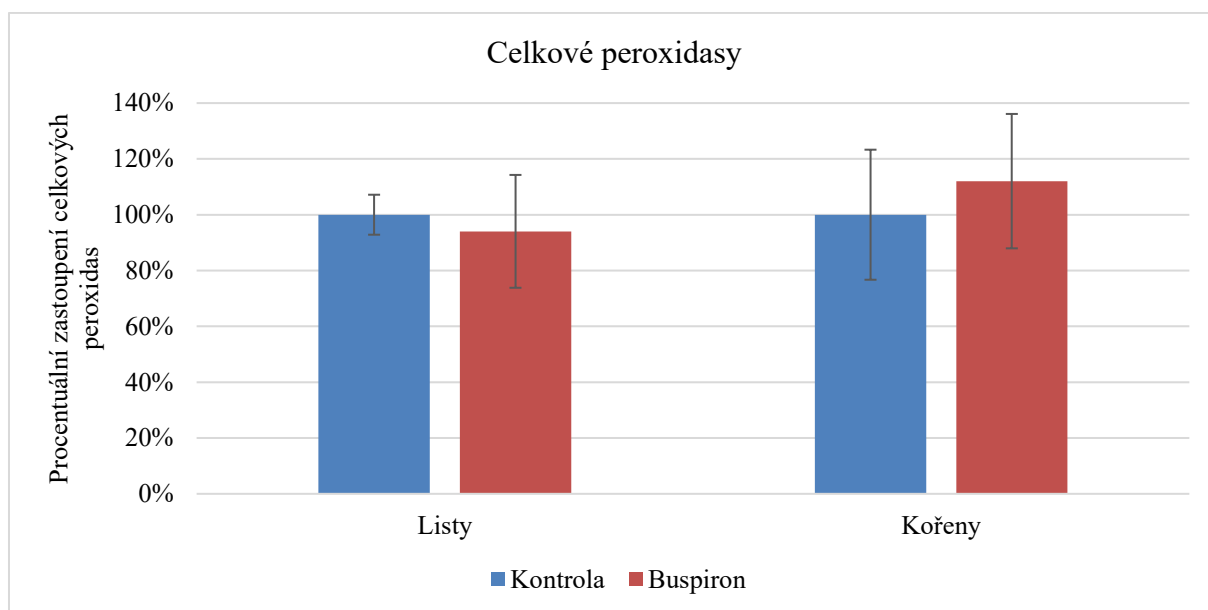
Graf č. 5: Množství proteinů dle Bradforda v listech a kořenech kontrolních rostlin a rostlin kontaminovaných buspironem.



### 5.3.2. Aktivita celkových volných peroxidas a membránově vázaných peroxidas

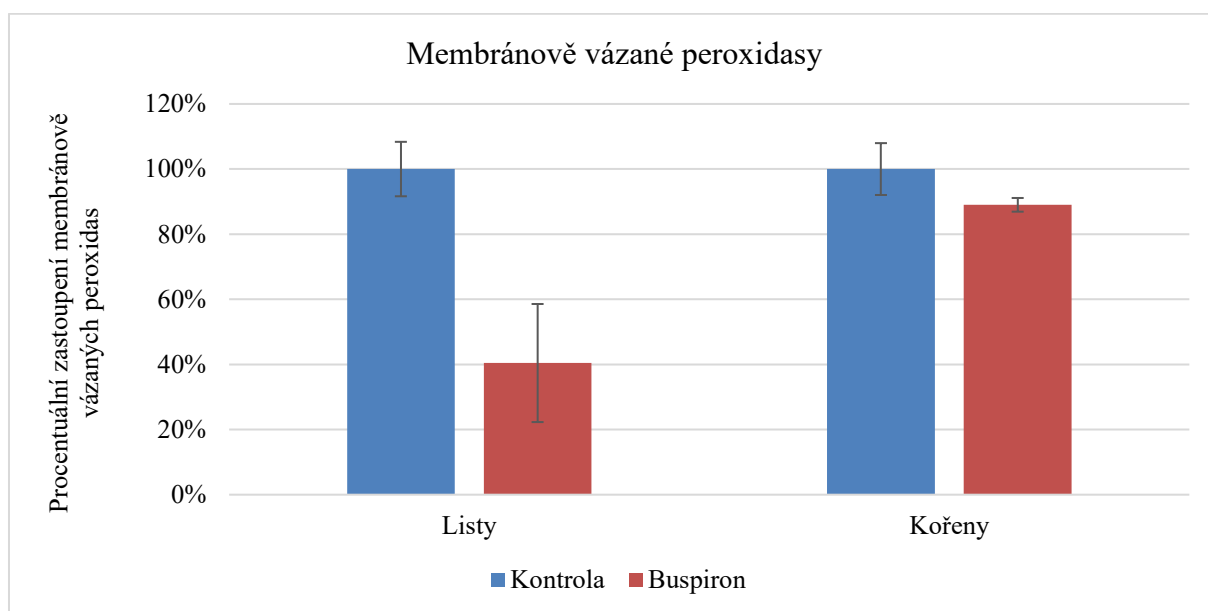
Podíl změny absorbance za změnu času kontrolních rostlin byl porovnán s rostlinami kontaminovanými buspironem tak, že byla vyjádřena aktivita kontrolních rostlin jako 100 %.

Graf č. 6: Procentuální zastoupení aktivity celkových volných peroxidas v listech a kořenech kontrolních rostlin a rostlin kontaminovaných buspironem.



V grafu č. 6 (strana 34) je viditelný vyšší obsah celkových volných peroxidas v kořenech rostlin kontaminovaných buspironem (112 %), ovšem tuto hodnotu doprovází poměrně velká směrodatná odchylka, která je způsobena rozmanitostí měřených vzorků, stejně jako u kořenů kontrolních rostlin a listů rostlin kontaminovaných buspironem, kde se procentuální obsah celkových volných peroxidas pohyboval v rozmezí 66 až 119 % a průměrnou hodnotou 94 %.

Graf č. 7: Procentuální zastoupení aktivity membránově vázaných peroxidas v listech a kořenech kontrolních rostlin a rostlin kontaminovaných buspironem.

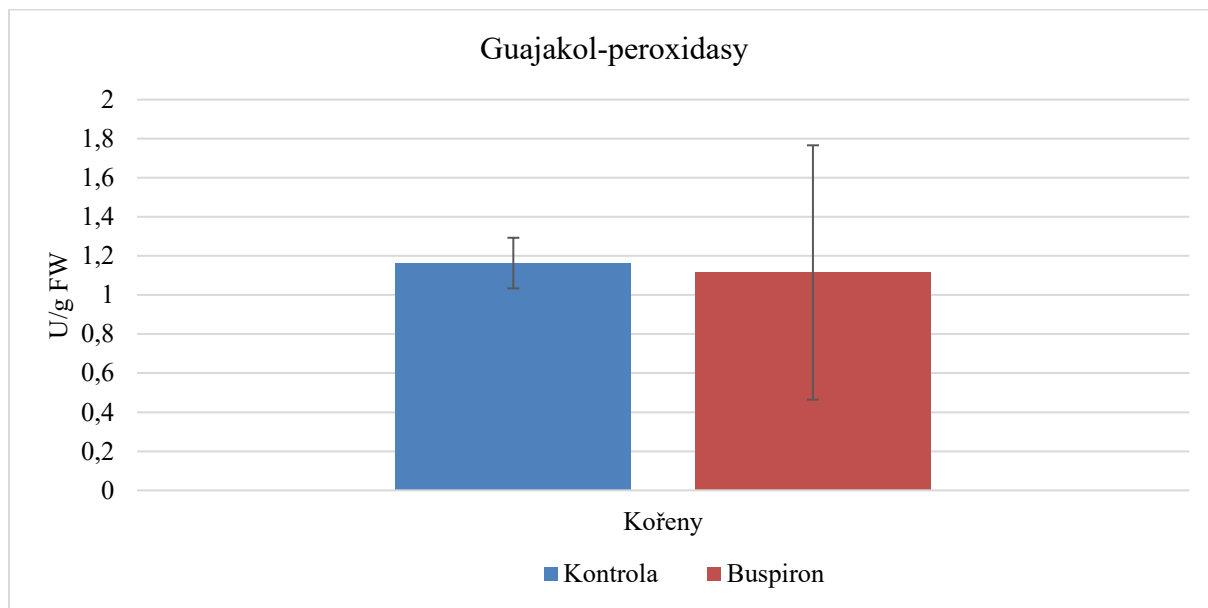


V případě membránově vázaných peroxidas (graf č. 7) byl zaznamenán významný pokles u listů rostlin kontaminovaných buspironem oproti kontrolním rostlinám. Průměrná hodnota membránově vázaných peroxidas zde odpovídala hodnotě 40 %. U kořenů takto podstatný rozdíl mezi posuzovanými vzorky zjištěn nebyl, procentuální zastoupení membránově vázaných peroxidas v rostlinách kontaminovaných buspironem odpovídala hodnotě 89 %.

### 5.3.3. Stanovení aktivity guajakol-peroxidasy a ABTS-peroxidasy

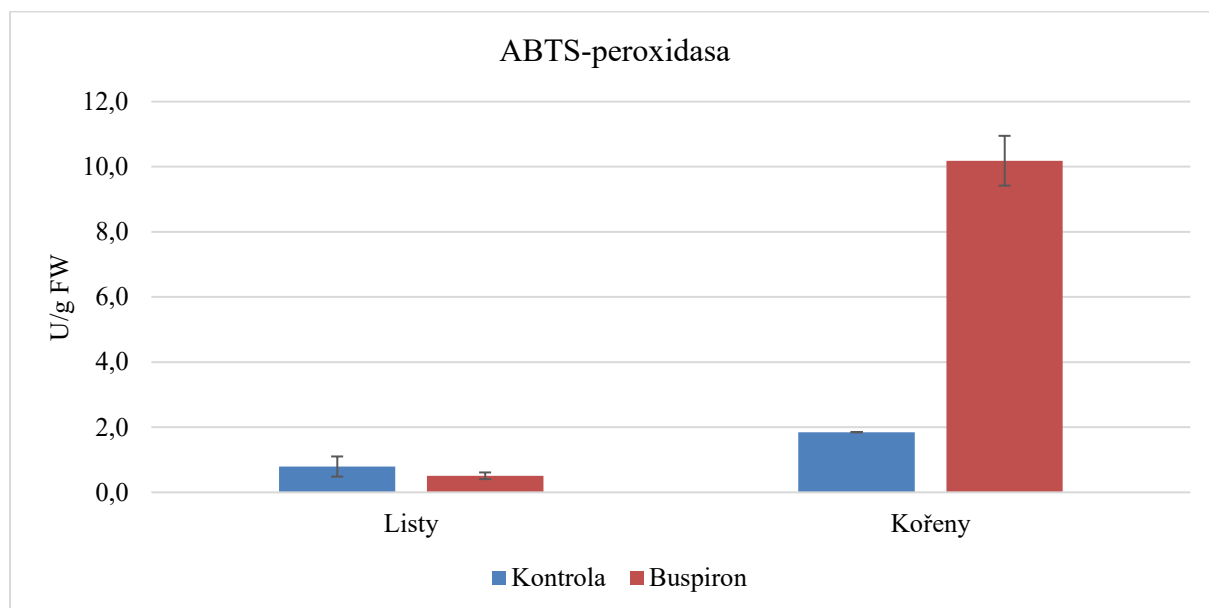
Aktivita guajakol-peroxidasy a ABTS-peroxidasy byla vztažena na gram čerstvé hmotnosti rostlin. Pro výpočet byly použity molární absorpční koeficienty  $26600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  pro guajakol-peroxidasy [22] a  $31100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  pro ABTS-peroxidasy [24].

Graf č. 8: Aktivita guajakol-peroxidasy v kořenech kontrolních rostlin a rostlin kontaminovaných buspironem. FW značí čerstvou hmotnost rostlin.



V grafu č. 8 byly vyneseny pouze naměřené hodnoty ve vzorcích kořenů, jelikož v listech nebyla aktivita guajakol-peroxidasy touto metodou detekována. Aktivita tohoto enzymu se v kořenech pohybovala v rozmezí 0,9–1,3 U/g FW (kontrolní rostliny) a u rostlin kontaminovaných buspironem 0,4–2,1 U/g FW. Průměrně tyto vzorky vykazovaly podobné hodnoty aktivity, nicméně rozpětí je značně rozsáhlejší u rostlin kontaminovaných buspironem.

Graf č. 9: Aktivita ABTS-peroxidasy v listech a kořenech kontrolních rostlin a rostlin kontaminovaných buspironem. FW značí čerstvou hmotnost rostlin.



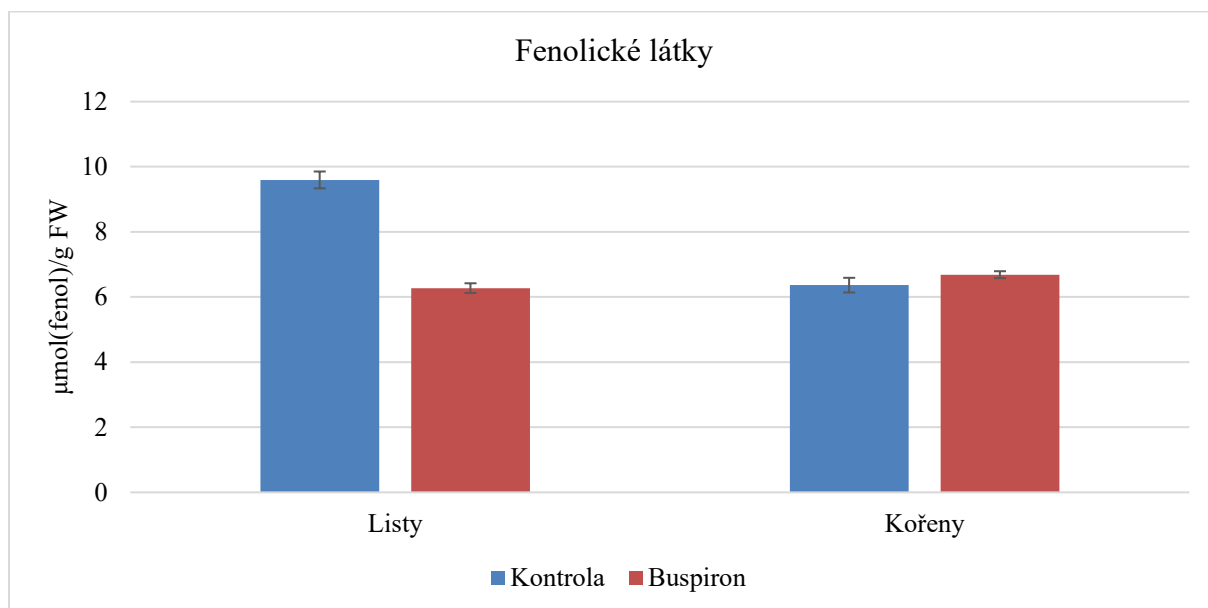
Nejvýznamnější hodnotou naměřenou při stanovení ABTS-peroxidasy byla hodnota aktivity v kořenech u rostlin kontaminovaných buspironem, jelikož dosahovala řádově přibližně 5x vyšších hodnot než u kontrolních rostlin. V listech nedosahovala aktivita vzorků vysokých hodnot, průměrně činila 0,8 U/g FW (kontrolní rostliny) a 0,5 U/g FW (rostliny kontaminované buspironem).

Přítomnost kontaminant může indukovat antioxidační systém rostlin. Peroxidas participují na eliminaci peroxidu vodíku, oxidaci různých látek, biosyntéze fytohormonu ethylénu, ale také na polymeraci fenolických látek vedoucích k tvorbě ligninu a suberinu. Zvýšená aktivita peroxidas může tedy zesílit buněčné stěny (tzv. lignifikace) a zhoršit dostupnost pro kontaminanty, ale také může znamenat větší zapojení v antioxidačním systému [27]. Vyšší aktivita peroxidas byla detekována v kořenech rostlin kontaminovaných buspironem v případě celkových volných peroxidas a skupiny peroxidas schopných oxidovat ABTS (graf č. 6 na straně 34 a graf č. 9).

#### 5.3.4. Stanovení fenolických látek

Z naměřené kalibrační křivky byly odečteny hodnoty stanovovaných vzorků a byly vyjádřeny látkovým množstvím ekvivalentů fenolu na gram čerstvé hmotnosti. Fenol byl vybrán jako standard zastupující fenolické látky.

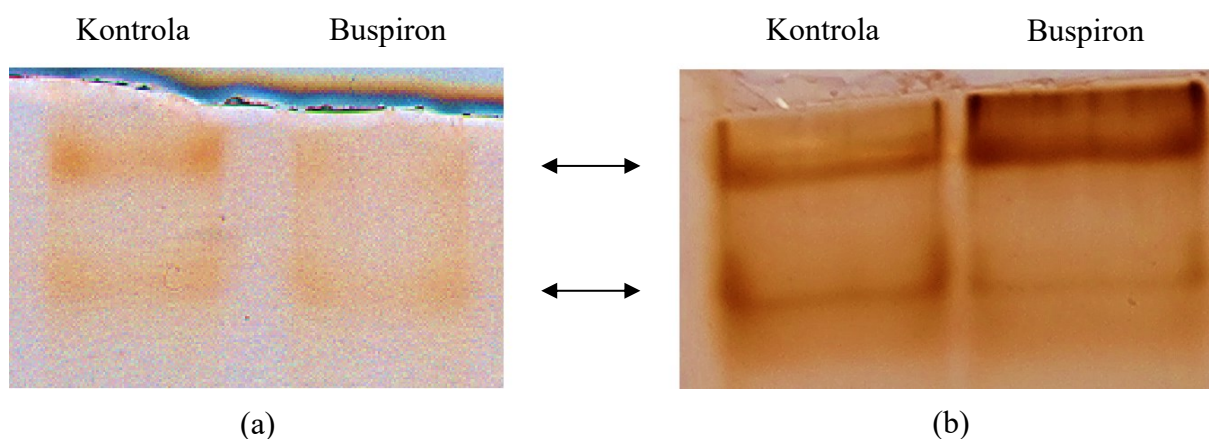
Graf č. 10: Molární zastoupení fenolických látek na gram čerstvé hmotnosti (FW) v listech a kořenech kontrolních rostlin a rostlin kontaminovaných buspironem.



Značný pokles fenolických látek oproti kontrole (9,6 µmol/g FW) můžeme pozorovat u listů rostlin kontaminovaných buspironem v médiu (6,3 µmol/g FW). V kořenech se rozdíl zastoupení fenolických látek ve vzorcích pohybuje v řádech desetin, v kontrolních rostlinách bylo naměřeno 6,4 µmol/g FW a v rostlinách kontaminované buspironem 6,9 µmol/g FW.

### 5.3.5. Detekce aktivity peroxidas po elektroforetické separaci

Po nativní elektroforetické separaci a detekci v příslušném inkubačním roztoku byly gely umístěny na fólie a skenovány pro následné vyhodnocení.

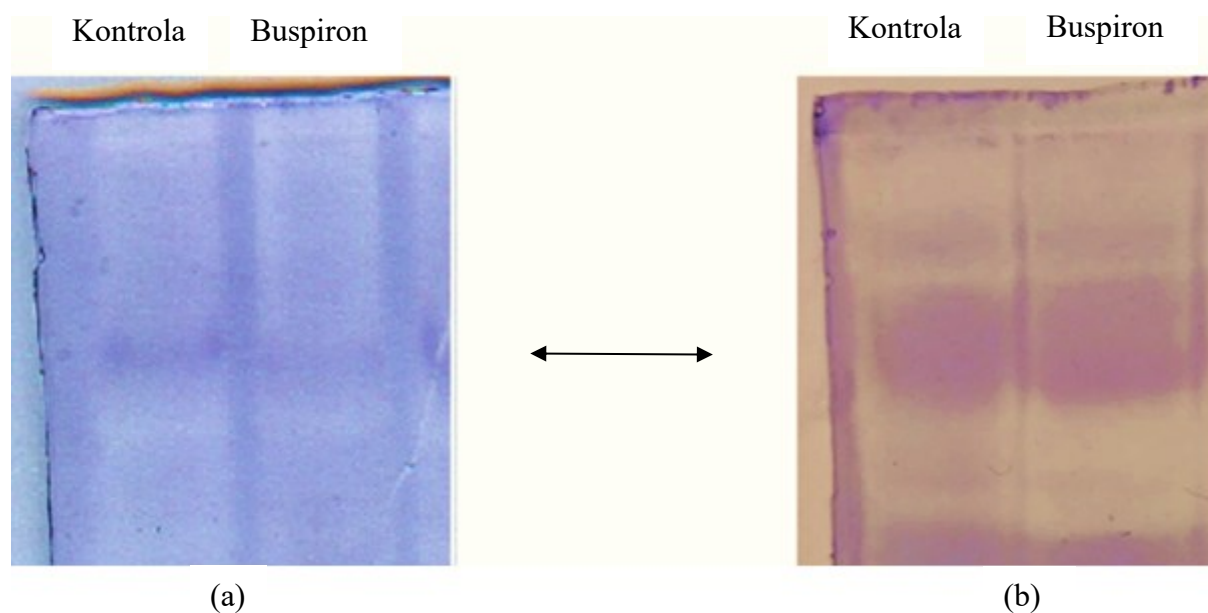


Obrázek č. 7: Detekce peroxidas v gelu po elektroforetické separaci extraktů z listů (a) a kořenů (b) kontrolních rostlin a rostlin kontaminovaných buspironem v médiu.

Peroxidasy, které byly detekovány v gelech po elektroforetické separaci, projevují podobný trend, jaký byl sledován při spektrofotometrickém stanovení aktivity celkových volných peroxidas (viz 4.7.1. a 5.3.1.), kde byl zjištěn ve vzorcích rostlin kontaminovaných bupironem mírný pokles celkových volných peroxidas v listech a nárůst celkových volných peroxidas v kořenech v porovnání s kontrolními rostlinami. Na obrázku č. 7 (a) (strana 38) můžeme vidět v oblasti vyznačené šipkami detekované isoformy peroxidas, které mají v extraktu z kontrolních rostlin vyšší intenzitu. Nicméně na obrázku č. 7 (b) (strana 38) jsou ve stejných místech peroxidasy s vyšší intenzitou detekovány u extraktu rostlin kontaminovaných bupironem. Tyto dvě zaznamenané skutečnosti korelují se stanovením aktivity celkových volných peroxidas (viz 4.7.1. a 5.3.1.). Vyšší aktivita peroxidas v kořenech může naznačovat možnost zvýšené lignifikace jejich buněčné stěny související s příjmem bupironu.

### 5.3.6. Detekce aktivity šikimátdehydrogenasy po elektroforetické separaci

Po nativní elektroforetické separaci a detekci v příslušném inkubačním roztoku byly gely umístěny na fólie a skenovány pro následné vyhodnocení.



Obrázek č. 8: Detekce šikimátdehydrogenasy v gelu po elektroforetické separaci extraktů z listů (a) a kořenů (b) kontrolních rostlin a rostlin kontaminovaných bupironem v médiu.

Na obrázku č. 8 jsou v horní třetině viditelná tmavší místa, která jsou označena šipkou a ukazují na detekovanou aktivitu šikimátdehydrogenasy. Intenzita těchto pruhů se značně odlišuje mezi listy (a) a kořeny (b), v kořenech je pravděpodobně aktivita

šikimátdehydrogenasy vyšší. Porovnáním kořenových vzorků kontrolních rostlin a rostlin kontaminovaných buspironem po detekci enzymu touto metodou nebyly zjištěny výrazné rozdíly. Nicméně listy kontrolní rostliny vyznačují výraznější aktivitu než listy rostlin kontaminovaných buspironem. V gelech jsou navíc patrná prázdná místa (bílé pruhy) značící zřejmě aktivitu jiného enzymu, nejspíše superoxiddismutasy.

Šikimátdehydrogenasa je jedním z klíčových enzymů šikimátové dráhy, a tedy i biosyntézy široké škály fenolických látek. Obsah fenolických látek byl mírně vyšší v kořenech rostlin kontaminovaných buspironem v médiu (graf č. 9), což by korelovalo s patrně mírně vyšší aktivitou šikimatdehydrogenasy v gelu (b). Některé fenolické látky jsou využívány pro již zmíněnou zvýšenou lignifikaci buněčné stěny, ke které patrně v kontaminovaných kořenech rostlin dochází [27].



## 6. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo studium fytoextrakce buspironu pomocí kukuřice seté (*Zea mays*) jako model dekontaminace buspironu z povrchových vod a půdních lokalit. Fytoextrakce se řadí mezi fytoimediační techniky, které k eliminaci kontaminantů z půdy používají kořenové systémy rostlin. Jedná se tak o snadno uskutečnitelnou schopnost rostlin, prostřednictvím které lze čistit životní prostředí.

Buspiron je léčivo řadící se mezi nebenzodiazepinová anxiolytika, používá se především k potlačení patologické úzkosti, obav, strachu a psychického napětí. Pro požadované výsledky léčby je potřeba ho užívat dlouhodobě. Z lidského těla se ve formě metabolitů dostává stolicí a močí do odpadních vod.

Fytoextrakční experimenty probíhaly v *in vitro* kulturách kukuřice seté (*Zea mays*) s počáteční koncentrací přidaného buspironu  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  a  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  na celkem 12 kultivacích. Byl zjištěn záchyt buspironu kořenovým systémem rostlin za daných experimentálních podmínek z 65 % pro vyšší koncentraci a dobu experimentu 96 hodin a z 53 % pro koncentraci dvakrát nižší a s dobou experimentu 144 hodin. V přepočtu na 1 g čerstvé hmotnosti rostliny pro fytoextrakční čas 96 hodin se ukázalo, že rostliny pojmuly přímo úměrně stejné množství látky vzhledem k počáteční koncentraci (0,06 mg/1 g FW pro  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  a 0,03 mg/1 g FW pro  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Fytoextrakční účinnost za 144 hodin druhého experimentu byla průměrně 0,05 mg buspironu na 1 gram čerstvé hmotnosti rostliny.

Během enzymových stanovení byly zjištěny následující výrazné odlišnosti mezi kontrolními rostlinami a rostlinami kontaminovanými buspironem v médiu: nárůst celkových volných peroxidas v kořenech o 12 %, pokles membránově vázaných peroxidas v listech o 60 % a úplná absence aktivity guajakol-peroxidasy v listech. Po nativní elektroforetické separaci byly detekovány aktivity celkových peroxidas a šikimátdehydrogenasy. Nárůst aktivit peroxidas v kořenech rostlin kontaminovaných buspironem patrně souvisí se zvýšenou lignifikací neboli zpevněním buněčné stěny kořenů, která může zhoršit prostupnost kontaminantu do kořenového systému. Mírně vyšší aktivita šikimátdehydrogenasy v kořenech jako jednoho z klíčových enzymů pro biosyntézu fenolických látek může souviset s produkcí těchto látek a jejich následným zapojením do lignifikace.

Přestože je domnělý výskyt buspironu, a i jiných kontaminantů v životním prostředí pravděpodobně mnohem nižší, avšak nikoli zanedbatelný, jeví se postup fytoextrakce vhodným pro jejich odstranění. Zároveň je tato metoda dostatečně šetrná k přírodě a také finančně výhodná.

## 7. Literatura

- [1] Vaněk, T.; Soudek, P.; Podlipná, R.; Petrová, Š.; Landa, P. *Fytoremediace a možnosti její aplikace*, Vydání 1.; Středisko společných činností AV ČR, v.v.i.; Ústav experimentální botaniky (Akademie věd ČR); Vol. **2017**.
- [2] Kožíšek, F.; Pumann, P. Léčiva v Pitné Vodě a Vliv Médii (Drugs in Drinking Water and the Impact of the Media). *Envigogika* **2013**, 8, 1–14.  
<https://doi.org/10.14712/18023061.388>.
- [3] Duarte, A.; Amorim, M. T. Photocatalytic Treatment Techniques Using Titanium Dioxide Nanoparticles for Antibiotic Removal from Water; **2017**.  
<https://doi.org/10.5772/intechopen.69140>.
- [4] *BUSPIRON-EGIS, 5MG TBL NOB 60, Státní ústav pro kontrolu léčiv*.  
<https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0066131&tab=texts> (accessed 2022-05-15).
- [5] Susarla, S.; Medina, V. F.; McCutcheon, S. C. Phytoremediation: An Ecological Solution to Organic Chemical Contamination. *Ecol. Eng.* **2002**, 18 (5), 647–658.  
[https://doi.org/10.1016/S0925-8574\(02\)00026-5](https://doi.org/10.1016/S0925-8574(02)00026-5).
- [6] Mohr, P.; Kopeček, M.; Brunovský, M.; Páleníček, T. *Klinická psychofarmakologie*, Maxdorf s.r.o.; **2017**.
- [7] *Hodnocení distribuovaných léčivých přípravků za rok 2019, Státní ústav pro kontrolu léčiv*. <https://www.sukl.cz/hodnoceni-distribuvanych-lecivych-pripravku-za-rok-2019> (accessed 2022-07-19).
- [8] *Hodnocení dodávek distribuovaných léčivých přípravků za rok 2011, Státní ústav pro kontrolu léčiv*. <https://www.sukl.cz/hodnoceni-dodavek-distribuvanych-lecivych-pripravku-za-rok-1> (accessed 2022-07-19).
- [9] *Buspirone HCl | ≥99%(HPLC) | Selleck | 5-HT Receptor agonist*. [selleckchem.com](https://www.selleckchem.com/products/buspirone-hcl.html).  
<https://www.selleckchem.com/products/buspirone-hcl.html> (accessed 2022-07-13).
- [10] Gammans, R. E.; Mayol, R. F.; Labudde, J. A. Metabolism and Disposition of Buspirone. *Am. J. Med.* **1986**, 80 (3, Supplement 2), 41–51.  
[https://doi.org/10.1016/0002-9343\(86\)90331-1](https://doi.org/10.1016/0002-9343(86)90331-1).
- [11] Myrna E. Watanabe. Phytoremediation on the Brink of Commercialization. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, 31 (4), 182A–186A. <https://doi.org/10.1021/es972219s>.
- [12] Vidali, M. Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.* **2001**, 73 (7), 1163–1172.  
<https://doi.org/10.1351/pac200173071163>.

- [13] Rigoletto, M.; Calza, P.; Gaggero, E.; Malandrino, M.; Fabbri, D. Bioremediation Methods for the Recovery of Lead-Contaminated Soils: A Review. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 3528. <https://doi.org/10.3390/app10103528>.
- [14] Sharma, P.; Pandey, S. Status of Phytoremediation in World Scenario. *Int. J. Environ. Bioremediation Biodegrad.* **2014**, *2* (4), 178–191. <https://doi.org/10.12691/ijebb-2-4-5>.
- [15] Reichenauer, T. G.; Germida, J. J. Phytoremediation of Organic Contaminants in Soil and Groundwater. *ChemSusChem* **2008**, *1* (8–9), 708–717. <https://doi.org/10.1002/cssc.200800125>.
- [16] Miège, C.; Choubert, J. M.; Ribeiro, L.; Eusèbe, M.; Coquery, M. Fate of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Wastewater Treatment Plants – Conception of a Database and First Results. *Environ. Pollut.* **2009**, *157* (5), 1721–1726. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.045>.
- [17] Sojka, J. *Malé čistírny odpadních vod*; ERA: Brno, 2004.
- [18] Bartwal, A.; Mall, R.; Lohani, P.; Guru, S. K.; Arora, S. Role of Secondary Metabolites and Brassinosteroids in Plant Defense Against Environmental Stresses. *J. Plant Growth Regul.* **2013**, *32* (1), 216–232. <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9272-x>.
- [19] Murashige, T.; Skoog, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* **1962**, *15* (3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- [20] Spoustová, P.; Hýšková, V.; Müller, K.; Schnablová, R.; Ryšlavá, H.; Čerovská, N.; Malbeck, J.; Cvikrová, M.; Synková, H. Tobacco Susceptibility to Potato Virus YNTN Infection Is Affected by Grafting and Endogenous Cytokinin Content. *Plant Sci.* **2015**, *235*, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.02.017>.
- [21] Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72* (1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [22] Jebara, S.; Jebara, M.; Limam, F.; Aouani, M. E. Changes in Ascorbate Peroxidase, Catalase, Guaiacol Peroxidase and Superoxide Dismutase Activities in Common Bean (*Phaseolus Vulgaris*) Nodules under Salt Stress. *J. Plant Physiol.* **2005**, *162* (8), 929–936. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.10.005>.
- [23] Jiang, S.; Penner, M. H. Selective Oxidation of Enzyme Extracts for Improved Quantification of Peroxidase Activity. *Anal. Biochem.* **2015**, *476*, 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.01.017>.

- [24] Hiner, A.; Rodríguez-López, J.; Arnao, M.; Raven, E.; Canovas, G.; Acosta, M. Kinetic Study of the Inactivation of Ascorbate Peroxidase by Hydrogen Peroxide. *Biochem. J.* **2000**, *348 Pt 2*, 321–328. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3480321>.
- [25] Tupec, M.; Hýsková, V.; Bělonožníková, K.; Hraníček, J.; Červený, V.; Ryšlavá, H. Characterization of Some Potential Medicinal Plants from Central Europe by Their Antioxidant Capacity and the Presence of Metal Elements. *Food Biosci.* **2017**, *20*, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.08.001>.
- [26] Diaz, J.; Merino, F. Shikimate Dehydrogenase from Pepper (*Capsicum Annuum*) Seedlings. Purification and Properties. *Physiol. Plant.* **1997**, *100* (1), 147–152. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03465.x>.
- [27] Ryšlavá, H.; Pomeislová, A.; Pšondrová, Š.; Hýsková, V.; Smrček, S. Phytoremediation of Carbamazepine and Its Metabolite 10,11-Epoxycarbamazepine by C3 and C4 Plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22* (24), 20271–20282. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5190-3>.