Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Medicinální chemie

Zuzana Doležalová

Fytoremediace triazolů

Phytoremediation of triazoles

Bakalářská práce

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

Praha, 2024

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

Bakalářská práce se věnuje fytoextrakci triazolů, anastrozolu a letrozolu, které se řadí mezi nesteroidní inhibitory aromatas třetí generace. Jednotlivé fytoextrakční experimenty byly provedeny na rostlinách kukuřice seté (*Zea mays* L.) kultivované ve sterilním médiu. V obou experimentech byla zjištěna fytoextrakční účinnost v odebraných vzorcích pomocí HPLC s UV detektorem při vlnové délce 215 nm. Účinnost fytoextrakce anastrozolu byla 0,067 mg na 1 gram čerstvé hmotnosti (FW). Fytoextrakční účinnost rostlin pro letrozol byla 0,082 mg/g(FW). Při stanovení extrahovatelných reziduí z rostlin byly naměřeny vyšší koncentrace léčiva v kořenech kontaminovaných rostlin. Nejvyšší koncentrace byla stanovena v kořenech rostlin kontaminovaných letrozolem na 0,0034 mg/g(FW).

Dále byla provedena biochemická analýza rostlin, bylo stanoveno množství proteinů metodou dle Bradforda, kde došlo k poklesu obsahu proteinů v listech rostlin kultivovaných s léčivy. Aktivita celkových volných a membránově vázaných peroxidas byla ve většině případů zvýšena oproti kontrolní skupině, nejvyšší navýšení bylo pozorováno při stanovení membránově vázaných peroxidas v kořenech rostlin kultivovaných v prostředí anastrozolu. K navýšení aktivity došlo i při stanovení ABTS-peroxidas v kontaminovaných rostlinách. Dále byla stanovena aktivita guajakolperoxidasy. Vliv přítomnosti farmak se projevil zvýšením aktivit a změnou počtu jednotlivých izoforem peroxidas a glutathion-S-tranferasy po nativní elektroforetické separaci. Nejvíce izoforem glutathion-S-transferasy bylo detekováno v kořenech rostlin kultivovaných v prostředí anastrozolu.

Klíčová slova: fytoremediace, fytoextrakce, rostlinné enzymy, extrahovatelná rezidua, polutanty životního prostředí

Abstract

This bachelor thesis is devoted to the phytoextraction of triazoles, anastrozole and letrozole, which are classified as third-generation non-steroidal aromatase inhibitors. Individual phytoextraction experiments were performed on maize (*Zea mays*) plants cultured in the sterile medium. In both experiments, the phytoextraction efficiency in the extracted samples was determined by HPLC with a UV detector at a wavelength of 215 nm. The phytoextraction efficiency of anastrozole was 0,067 mg per 1 gram of fresh weight (FW). The phytoextraction efficiency of plants for letrozole was 0,082 mg/g(FW). In the determination of extractable residues from plants, higher concentrations of the pharmaceutical were measured in the roots of contaminated plants. The highest concentration was determined in the roots of letrozole-contaminated plants at 0,0034 mg/g(FW).

Biochemical analysis of the plants was also done, the amount of proteins was measured by the Bradford method, where there was a decrease in protein content in the leaves of plants cultivated with the drugs. The activity of total and membrane-bound peroxides was increased in most cases compared to the control group, the highest increase was observed in the determination of membrane-bound peroxides in the roots of plants cultured in anastrozole medium. An increase in activity was also observed in the determination of ABTS-peroxidase in contaminated plants. The activity of guaiacol peroxidase was also measured. The effect of the presence of the pharmaceutical showed an increase in activity and a change in the number of individual isoforms of peroxidases and glutathione-S-transferase after native electrophoretic separation. Most isoforms of glutathione-S-transferase were detected in the roots of plants cultured in anastrozole medium.

Key words: phytoremediation, phytoextraction, plant enzymes, extractable residues, pollutants of ecosystems

Poděkování

Ráda bych vyjádřila své poděkování mému školiteli, doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc., za jeho ochotu a pomoc při vedení mé bakalářské práce. Také děkuji RNDr. Kateřině Bělonožníkové, Ph.D., za cenné rady a konzultace během psaní práce. Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině za jejich neustálou podporu během celého mého studia.

Obsah

POUŽITÉ ZKRATKY ... **8**

1 ÚVOD ... **10**

2 CÍLE PRÁCE ... **11**

4 TEORETICKÁ ČÁST ... **12**

4.1 Znečištění životního prostředí xenobiotiky ... 12

4.1.1 Přítomnost farmak v životním prostředí ... *13*

4.2 Fytoremediace ... 14

4.2.1 Typy fytoremediačních metod ... *15*

4.3 Inhibitory aromatas ... 17

4.3.2 Enzym aromatasa ... *18*

4.3.3 Nesteroidní inhibitory aromatas ... *19*

4.4 Anastrozol ... 19

4.5 Letrozol ... 20

4.6 Reakce rostlin na xenobiotika ... 21

4.6.1 Antioxidační systém rostlin ... *22*

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST ... **25**

5.1 Chemikálie ... 25

5.2 Přístroje ... 26

5.3 Rostlinný materiál ... 26

5.4 Další materiál ... 27

5.5 Příprava sterilní vody ... 27

5.6 Příprava Erlenmayerových baněk s kultivačním médiem ... 27

5.7 Přidání farmak a odběr vzorků ... 27

5.8 Odběr vzorků ... 28

5.9 Ukončení kultivace ... 28

5.10 Stanovení extrahovatelných reziduí ... 28

5.10.1 Příprava rostlinných extraktů ... *29*

5.11 HPLC analýza ... 29

5.12 Biochemická analýza metabolismu rostlin ... 30

5.12.1 Příprava rostlinných extraktů pro stanovení enzymové aktivity ... *30*

5.12.2 Stanovení aktivity celkových volných a membránově vázaných peroxidas ... *30*

5.12.3 Stanovení aktivity guajakolperoxidasy ... *30*

5.12.4 Stanovení aktivity ABTS-peroxidas ... *31*

5.12.5 Stanovení množství bílkovin dle Bradforda ... *31*

5.13 NATIVNÍ ELEKTROFORÉZA 31
5.13.1 Příprava gelů pro elektroforézu 31
5.13.2 Příprava rostlinných extraktů a průběh elektroforézy 32
5.13.3 Detekce aktivity peroxidas v gelu 32
5.13.4 Detekce aktivity glutathion-S-tranferasy v gelu 32
6 VÝSLEDKY A DISKUZE 33
6.1 KALIBRACE HPLC 33
6.2 ÚČINNOST FYTOEXTRAKČNÍCH POKUSŮ 33
6.2.1 Fytoextrakce anastrozolu 33
6.2.2 Fytoextrakce letrozolu 34
6.2.3 Porovnání jednotlivých experimentů 35
6.3 EXTRAKCE REZIDUÍ Z ROSTLIN 36
6.4 VÝSLEDKY BIOCHEMICKÉ ANALÝZY ROSTLIN 36
6.4.1 Stanovení obsahu proteinů dle Bradforda 36
6.4.2 Stanovení aktivity celkových volných peroxidas 38
6.4.3 Stanovení aktivity membránově vázaných peroxidas 39
6.4.4 Stanovení aktivity ABTS-peroxidas 41
6.4.5 Stanovení aktivity guajakolperoxidasy 42
6.4.6 Detekce aktivity peroxidas v gelu 43
6.4.7 Detekce glutathion-S-transferasy v gelu 46
ZÁVĚR 51
LITERATURA 52

Použité zkratky

ABTS	2,2‘-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)
AI	inhibitory aromatas
APX	askorbátperoxidasa
AsA	kyselina askorbová
BSA	hovězí sérový albumin
CAT	katalasa
COX	cyklooxygenasa
ČOV	čistírna odpadních vod
DAB	3,3´-diamidobenzidin
DDT	1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan
DHA	dihydroxyaceton
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FW	čerstvá hmotnost
GABA	kyselina γ-amino máselná
GPx	glutathionperoxidasa
GuPX	guajakolperoxidasa
GSH	glutathion
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MTBE	methyl-tercbutyl ether
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NBT	nitroblue tetrazolium chlorid
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCB	polychlorované bifenyly
PMS	fenazin methosulfát
PPCPs	farmaka a produkty osobní péče
PVP	polyvinylpolypyrrolidon
RMP	počet otáček za minutu
ROS	reaktivní formy kyslíku

SOD	superoxiddismutasa
TEMED	*N,N,N´,N´*- tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultrafialové záření

1 Úvod

V době průmyslové revoluce a rozvoje měst se globální kontaminace životního prostředí směsí xenobiotik stala významnou hrozbou. Xenobiotické látky negativně ovlivňují ekosystémy svou dlouhodobou přítomností a pomalou nebo zanedbatelnou biodegradací. Jakmile se dostanou do životního prostředí, pronikají do potravního řetězce a způsobují škody na různých úrovních, což má negativní dopad na zdraví lidí a zvířat. Tyto látky mohou být teratogenní, karcinogenní, mutagenní a toxické pro všechny organismy.[6] Látky znečišťující životní prostředí způsobují každoročně na celém světě více než 13 milionů úmrtí.[25] V posledních desetiletích se bioremediace stala nejúčinnější, ekologicky šetrnou a nákladově efektivní metodou pro odstraňování těchto škodlivých látek.[6]

2 Cíle práce

V rámci bakalářského projektu zahrnujícího studium fytoextrakce a environmentálního dopadu onkologických léčiv anastrozolu a letrozolu jako inhibitorů aromatázy byly vytyčeny následující cíle.

1) Příprava sterilních hydroponických kultur *Zea mays* L. v dostatečném množství a kvalitě
2) Inkubace hydroponických kultur s letrozolem a anastrozolem v koncentraci 5mg/L, stanovení úbytku anastrozolu a letrozolu v kultivačním mediu v časových intervalech po dobu životnosti kultury.
3) Bezodběrová inkubace rostlin se zkoumanými látkami za účelem stanovení extrahovatelných reziduí a biochemických analýz.
4) HPLC analýzy časových odběrů, nalezení specifických podmínek analýzy vhodných pro kvantifikaci studovaných látek v komplexní matrici média.
5) Zpracování výsledků analýz časových odběrů, diskuse výsledků.
6) Stanovení extrahovatelných reziduí v rostlinách (homogenizace, extrakce, HPLC analýza, vyhodnocení).
7) Biochemická analýza vybraných parametrů rostlinného metabolismu jako možná stresová odpověď na kultivaci v přítomnosti xenobiotika (stanovení aktivit vybraných antioxidačních a biotransformačních enzymů).

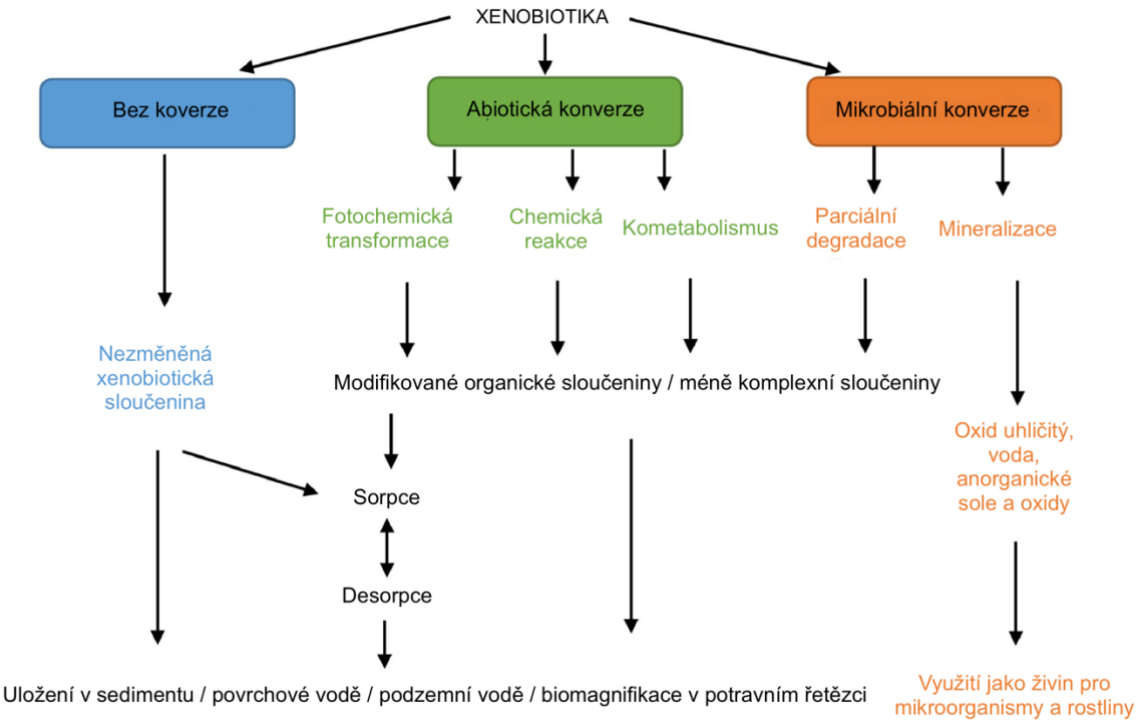
4 Teoretická část

4.1 Znečištění životního prostředí xenobiotiky

Termín xenobiotika je odvozen z řeckých slov xenos (cizí) a bios (život), což označuje cizorodé látky v živých organismech.[23] Znečišťujícími látkami jsou anorganické i organické sloučeniny (těžké kovy, radionuklidy, dusičnany, fosforečnany, anorganické kyseliny a organické chemikálie) pocházející ze zdrojů včetně odpadních materiálů, výbušnin, pesticidů, hnojiv a léčiv. [13] Xenobiotika se obtížně odbourávají kvůli jejich složité fyzikálně-chemické struktuře, jako je malá molekulová velikost, ionizovatelnost, rozpustnost ve vodě, lipofilita, polarita a těkavost, což ztěžuje jejich identifikaci, kvantifikaci a odstranění.[25] Jejich částečná degradace může vyústit v ještě horší hrozby. [23]

Xenobiotika jsou rozšířena v různých prostředích, včetně vzduchu, půdy, vody, rostlin, zvířat a lidí, a zahrnují pesticidy, farmaceutické sloučeniny, produkty osobní péče, nelegální drogy, průmyslové látky a jaderný odpad. Do životního prostředí se xenobiotika dostávají různými antropogenními činnostmi, jako jsou lidská spotřeba a vylučování, čistírny odpadních vod a kanalizace, zpracování a vylučování hospodářských zvířat, průmysl a výrobní závody a zemědělské postupy. Například pesticidy jsou aplikovány přímo do půdy a jsou následně rozneseny deštěm do řek a podzemních vod.[23] Kosmetika a PPCP také přispívají jako xenobiotické polutanty, zejména parabeny v půdě a ovzduší a azoly v půdě, a to díky jednomu nebo více aromatickým kruhům a azovazbám.[6]

Některé z těchto látek mají teratogenní, karcinogenní, mutagenní a toxické účinky na všechny organismy, některá xenobiotika, jako jsou dioxiny, DDT, PCB, atd., představují hlavní hrozbu pro půdní ekosystémy vyspělých zemí. Faktory prostředí, jako je teplota, pH a vlhkost půdy, významně ovlivňují chování perzistentních organických látek (POPs) v půdě. Jednou z možných strategií je vázání xenobiotických sloučenin na půdní organickou hmotu (SOM).[6]



Obrázek 1: Potenciální transformační procesy xenobiotik ve vodním prostředí, převzato a přeloženo do češtiny.[27]

4.1.1 Přítomnost farmak v životním prostředí

Přítomnost farmak ve vodě jako polutantů stále více nabývá na důležitosti. V povrchových vodách můžeme nalézt antibiotika, estrogeny, steroidy, protizánětlivé látky a mnohá další farmaka včetně jejich metabolitů. Komunální odpadní vody jsou spolu s odpadními vodami z nemocnic a z výroby největším zdrojem léčiv jako polutantů. Veterinární léčiva se dostávají do vodního prostředí povrchovou aplikací, stékáním nebo přímou aplikací.[23] Právě odpadní vody z nemocničních zařízení mohou obsahovat velmi nebezpečné a toxické látky, jako mikrobiologické patogeny, alkylační látky nebo radioaktivní izotopy. [10] Nesprávná likvidace nepoužitých léčiv může rovněž vést k jejich uvolňování do životního prostředí.[11]

Lidé, jako pacienti, jsou primárním zdrojem farmak v životním prostředí.[15] Léčiva se do odpadních vod dostávají močí a stolicí, buď to v nezměněné formě nebo jako směs metabolitů vyloučených lidských organismem.[10] Čistírny odpadních vod (ČOV) často nejsou dostatečně účinné při odstraňování xenobiotik z odpadních vod, což způsobuje, že se xenobiotika dostávají do povrchových vod a tím pádem i do potravinového řetězce. Ovlivňují tak organismy ve volné přírodě i lidskou populaci.[23] Ve srovnání s jinými chemickými sloučeninami mohou léky

především ovlivnit vodní flóru a faunu. Předpokládá se však, že léčiva způsobují pouze minimální riziko akutní environmentální toxicity.[6]

PPCP neboli Pharmaceuticals and Personal Care Products, tvoří specifickou kategorii znečišťujících látek, které se dostávají do toků odpadních vod po použití obyvatelstvem. Mezi ně patří léčiva, kosmetické výrobky, čisticí prostředky a další hygienické přípravky. Léčiva jsou zejména významná, protože obsahují biologicky aktivní látky, které se často podávají ústy, injekčně nebo na kůži. Tyto látky, které nejsou plně metabolizovány, ale pouze vylučovány či přeměňovány na různé toxické metabolity, jsou částečně zachyceny v čistírnách odpadních vod a rezidua se dostávají do vodních toků, půdy a podzemních vod, kde jsou absorbovány rostlinami a vodními organismy, čímž vstupují do potravního řetězce. Mezi nejčastěji vypouštěná PPCP patří analgetika jako diklofenak a ibuprofen, kyselina salicylová a hormonální látky z kontraceptiv.[25]

4.2 Fytoremediace

Pojem fytoremediace vychází latinského phyton (rostlina) a remedia (napravit).[15] Je to inovativní a ekologicky šetrná technologie, která využívá rostliny k odstraňování nebo redukci environmentálních kontaminantů v půdě, vodě nebo vzduchu. Fytoremediace využívá schopností rostlin absorbovat, transformovat nebo dokonce rozkládat škodlivé látky a tím pomáhá obnovovat znečištěné prostředí. Fytoremediace se stala stále více populární díky své efektivitě, nízkým nákladům a schopnosti pracovat v symbióze s mikroorganismy v kořenové oblasti rostlin.[18]

Klíčové enzymy, které se zapojují do fytoremediace jsou:

1. Nitrátreduktasy, které redukují toxické dusičnanové sloučenin na jiné formy, jako jsou dusitany nebo amoniak.
2. Peroxidasy, jejichž funkcí je rozklad organických znečišťujících látek (např. fenolů, pesticidů a PAH) katalýzou oxidačních reakcí.
3. Lakasy se podílejí na rozkladu ligninu a dalších složitých organických sloučenin.
4. Ureasy se podílejí na hydrolýze močoviny za vzniku amoniaku a oxidu uhličitého. Při fytoremediaci mohou rostliny produkující ureasu pomoci při imobilizaci těžkých kovů tím, že zvyšují pH rhizosféry a vytvářejí nerozpustné komplexy kovů.[18]

Možnosti využití fytoremediace jsou rozsáhlé a rozmanité. Lze ji využít k vyčištění kontaminovaných míst, jako jsou průmyslové oblasti, skládky, těžební lokality a zemědělská půda. Fytoremediace je také účinná při čištění odpadních vod, odstraňování těžkých kovů, organických znečišťujících látek a živin. Tuto ekologicky šetrnou technologii lze navíc použít v městských oblastech, mokřadech, a dokonce i ve spojení s dalšími sanačními technikami pro zvýšení celkové účinnosti.[13]

Hlavními výhodami této metody je její nenákladnost, z hlediska dlouhodobého užití může být levnější i efektivnější než tradiční eliminace kontaminantů. Jedná se o velmi ekologickou a udržitelnou metodu, která má minimální dopad na životní prostředí, je neinvazivní a nenarušuje ekosystém tolik jako mechanické metody. Fytoremediace se jeví jako všestranná, jelikož ji lze použít k odstranění těžkých kovů, organických polutantů, a dalších kontaminantů.[13]

Jednou z nevýhod je časová náročnost, samotná fytoremediace může probíhat až roky, pokud je velké množství nebo vysoká koncentrace kontaminantu. Dále je podstatné zmínit výběr rostlin, různé druhy jsou schopny akumulovat nebo popř. rozkládat různé látky. Také záleží, jaké jsou klimatické podmínky, aby rostlina prosperovala, jako pH půdy, teplota, živiny atd. Hrozí zde i potenciální riziko ve formě pozření rostliny, lidmi nebo zvířaty.[13]

4.2.1 Typy fytoremediačních metod

4.2.1.1 Fytoextrakce

Fytoextrakce, fytoabsorbce, nebo fytoakumulace jsou všechno označení pro proces fytoremediace, při kterém dochází k akumulaci kontaminantu v rostlině, ty jsou pak sklizeny a zpracovány.[15] Rostlina nejprve vstřebává látky přes kořeny a následně je zadržuje v nadzemní části.[14] Specifické skupiny rostlin (např. *Brassica, Thlaspi, Apocynum*), jenž jsou schopny akumulovat velké množství kovu, jsou nazývány hyperakumulátory, avšak tyto rostliny z velké míry nesplňují další podstatné podmínky jako je rychlý růst nebo velké množství tvořené biomasy, a proto je jejich využití v praxi obtížné. Fytoextrakcí se nejčastěji odstraňují anorganické látky, především kovy.[13]

4.2.1.2 Fytodegradace, rhizodegradace

Metodou fytodegradace rostlina přijme kontaminant a přeměňuje ho na netoxické látky, které mohou být snadněji rozloženy nebo uvolněny v kořenových exudátech.[13] Enzymy podílející se na degradaci jsou dehalogenasy, nitroreduktasy, peroxidasy, fenoloxidasa a nitrilasy. Kontaminanty, které podléhají fytodegradaci jsou organické polutanty. Fytodegradace může vést k vzniku toxických meziproduktů o neznámém složení, které znesnadňuje predikci jejich možného vlivu na životní prostředí.[15] Rhizodegradace je proces, při kterém dochází k degradaci kontaminantů v rhizosféře. [13]

4.2.1.3 Fytostabilizace

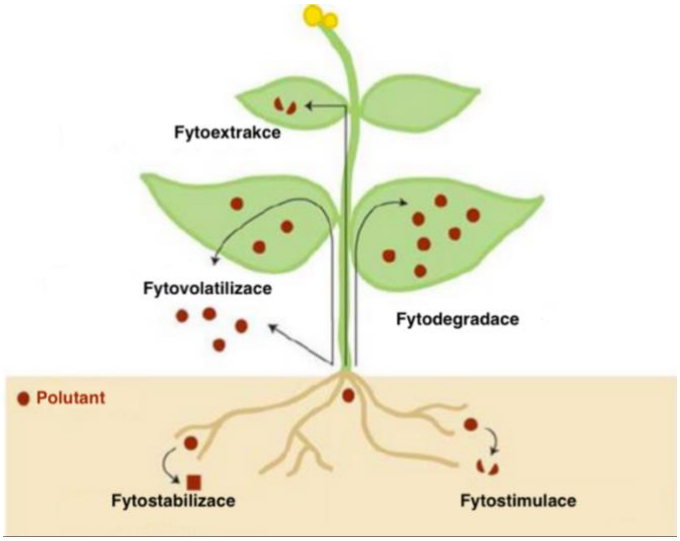
Fytostabilizací se eliminuje dostupnost toxických kovů v půdě vytvořením komplexu kovu s některými rostlinami. Nedochází k odstranění kontaminantu z půdy, pouze k snížení jeho nebezpečnosti převedením do inertního stavu.[13] Jelikož je kontaminant zadržován v rostlině, je žádoucí zabránit jeho uvolnění zpět do půdy.[15] Mezi rostliny schopné fytostabilizace patří freatofytické stromy nebo trávy s vláknitými kořeny.[14]

4.2.1.4 Rhizofiltrace

Pro rhizofiltraci je důležitý kořenový systém rostliny, který odstraňuje kontaminanty. Využívají se hydroponicky pěstované rostliny, jejichž kořeny absorbují nežádoucí látky přítomné ve vodě.[15] Po absorpci či adsorpci kontaminantu může docházet k jeho záchytu, biotransformaci nebo i volatilizaci.[13] Prakticky je rhizofiltrace používána v Černobylu, kde jsou díky ní odstraňovány izotopy kovů z povrchové vody. [14]

4.2.1.5 Fytovolatilizace

Kontroverzní metoda, při níž rostlina přijme kontaminant z půdy a uvolní jej do ovzduší. Kontaminant je rostlinou přeměňován na těkavou látku, která je průduchy odpařována do ovzduší.[15] Dochází k odstraňování hlavně organických polutantů jako je MTBE, nebo různých kovů (Hg, Se). [14]



Obrázek 2: Typy fytoremediace, převzato a přeloženo do češtiny.[34]

4.3 Inhibitory aromatas

Inhibitory aromatas (AI) patří mezi skupinu léčiv, které mají schopnost blokovat aktivitu enzymů zvaných aromatasy, jejichž hlavní funkcí je syntéza ženského pohlavního hormonu, estrogenu.[1] Podle jejich struktury a biochemického účinku je můžeme rozdělit do dvou skupin, a to na steroidní (inhibitory typu I) a nesteroidní (inhibitory typu II).[3] Nesteroidní inhibitory aromatas se dále dělí na dvě skupiny, deriváty triazolů a deriváty aminoglutethimidu. Steroidními inhibitory aromatas jsou deriváty androstendionu, který je hlavním substrátem enzymu aromatasy.[5] V současnosti používanými AI jsou nesteroidní anastrozol a letrozol a steroidní exemestan. [6]

Rozdělení podle biochemického účinku označuje kategorizaci na základě místa, na které se inhibitory aromatasy vážou na enzym. Nesteroidní AI nekovalentně interagují s hemovou částí aromatasy, a tím obsazují její vazebné místo pro substrát, čímž zabraňují vazbě androgenů na katalytické místo. Tento antagonismus je reverzibilní a mohou být kompetitivně vytlačeny z aktivního místa endogenním substrátem. Steroidní AI jsou analogické přirozeným substrátům aromatasy androstendionu, jsou rozpoznávány aktivním místem aromatasy jako alternativní substrát. Na rozdíl od nesteroidních AI se ireverzibilně a inaktivují tak enzym trvale. [3]

4.3.1.1 Inhibitory aromatas první generace

Dalším možným dělením AI je dle jejich vývoje na inhibitory první, druhé a třetí generace. Prvním používaným inhibitorem aromatas byl aminoglutethimid, koncem 60. a průběhu 70. let

minulého století bylo zjištěno, že kombinace aminoglutethimidu s kortikosteroidy je účinná proti karcinomu prsu jak navozením lékařské adrenalektomie, tak inhibicí aromatasy. Léčba aminoglutethimidem byla doprovázena řadou nežádoucích účinků. [12]

4.3.1.2 Inhibitory aromatas druhé generace

Inhibitory druhé generace nebyly tolik prozkoumány, jelikož je velmi rychle nahradila třetí generace AI. Hlavními zástupci jsou steroidní formestan a nesteroidní fadrozol, kteří vyvolávají méně vedlejších účinků a jsou až 700x účinnější než AI první generace.[12]

4.3.1.3 Inhibitory aromatas třetí generace

Inhibitory třetí generace, nesteroidní anastrozol a letrozol a steroidní exemestan, jsou ve srovnání se svými předchůdci vysoce selektivní ve způsobu inhibice aromatasy a mají minimální škodlivé účinky na ostatní vzájemně propojené steroidní dráhy. [12] Inhibitory aromatas třetí generace bývají používány a doporučovány k léčbě karcinomu prsu u postmenopauzálních žen s pozitivními hormonálními receptory. [8] Tyto látky inhibují aromatasy s úspešností až 98 %. [9]

4.3.2 Enzym aromatasa

Aromatasa patřící do rodiny cytochromů, konkrétně se jedná o cytochrom P450, katalyzuje demethylaci uhlíku C19, čímž dochází k aromatizaci na estrogeny s 18 uhlíky. Aromatasa přeměňuje androstendion a testosteron na estron a estradiol po přijetí elektronů z NADPH-cytochrom P450 reduktasy.[2] Estron, estradiol a estriol, ženské pohlavní hormony, které souhrnně nazývány jako estrogeny, jsou syntetizovány působením aromatasy. [7]

Aromatasa je v lidském těle nejvíce přítomna ve vaječnících premenopauzálních žen, dále ji lze nalézt v periferních tukových tkáních žen po menopauze a placentě žen v těhotenství. Navíc je exprese aromatasy nejvyšší v oblastech nádorů prsu a v jejich okolí.[4]

Proces aromatizace probíhá ve třech hlavních krocích, přičemž nejprve dochází k hydroxylaci methylové skupiny na C19 v androstendionu. Poté následuje druhá hydroxylační reakce a konečnou reakcí je oxidačnímu štěpení vazby C10-C19, kde dochází k uvolnění kyseliny mravenčí vedoucí ke vzniku estrogenu. [7]

4.3.3 Nesteroidní inhibitory aromatas

Anastrozol a letrozol patřící do skupiny nesteroidních inhibitorů aromatas mají triazolovou funkční skupinu. Triazoly jsou heterocyklické sloučeniny s dvěma nenasycenými uhlíky a třemi atomy dusíku. Jsou zodpovědné za interakci s hemoprotetickou skupinou aromatasy, a působí jako kompetitivní inhibitory vůči androgenním substrátům.[2]

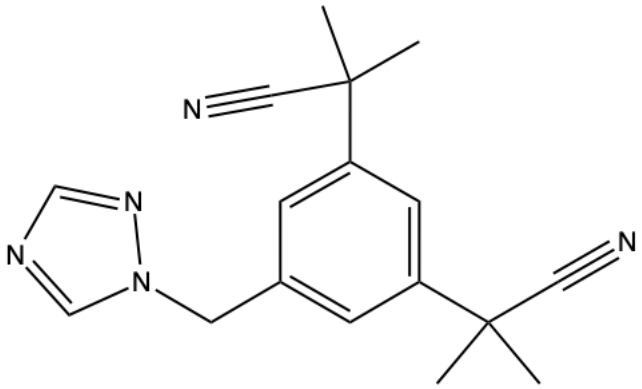
4.4 Anastrozol

Anastrozol je účinnou primární adjuvantní léčbou u postmenopauzálních žen s časným stadiem karcinomu prsu. Jedná se o silný a selektivní inhibitor aromatasy, benzyltriazolový derivát, který snižuje syntézu estrogenů tím, že se kompetitivně váže na hemovou skupinu jednotky cytochromu P450 aromatasy.[19]

Anastrozol je metabolizován hlavně v játrech N-dealkylací, glukuronidací a hydroxylací.[19] Hlavní cestou vylučování metabolitů anastrozolu je močí, dále také žlučí, avšak s minimálním množstvím nemetabolizované látky. Mezi hlavní metabolity patří triazol, který je farmakologicky inaktivní, glukuronidové konjugáty hydroxyanastrozolu a samotný anastrozol.[20] Mezi jeho nežádoucí účinky patří hypertenze, osteoporóza, hypercholesterolémie, průjem a parestézie, přičemž má minimální vliv na steroidní hormony nadledvin.[19]

Anastrozol vykazuje až 200x větší účinnost než aminoglutethimid.[20] Inhibuje poslední krok metabolické dráhy biosyntézy steroidů, tedy přeměnu androgenů na estrogeny aromatasou, a tato inhibice nevede k adisonskému stavu nebo hypoaldosteronismu. Anastrozol nevykazuje zkříženou rezistenci s tamoxifenem, může být použit k léčbě pacientek, u kterých došlo k progresi onemocnění po léčbě tamoxifenem.[21]

Anastrozol se podává perorálně s téměř úplnou absorpcí, která se může příjmem potravy snížit, proto je doporučeno užívat jej nalačno. Doporučené dávkování je 1 mg denně.[21]



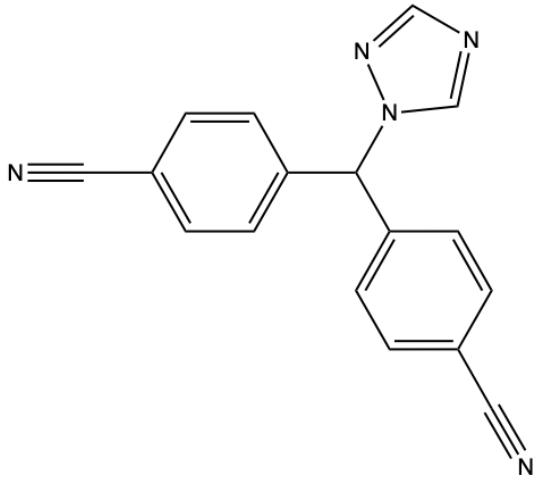
Obrázek 3:Molekula anastrozolu.[35]

4.5 Letrozol

Letrozol, známý také pod názvem Femara, má chemický vzorec (4,4′-[(1H-1,2,4-triazol-1-yl)methylen]bis-benzonitril) a obsahuje dusíkatou a kyanobenzylovou část, která se váže na hemovou část a má strukturu podobnou androstendionu, což ho činí účinnějším než jiné inhibitory aromatasy.[22] *In vitro* má letrozol větší inhibiční aktivitu než aminoglutetimid (170krát), anastrozol (19krát), formestan (6krát) a vorozol (2krát) vůči lidské aromatase.[23] Letrozol je vysoce selektivní pro aromatasu a na rozdíl od AI první a druhé generace významně neovlivňuje hladiny kortizolu, aldosteronu ani tyroxinu.[24]

Letrozol je perorálně podávaný lék, který se okamžitě a úplně absorbuje s průměrnou absolutní biologickou dostupností 99,9 % a velkým distribučním objemem. Vstřebává se z gastrointestinálního traktu a jeho rychlost absorpce je ovlivněna konzumovanou potravou. Letrozol a jeho metabolity se vylučují převážně ledvinami. Hlavním metabolitem je glukuronidový konjugát. Neprochází first-pass eliminací, což vede k téměř 100% biologické dostupnosti léku.[23]

Doporučené dávkování letrozolu je 2,5 mg denně. Mezi nejčastější nežádoucí účinky letrozolu patří nauzea, únava, řídnutí vlasů a návaly. Dlouhodobá expozice 2,5 mg/den letrozolu může způsobit kostní resorpci a zvýšené riziko aterosklerózy v důsledku zvýšené hladiny cholesterolu.[23]



Obrázek 4: Molekula letrozolu.[36]

4.6 Reakce rostlin na xenobiotika

Pro rostliny jsou klíčové jednotlivé biochemické dráhy, které ovlivňují jejich reakce na xenobiotika. Jedním z hlavních mechanismů jsou detoxikační enzymy, jako jsou monooxygenasy cytochromu P450, glutathion S-transferasy a peroxidasy, které pomáhají rostlinám rozkládat a odstraňovat xenobiotika. Rostliny také mají antioxidační obranné enzymy, jako je superoxiddismutasa, katalasa a glutathionperoxidasa, které působí proti oxidačnímu stresu vyvolanému xenobiotiky. Další důležitou součástí jsou metabolické dráhy, které umožňují rostlinám přeměnu xenobiotik na méně toxické formy, jež mohou být vyloučeny nebo uloženy do vakuol. Signální dráhy jsou aktivovány k regulaci genové exprese a buněčných reakcí na stres způsobený xenobiotiky, což zvyšuje toleranci a obranné mechanismy rostlin. Tyto biochemické procesy společně přispívají k schopnosti rostlin detoxikovat, metabolizovat a reagovat na xenobiotika v prostředí.[28]

Osud xenobiotik v rostlinných buňkách je určen jejich příjmem, metabolismem a kompartmentací. Proces metabolismu organických znečišťujících látek vyžaduje průnik xenobiotik do rostlinné buňky, často přes plazmatickou membránu, který probíhá převážně pasivně podél koncentračního gradientu membránou, ale někdy může být zprostředkován specifickými membránovými proteiny. Po vstupu do buňky mohou být xenobiotika transportována do vakuoly buď nezměněná nebo metabolizována. Detoxikace xenobiotik je

klíčovým procesem v rostlinách, protože eliminuje konjugované produkty ze zranitelných míst cytosolu.[28]

4.6.1 Antioxidační systém rostlin

Různé environmentální faktory, jako je sucho, teplota, sůl a silné světlo, ovlivňují růst a vývoj rostlin. Pokud je těmito faktory překročena optimální tolerance, dochází k stresu rostlin, což má dopad na jejich vývoj, strukturu a biochemické procesy. Hlavními účinky abiotického stresu jsou nerovnováha iontů a hyperosmotický stres, které vedou k aktivaci mechanismů odpovídajících na stres a k obnovení homeostázy a ochraně a opravě poškozených proteinů a membrán.[29]

Během stresu jsou elektrony s vysokou energií přenášeny na molekulární kyslík (O_2), čímž vznikají reaktivní kyslíkové druhy (ROS). ROS, jako singletový kyslík ($^1O_2$), superoxidové ionty (O_2^-) a peroxidy, hlavně peroxid vodíku (H_2O_2) jsou toxické molekuly, které cílí na vysokomolekulární molekuly, jako jsou membránové lipidy nebo mitochondriální DNA, a způsobují poškození téměř všech buněčných makromolekul, včetně DNA. Toxické účinky ROS jsou vyvažovány enzymatickými i neenzymatickými antioxidačními systémy, jako jsou superoxiddismutasa (SOD), katalasa (CAT), askorbátperoxidasa (APX), glutathionreduktasa (GR), kyselina askorbová (AsA), tokoferol, glutathion (GSH) a fenolické sloučeniny.[29]

4.6.1.1 Enzymatické antioxidanty

4.6.1.1.1 Superoxiddismutasa

Metalloenzym superoxiddismutasa dismutuje superoxidový radikál na kyslík a peroxid vodíku.[29] Existují tři typy SOD, Cu/Zn-SOD, Fe-SOD a Mn-SOD, které se liší přítomností iontu kovu. Cu/ZnSOD je přítomna v chloroplastech a cytosolu rostlinné buňky a MnSOD je přítomna v peroxizomech a mitochondriální matrix.[30] Zvýšená regulace SOD se podílí na boji proti oxidačnímu stresu způsobenému abiotickým stresem a mají rozhodující úlohu v přežití rostlin.[29]

4.6.1.1.2 Katalasa

Katalasy jsou lokalizované především v peroxizomech, které se podílí na přeměně $2H_2O_2$ na $O_2 + 2H_2O$. Katalasy jsou hlavními čisticími enzymy, které mohou přímo dismutovat H_2O_2 a jsou nepostradatelné pro detoxikaci ROS během stresu.[29]

Rostlinné katalasy jsou tetramerní enzymy obsahující hem a lze rozdělit do tří tříd: katalasy třídy 1 jsou nejvýznamnější ve fotosyntetických tkáních a podílejí se na odstraňování H_2O_2 vznikajícího při fotorespiraci; katalasy třídy 2 jsou ve velké míře produkovány v cévních pletivech, katalasy třídy 3 jsou ve velké míře zastoupeny v semenech a mladých rostlinách a jejich aktivita je spojena s odstraňováním nadbytečného H_2O_2 vznikajícího při degradaci mastných kyselin v glyoxylátovém cyklu v glyoxisomech.[29]

4.6.1.1.3 Glutathionperoxidasa

Glutathionperoxidasy (GPx) jsou skupinou různých izoforem enzymů, které mají schopnost redukovat H_2O_2 a cytotoxické hydroperoxidy na neškodné alkoholy. Také mají zásadní roli při detoxikaci produktů oxidace lipidů, které vznikají v reakci s ROS. Existují tři hlavní typy GPx: selen-dependentní, neselen-dependentní fosfolipid-hydroperoxidová GPx (PHGPx) a glutathion-S-transferasy (GST) s GPx aktivitou (GST-GPx). Tyto dva enzymy, GPx a GST, se liší v počtu jejich podjednotek, struktuře aktivního místa a mechanismech katalýzy.[29]

GST jsou dimerní multifunkční proteiny zprostředkovávající nukleofilní atak thiolové skupiny glutathionu (GSH) na různé elektrofilní substráty. Bylo prokázáno, že někteří členové rodiny GST se podílejí také na ochraně buněk před oxidačním poškozením způsobeným xenobiotiky. Tyto enzymy mohou například zabránit hromadění cytotoxických látek, které by mohly způsobit oxidaci membránových lipidů.[33]

GPx enzymy jsou schopné neutralizovat peroxidy, které mohou sloužit jako substráty pro Fentonovu reakci, což je proces tvorby volných radikálů. GPx funguje v synergii s molekulou GSH, která je v buňkách hojně přítomna. Při katalytické reakci GPx dochází k rozkladu peroxidu na vodu nebo alkohol a současně k oxidaci GSH. GPx soutěží s katalasou o H_2O_2 jako substrát a představuje hlavní mechanismus ochrany proti nízké úrovni oxidačního stresu.[29]

4.6.1.1.4 Askorbátperoxidasa

APX se podílí na vychytávání H_2O_2 v cyklech voda-voda a AsA-GSH a využívá AsA jako donor elektronů.[29] APX plní podobnou roli v chloroplastech a cytosolu. Jako CAT v peroxisomech. AsA je redukční činidlo pro redukci H_2O_2 na H_2O a také DHA.[30]

Existuje minimálně pět různých izoforem včetně tylakoidních a mikrosomálních membrán vázaných forem, stejně jako rozpustných stromálních, cytosolických a apoplastických enzymů. Thylakoidální APX je při stresu inhibována H_2O_2 v nanomolárních koncentracích.[29]

4.6.1.1.5 Guajakolperoxidasa

GuPX, patří mezi peroxidasy, které oxidují guajakol (o-methoxyfenol) jako běžně používaný redukující substrát *in vitro*. Guajakol je fenolická látka. Nacházejí se v cytosolu, vakuole, buněčné stěně, apoplastu a extracelulárním médiu, nikoli však v organelách, a předpokládá se, že se účastní řady procesů souvisejících s růstem a vývojem rostlin.[31]

4.6.1.2 Antioxidanty neenzymatické povahy

AsA (vitamín C) a GST jsou klíčovými antioxidanty v rostlinách, které chrání buňky před oxidačním stresem. AsA plní roli redukčního činidla a zachycuje volné radikály, jako je cytotoxický H_2O_2 a ROS, podobně jako GSH, který se podílí na zachycování H_2O_2 a neenzymatické reakci s dalšími ROS. Karotenoidy, nacházející se v rostlinách a mikroorganismech, rovněž vykazují významné antioxidační vlastnosti díky své konjugované struktuře, která jim umožňuje neutralizovat singletový kyslík a reagovat s dalšími volnými radikály. Fenolové sloučeniny, jako jsou flavonoidy a taniny, jsou dalšími důležitými antioxidačními látkami v rostlinách, které přispívají k ochraně buněk před oxidačním stresem.[29]

5 Experimentální část

5.1 Chemikálie

1-chloro-2,4-dinitrobenzen (Sigma-Aldrich, USA)

3,3´-diaminobenzidin (Sigma-Aldrich, USA)

ABTS roztok obsahující H2O2 (Sigma-Aldrich, USA)

Acetonitril, gradient grade, for HPLC, ≥ 99.9% (Honeywell, USA)

Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)

Anastrozol (Tokyo Chemical Industry, Japonsko)

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)

Dihydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, Německo)

Dimethyl sulfoxid (Sigma-Aldrich, USA)

Dithiotreitol (Sigma-Aldrich, USA)

Ethanol, p.a. 96 % (Lach-Ner, ČR)

Ethyl-acetát (Lach-Ner, ČR)

Ethylendiamintetraoctan disodný dihydrát (Sigma-Aldrich, USA)

Fenazin methosulfát (Sigma-Aldrich, USA)

Glutathion (Sigma-Aldrich, USA)

Glycerol bezvodý (Lach-Ner, ČR)

Glycin (Lach-Ner, ČR)

Guajakol (Sigma-Aldrich, USA)

Hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, USA)

Hydrogenfosforečnan sodný (dihydrát)

Chlorid sodný (Penta, ČR)

Kyselina chlorovodíková 35 % (Lach-Ner, ČR)

Kyselina trihydrogenfosforečná, ≥ 85% (Sigma-Aldrich, USA)

Letrozol (Tokyo Chemical Industry, Japonsko)

Methanol, HPLC grade (Lab-Scan analytical sciences, Polsko)
Mořský písek (Lach-Ner, ČR)
N,N,N´,N´-tetrametyletylendiamin (Thermo, Japonsko)
Nitro blue tetrazolium chlorid (Sigma-Aldrich, USA)
Peroxid vodíku 30 % (Lach-Ner, ČR)
Peroxodisíran amonný (Sigma-Aldrich, USA)
Polyvinylpolypyrrolidon (Sigma-Aldrich, USA)
Sacharosa (Penta, ČR)
Savo Original (Unilever s.r.o., Velká Británie)
Síran sodný bezvodý (Lach-Ner, ČR)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (VWR Life Science, USA)

5.2 Přístroje

ACD/ChemSketch (Freeware) (ACD/Labs, verze 2020.1.2)
Analytické váhy ABT 120-5DNM (KERN, Německo)
Centrifuga Spectrafuge TM 16M (Labnet, USA) – 14000 otáček/min, průměr rotoru 100 mm
Centrifuga Universal R32 (Hettich, Německo) – 16000×g
Clarity software (Data Apex, verze 8.5)
Čtečka mikrotitračních destiček Multiscan go (Thermo Scientific, USA) Elektroforetická souprava (Bio-Rad, USA)
HPLC (Shimadzu, Japonsko) - nástřik kohoutem Rheodyne (USA), HPLC kolona Agilent Eclipse XDB-C-18, 5 μm, 250 x 4 mm, vysokotlaké čerpadlo LC20AD, UV detektor SPD 20A
Kahan Fuego (WLD-TEC, Německo)
Laminární box s vertikálním prouděním vzduchu (Labox, ČR)
Mrazicí box (Liebherr, Německo)
Přístroj pro přípravu ultračisté vody IWA 5 rosol (Watek, ČR)
Tlakový hrnec (Morphy Richards, Velká Británie)
Ultrazvuková lázeň (Fisherbrand, Velká Británie)
UV/VIS Spektrofotometr Ultrospec 2100 (Amersham Pharmacia Biotech, USA)

5.3 Rostlinný materiál

Zea mays L. (Kukuřice setá), kultivar DKC 3969 (Monsanto ČR)

5.4 Další materiál

Automatické a poloautomatické pipety
Hliníková fólie
Laboratorní sklo
Sterilní injekční stříkačky

5.5 Příprava sterilní vody

Do 100 mL Erlenmayerových baněk bylo odměřeno 100 mL kohoutkové vody, baňky byly přikryty hliníkovou fólií a vloženy na 30 minut do tlakového hrnce.

5.6 Příprava Erlenmayerových baněk s kultivačním médiem

Semena kukuřice seté byla sterilizována dvěma roztoky Sava – 5% a 10%. Do Erlenmayerovy baňky se semeny bylo přidáno takové množství 70% ethanolu, aby byla semena zcela ponořena. Obsah baňky byl krouživými pohyby promícháván po dobu jedné minuty, poté byl ethanol slit. Následně bylo přidáno 50 mL 5 % roztoku Sava s jednou kapkou jaru, obsah byl promícháván a ponechán stát 5 minut. Postup byl zopakován s 10% roztokem Sava. Po odlití roztoku Sava byla semena třikrát propláchnuta sterilizovanou vodou. V laminárním boxu byla semena vnesena pomocí pinzety do Erlenmayerových baněk s kultivačním médiem. Do každé baňky bylo dáno 5 vysterilizovaných semen a hrdlo uzavřeno hliníkovou fólií. Baňky byly přeneseny do kultivační místnosti při teplotě 24 °C a světelným režimem 12 h/12 h světlo/tma (zářivky 40 W/m^2, Cool White), přibližně 10–14 dní, dokud nevyrostly do požadovaných velikostí.

5.7 Přidání farmak a odběr vzorků

Navážka 5 mg letrozolu byla rozpuštěna v 1000 μL DMSO v odměrné baňce (2 mL). Do baněk s vyrostlými semeny bylo v laminárním boxu přidáno 100 mL sterilizované vody a 100 μL připraveného roztoku léčiva, tudíž výsledné koncentrace léčiva v kultivačním roztoku činila 5 mg/L. Do dalších dvou baněk s rostlinami bylo přidáno pouze 100 mL sterilizované vody bez přídavku léčiva, tyto baňky sloužily jako kontrolní experimenty.

Podobný postup byl zopakován i v případě anastrozolu jako přidaného farmaka. Navážka 4 mg anastrozolu byla rozpuštěna v 2mLodměrné baňce v 2 mL destilované vody. Do baněk bylo přidáno 250 μL připraveného roztoku léčiva a 100 mL sterilizované vody, tak aby koncentrace léčiva v baňce s rostlinami byla 5 mg/L. Do dalších dvou baněk s rostlinami bylo přidáno pouze 100 mL sterilizované vody.

5.8 Odběr vzorků

Ihned po přidání léčiva do baněk s kukuřicemi, byl odebrán první vzorek pro stanovení výchozí koncentrace. Sterilní injekční stříkačkou bylo odebráno 0,75 mL roztoku do označené Eppendorfovy mikrozkumavky. Hrdlo baňky bylo opáleno plamenem, přikryto hliníkovou folií a baňky opět vloženy do kultivační místnosti. Odběry byly prováděny v 24 hodinových intervalech po dobu 7 dní. Vzorky v mikrozkumavkách byly uchovávány v mrazícím boxu.

5.9 Ukončení kultivace

Po posledním odběru vzorku byly rostliny vyjmuty z baněk, omyty destilovanou vodou, lehce osušeny a zváženy. Byla oddělena nadzemní část (listy) od kořenů a zváženy listy i kořeny. Následně byly vzorky kořenů a listů zvlášť zmrazeny po 0,25 g v tekutém dusíku a uchovávány při teplotě -20 °C pro další zpracování.

5.10 Stanovení extrahovatelných reziduí

Semena byla vysterilizována stejným způsobem jako v předchozím případě a ponechána vyrůst. Do jedné baňky s 5 vyrostlými rostlinami bylo přidáno 100 mL sterilizované vody a 250 μL roztoku anastrozolu připraveného rozpuštěním 4 mg v 2 mL destilované vody, tudíž výsledné koncentrace léčiva v kultivačním roztoku činila 5 mg/L. Do další baňky s rostlinami bylo přidáno 100 mL sterilizované vody a 100 μL roztoku letrozolu, který byl připraven rozpuštěním 5 mg letrozolu v 1000 μL DMSO, tak aby koncentrace letrozolu v kultivačním roztoku byla 5 mg/L. Další dvě baňky s rostlinami sloužily jako kontrolní, do jedné bylo přidáno pouze 100 mL sterilizované vody a do druhé 100 mL sterilizované vody a 1000 μL DMSO. Baňky byly přeneseny do kultivační místnosti, kde byly ponechány po dobu 8 dní.

5.10.1 Příprava rostlinných extraktů

Rostliny byly vyjmuty z baněk, osušeny a omyty destilovanou vodou. Poté byla oddělena nadzemní část od kořenů a obě části zváženy. Rostliny byly zmrazeny a ponechány v mrazícím boxu. Zmrazený rostlinný materiál byl homogenizován v třecí misce s tloučkem s 0,5 mL destilované vody a půl lžičkou mořského písku. Do misky bylo přidáno 20 mL ethyl-acetátu a celý obsah byl přelit z třecí misky do Erlenmayerovy baňky. Směs byla sonikována 5 minut v ultrazvukové lázni. Suspenze byla přefiltrována do čisté Erlenmeyerovy baňky přes smotek vaty, bylo přidáno sušidlo (bezvodý Na_2SO_4) a baňka s obsahem byla ponechána stát přes noc. Druhý den bylo sušidlo odfiltrováno přes skládaný filtr a obsah byl odpařen do sucha na vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn v 1 mL mobilní fáze. Roztok byl z baněk přelit do mikrozkumavek, které byly následně centrifugovány. Následovala HPLC analýza jednotlivých vzorků.

5.11 HPLC analýza

Analýza jednotlivých vzorků byla provedena metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí. Mobilní fáze byla po obě farmaka totožná, o složení acetonitril : destilovaná voda v poměru 2 : 3 (*v/v*) a okyselením kyselinou trihydrogenfosforečnou (100 µL/L). Analýza byla provedena na koloně Agilent Eclipse XDB 150 × 4 mm (5 µm), použitý průtok mobilní fáze byl 1,0 mL za minutu. Měření bylo provedeno při 215 nm za laboratorní teploty. Vzorky byly před nástřikem centrifugovány (14000 rpm, průměr rotoru 100 mm) po dobu 5 minut. Vyhodnocení kalibrační přímky a stanovení koncentrací z naměřených chromatogramů bylo provedeno programem *Clarity* verze 8.5.

5.12 Biochemická analýza metabolismu rostlin

5.12.1 Příprava rostlinných extraktů pro stanovení enzymové aktivity

Rostlinný materiál (listy a kořeny) byl za použití tekutého dusíku homogenizován ve třecí misce s čtyřnásobným objemem extrakčního pufru oproti původní navážce. Extrakční pufr obsahoval: 100mM Tris-HCl pufr o pH = 7,8; 1mM DTT; 1mM EDTA a 10 mM askorbát sodný. Do směsi bylo také přidáno malé množství PVP (cca 3 mg/mL), které váže fenolické látky, jež by mohly inhibovat enzymatickou aktivitu. Vzorky byly poté centrifugovány při 4°C, 16 000×g, po dobu 15 minut.

5.12.2 Stanovení aktivity celkových volných a membránově vázaných peroxidas

Pro stanovení celkových membránových peroxidas bylo využito barevného substrátu DAB (3,3′-diaminobenzidin). Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 20 µL rostlinného extraktu, 155 µL 50 mM fosfátového pufru, pH 7,0, 5 µL 49 mM H_2O_2, 20 µL DAB o koncentraci 4 mg/ml, který vznikl rozpuštěním 40 mg v 96 % ethanolu a sonikován po dobu 5 minut. Absorbance byla měřena kontinuálně při 430 nm po dobu 5 minut.

Pro stanovení membránově vázaných peroxidas byl použit sediment, ke kterému byl přidán extrakční pufr skládající se z 100mM Tris-HCl pufr o pH = 7,8; 1mM DTT; 1mM EDTA a 10mM askorbát sodný a 1 M NaCl. Vzniklá směs byla centrifugována. Získaný supernatant sloužil jako extrakt pro stanovení aktivity peroxidas dle postupu uvedeného výše.

5.12.3 Stanovení aktivity guajakolperoxidasy

Ke stanovení aktivity guajakolperoxidasy bylo použito 155 µL 50mM fosfátového pufru (pH 7,0), 5 µL 49mM peroxidu vodíku a 20 µL 9mM roztoku guajakolu. Tato směs byla pipetována do mikrotitrační destičky s 20 µL připraveného rostlinného extraktu. Změna absorbance byla měřena kontinuálně po dobu 5 minut při 470 nm.

5.12.4 Stanovení aktivity ABTS-peroxidas

Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 20 µL o rostlinného extraktu, 80 µL 50 mM fosfátového pufru, pH 7,0, 100 µL ABTS činidla a 5 µL 49 mM H_2O_2. Změna absorbance byla měřena kontinuálně po dobu 5 minut při 414 nm.

5.12.5 Stanovení množství bílkovin dle Bradforda

Pro stanovení množství bílkovin v jednotlivých extraktech bylo provedeno podle Bradfordova stanovení, které využívá reakci bazických aminokyselin obsažených v bílkovině s Bradfordovým činidlem obsahujícím Coomassie brilliant blue G 250. Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky bylo vždy přidáno 20 µL stanovovaného vzorku a 200 µL Bradfordova činidla. Destička byla ponechána inkubovat po dobu 10 minut a poté byla proměřena absorpce při vlnové délce 595 nm. Pro kalibraci byly použity roztoky BSA o koncentracích 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 a 0,7 mg/ml. Z naměřených hodnot byla sestrojena kalibrační přímka, pomocí které byla odečtena koncentrace proteinů ve stanovovaných vzorcích.

5.13 Nativní elektroforéza

5.13.1 Příprava gelů pro elektroforézu

Pro nativní elektroforézu byly připraveny 10% polyakrylamidové separační gely o složení: 7,9 mL destilované vody; 6,7 mL 30% roztoku akrylamidu/bis-akrylamidu (36,5:1); 5,0 mL 1,5 M Tris-HCl pufru, pH 8,8; 2 µL TEMED a 0,2 mL10% (w/v) roztoku glycerolu. Nakonec bylo přidáno 200 µL 10% peroxodisíranu amonného, který iniciuje polymeraci gelu. Tato směs byla nalita mezi čtyři elektroforetická skla a převrstvena destilovanou vodou.

Po 30 minutách, kdy gel zpolymeroval, byl převrstven 4% zaostřovacím gelem o složení: 1,22 mL destilované vody; 0,26 mL30% roztoku akrylamidu/bis-akrylamidu (36,5 : 1); 0,5 mL 0,5 M Tris-HCl pufru, pH 6,8; 0,5 µL TEMED; 0,02 mL10% (w/v) roztoku glycerolu a 20 µL 10% peroxodisíranu amonného, který byl přidán jako poslední. Mezi elektroforetická skla byl vložen hřeben, aby se vytvořily jamky pro dávkování vzorků. Gel byl inkubován při laboratorní teplotě po dobu 30 minut.

5.13.2 Příprava rostlinných extraktů a průběh elektroforézy

Rostlinný materiál byl připraven stejně jako v případě stanovení enzymových aktivit. Pouze k extraktu byla navíc přidána sacharóza, v takovém množství, aby její výsledná koncentrace byla 20% (w/v). Do jednotlivých jamek v gelu bylo přidáno vždy, takové množství vzorku, tak aby ve všech jamkách bylo stejné množství proteinů, které bylo stanoveno metodou podle Bradforda.

Elektrodový pufr, pH 8,3, byl připraven smíšením 10 mL 10% (w/v) glycerolu, 18,8 g glycinu, 3 g Tris a doplněn do 1 L destilovanou vodou. Do horní části elektroforetické aparatury do elektroforetického pufru bylo rovnoměrně přidáno 100 μL 0,1% (w/v) bromfenolové modři.

Elektroforetická aparatura byla připojena ke zdroji stejnosměrného proudu s počáteční hodnotou napětí 70 V, jakmile bromfenolová modř doputovala do separačního gelu bylo napětí zvýšeno na 140 V. Elektroforéza byla ukončena v moment doputování bromfenolové modře ke konci gelu.

5.13.3 Detekce aktivity peroxidas v gelu

Pro stanovení peroxidas ve vzorcích byl gel ponořen do roztoku připraveného rozpuštěním 0,01 g DAB v 2,5 mL96% ethanolu, dále bylo přidáno 7 mL100 mM fosfátového pufru (pH 7,0), 100 μL 30% H_2O_2 a roztok byl doplněn na 10 mL destilovanou vodou. Tento roztok byl krátce sonikován. Gel byl v roztoku ponechán do požadovaného vybarvení a následně přenesen do destilované vody.

5.13.4 Detekce aktivity glutathion-S-tranferasy v gelu

Pro stanovení glutathion-S-tranferasy byly připraveny dva roztoky. První roztok, ve kterém byl gel inkubován 10 minut, byl připraven smíšením 10 mL 100 mM fosfátového pufru, pH 6,5, 4,5 mM glutathionu, 1 mM CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzen) a 1 mM NBT (nitro blue tetrazolium chlorid). Poté byl gel promyt destilovanou vodou a vložen do druhého gelu skládajícího se z 10 mL Tris-HCl, pH 9,6, a 0,0092 g 3 mM PMS (fenazine methosulfát). Gel byl v roztoku ponechán do vybarvení a následně přenesen do destilované vody.

6 Výsledky a diskuze

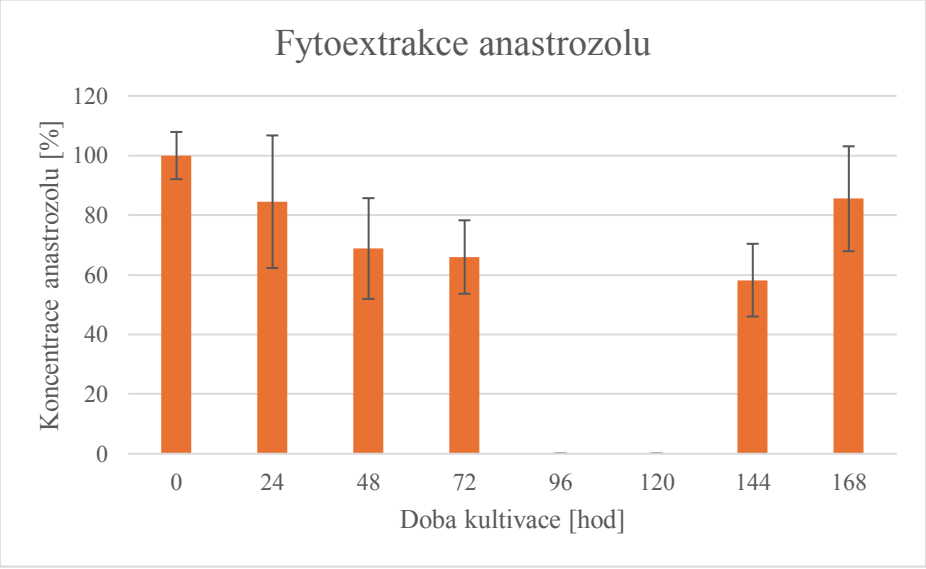
6.1 Kalibrace HPLC

Pro účely kalibrace byly připraveny roztoky anastrozolu v methanolu o koncentracích 0,5; 1; 2,5; 5 a 7,5 mg/L. Vyhodnocení chromatogramů bylo provedeno pomocí programu *Clarity*, který umožnil po kalibraci odečíst odpovídající koncentrace léčiva z naměřených píků. Dále byly vypočteny hodnoty limitu detekce (LOD) a limitu kvantifikace (LOQ), hodnota LOD byla stanovena na 0,03 mg/L a LOQ na 0,10 mg/L.

Kalibrace byla provedena i s kalibračními roztoky letrozolu, který byl rozpuštěn v methanolu, o koncentracích 0,5; 1; 2,5; 5 a 7,5 mg/L. Z naměřených hodnot byla sestrojen kalibrační přímka, která byla následně použita k zjištění koncentrací ve vzorcích média, které byly odebrány během kultivací. Z šumu základní linie odpovědi přístroje byla vypočtena hodnota LOD 0,04 mg/L a LOQ 0,13 mg/L.

6.2 Účinnost fytoextrakčních pokusů

6.2.1 Fytoextrakce anastrozolu

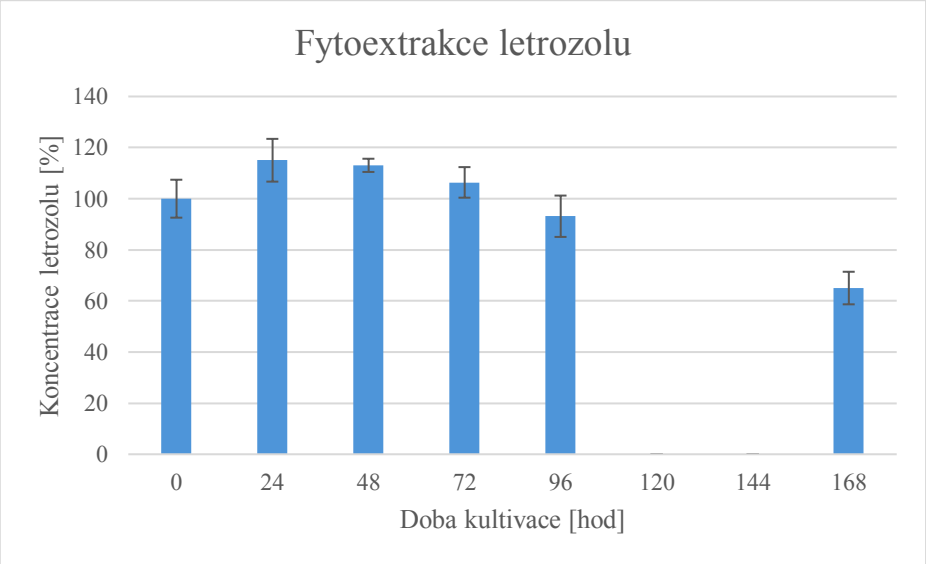


Graf 1: Závislost koncentrace anastrozolu ve vodné fázi na čase. (Koncentrace jsou vyjádřeny v procentech výchozí koncentrace.)

První experiment byl proveden na pěti baňkách s rostlinami *Zea mays*, jejichž doba kultivace byla sedm dní. Vzorky byly odebírány po 0 (ihned po přidání léčiva), 24, 48, 72, 144 a 168

hodinách. Procentuální průměrné koncentrace vztažené k počáteční koncentraci (v čase 0 hod) v průběhu kultivace zobrazuje *Graf 1*. Původní koncentrace anastrozolu měla být 5 mg/L, avšak skutečná průměrná hodnota stanovená pomocí HPLC byla 3,7 mg/L, tento pokles mohl být způsoben okamžitou sorpcí léčiva na kořeny a přítomností zbytkové vody po odlití vody z kultivací. Koncentrace 3,7 mg/L je brána jako výchozí, tedy 100%. Po 24 hodinách byl zaznamenán pokles koncentrace o 15 %, po 48 hod byl další pokles o 15 %. Z *Grafu 1* je zřejmé, že mezi 48 a 72 hodinami došlo k minimálnímu úbytku léčiva. Ve 144 hodinách byla naměřena nejnižší koncentrace, a tedy celkový pokles za 144 hodin kultivace byl o 52 % oproti výchozí koncentraci. V čase 144 hod koncentrace odpovídala 2,2 mg/L. Nárůst koncentrace ve 168 hodinách mohl být způsoben úhynem rostlin a zpětnou desorpcí léčiva do média. Kultivace byla ukončena po 168 hodinách. Účinnost fytoextrakce anastrozolu za 144 hod byla 0,067 mg anastrozolu na 1 gram čerstvé hmotnosti rostliny. Účinnost byla určena z nejnižší naměřené hodnoty.

6.2.2 Fytoextrakce letrozolu



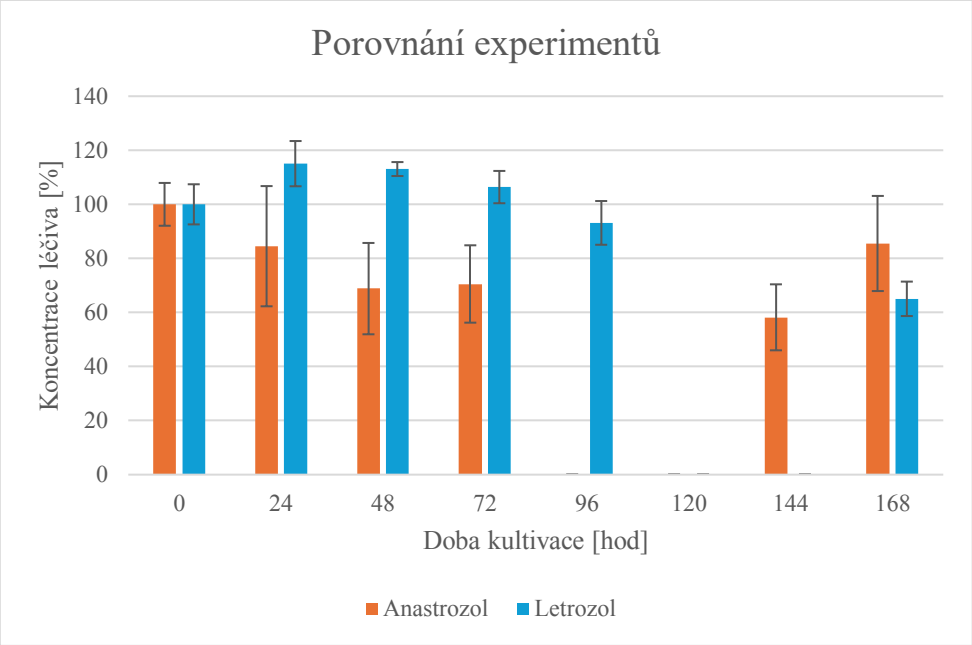
Graf 2: Závislost koncentrace letrozolu ve vodné fázi na čase. (Koncentrace jsou vyjádřeny v procentech výchozí koncentrace.)

Druhý experiment byl proveden na šesti baňkách s rostlinami *Zea mays* a dobou kultivace 168 hodin. Odběry vzorků probíhaly v časových intervalech 24 hodin, ihned po přidání léčiva byl odebrán první vzorek. V *Grafu 2* jsou vyneseny procentuální průměrné koncentrace vtažené ke koncentraci v čase 0, v momentě přidání anastrozolu. Průměrná koncentrace ihned po přidání léčiva byla rovna 4,7 mg/L, oproti zamýšlené koncentraci 5mg/L. Pokles mohl být způsobenou okamžitou sorpcí léčiva na kořeny. Z *Grafu 2* je patrné, že nejprve došlo k nárustu

koncentrace o 15 %, až poté dochází k pozvolnému poklesu koncentrace. Tento nárůst může být způsoben rychlou adsorpcí letrozolu na kořeny rostlin a následným ustavením rovnováhy mezi povrchem kořenů a roztokem.

V čase 168 hodin byla naměřena nejnižší průměrná koncentrace 3,1 mg/L, což znamená 45% pokles oproti výchozí koncentraci. Z trendu Grafu 2 lze předpokládat, že v dalších dnech by patrně pokračoval pokles koncentrace. Hodnota fytoextrakční účinnosti byla stanovena na 0,082 mg letrozolu na 1 g čerstvé hmotnosti rostliny.

6.2.3 Porovnání jednotlivých experimentů



Graf 3: Porovnání fytoextrakčních experimentů anastrozolu a letrozolu. (Koncentrace jsou vyjádřeny v procentech výchozí koncentrace.)

V *Grafu 3* je patrný rozdíl v průběhu fytoextrakce jednotlivých léčiv. Pokles anastrozolu je patrný ve druhém odběru, kdežto pokles letrozolu oproti původní koncentraci lze sledovat až v posledním odběru. Rostlina extrahovala za 72 hodin stejné množství anastrozolu jako letrozolu za 168 hodin. Fytoextrakce anastrozolu proběhla rychleji a účinněji. Fytoextrakční účinnost obou léčiv byla velmi podobná, 0,082 mg letrozolu na 1 g čerstvé hmotnosti rostliny a 0,067 mg anastrozolu na 1 gram čerstvé hmotnosti rostliny, z toho vyplývá, že rostliny kukuřice seté o něco lépe fytoextrahují letrozol.

6.3 Extrakce reziduí z rostlin

Baňky s vyrostlými rostlinami v prostředí léčiva byly kultivovány po dobu 8 dní. Následně byly připraveny vzorky zvlášť z kořenů a listů, které byly analyzovány pomocí HPLC.

Tabulka 1: Koncentrace léčiva udávaná v miligramech na gram čerstvé hmotnosti (FW) v kořenech nebo listech rostlin.

	mg (léčivo)/g (FW)
Anastrozol listy	0,0010
Anastrozol kořeny	0,0014
Letrozol listy	0,0010
Letrozol kořeny	0,0034

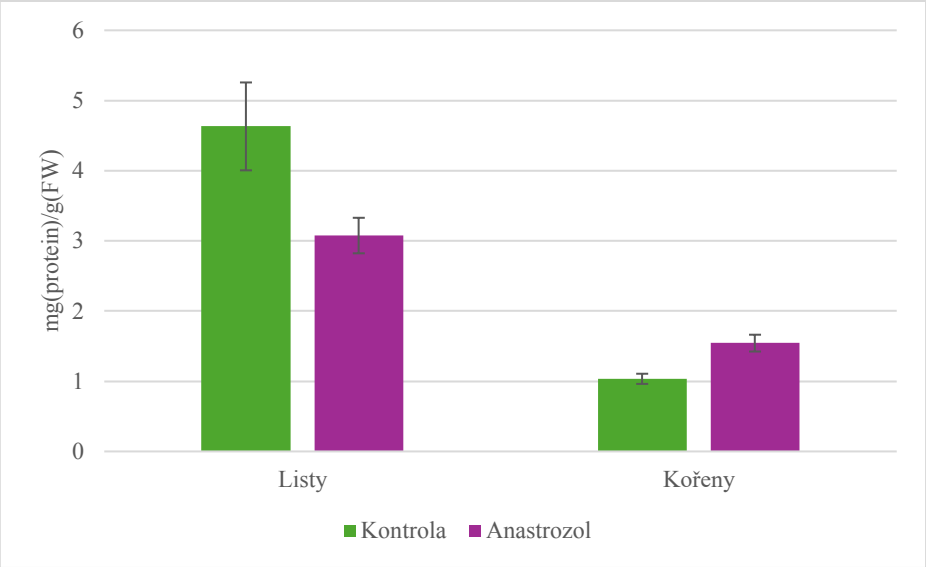
Z dat uvedených v *Tabulce 1* vyplývá, že nejvyšší koncentrace byla naměřena v kořenech rostlin pěstovaných v prostředí letrozolu. Naopak nejnižší naměřené hodnoty byly v listech rostlin kultivovaných v anastrozolu nebo letrozolu. Obecně lze konstatovat, že vyšší koncentrace léčiva byly v kořenech kontaminovaných rostlin.

6.4 Výsledky biochemické analýzy rostlin

Rostliny z prvního a druhého fytoextrakčního experimentu byly podrobeny analýze, která se skládala ze stanovení proteinů, aktivit celkových volných a membránově vázaných peroxidas, ABTS-peroxidas a guajakolperoxidas. Stanovení probíhala spektrofotometricky jako závislost absorbance na čase. Z naměřených hodnot byly vybrány lineární úseky této závislosti, poté byla vypočtena změna absorbance za čas a výsledná aktivita byla vyjádřena v procentech vůči kontrolním rostlinám, pro anastrozol byla kontrolní rostlina kultivována pouze s vodou, pro letrozol byla kontrolní rostlina kultivována s přídavkem DMSO, ve kterém bylo léčivo rozpouštěno.

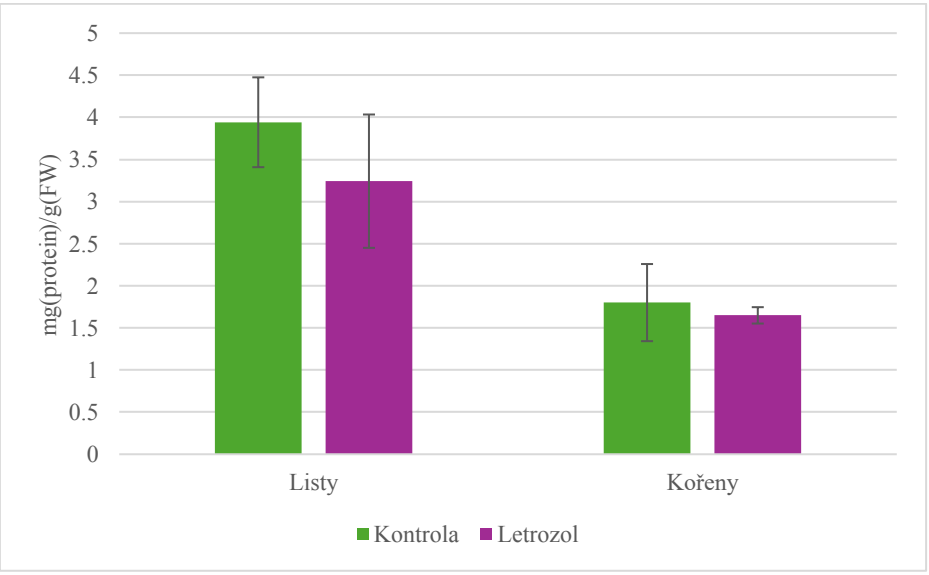
6.4.1 Stanovení obsahu proteinů dle Bradforda

Byla naměřena kalibrační křivka s roztoky BSA o různých koncentracích, z této křivky byly odečteny hodnoty koncentrace proteinů v listech a kořenech rostlin, které byly převedeny na mg proteinu na g čerstvé váhy



Graf 4: Stanovení obsahu proteinů in vitro v kořenech a listech v kontrolních rostlinách (bez přídavku léčiva) a rostlinách kontaminovaných anastrozolem. Aktivita je vztažena ke kontrolním rostlinám. FW značí čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

Z *Grafu 4* plyne, že rostliny pěstované v přítomností anastrozolu obsahují méně proteinů v listech oproti kontrolním rostlinám. V listech kontaminovaných rostlin je v průměru o 34 % nižší obsah proteinů. V kořenech je tomu naopak, kontaminované rostliny obsahují v průměru o 49 % více proteinů, toto navýšení může souviset se syntézou obranných proteinů nebo antioxidačních enzymů v rostlině.

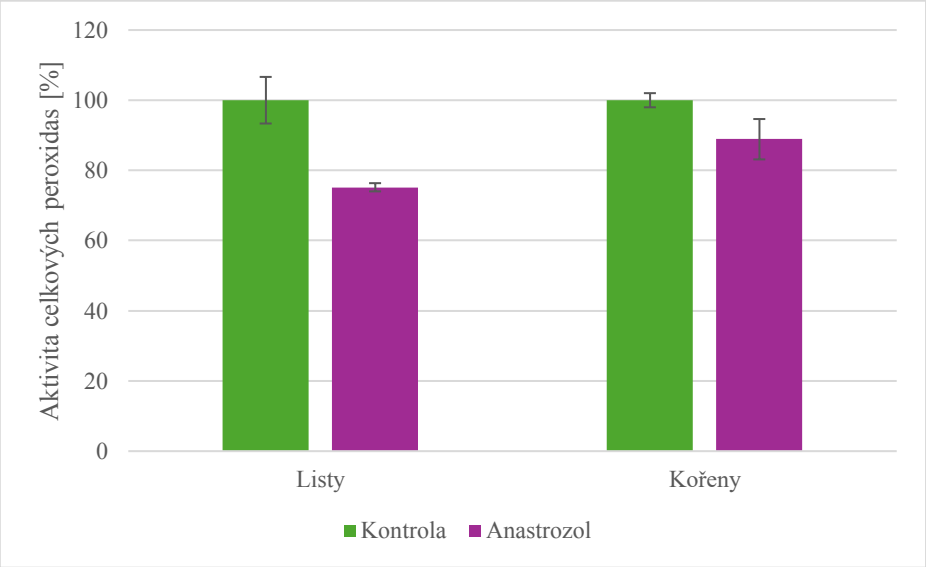


Graf 5: Stanovení obsahu proteinů in vitro v kořenech a listech v kontrolních rostlinách (bez přídavku léčiva) a rostlinách kontaminovaných letrozolem. Aktivita je vztažena ke kontrolním rostlinám. FW značí čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

Z Grafu 5 je patrné, že došlo k poklesu obsahu proteinů v listech i kořenech rostlin pěstovaných v prostředí letrozolu oproti množství proteinů přítomných v kontrolních rostlinách. Pokles je výraznější u listů, kde došlo se snížení o 18 %.

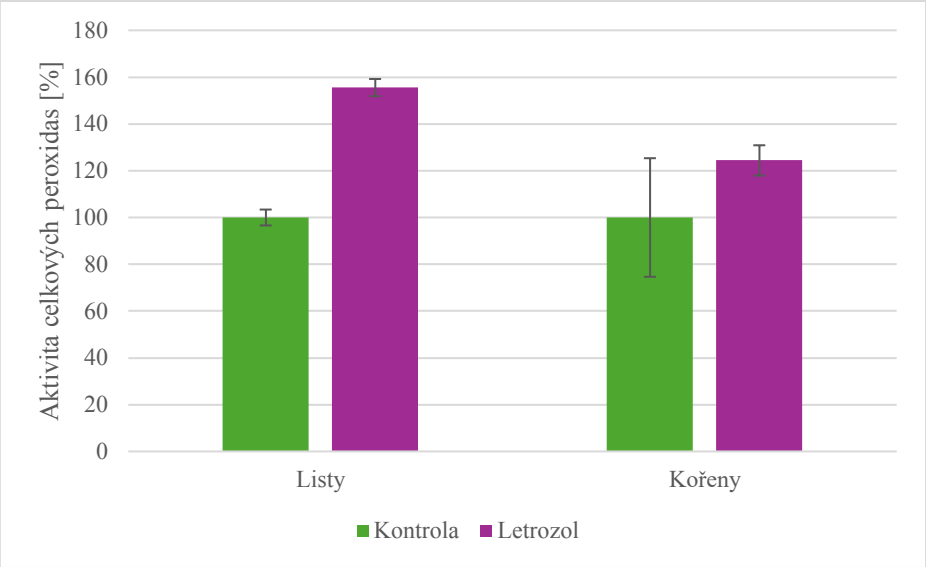
Obecně došlo k poklesu obsahu proteinů v listech rostlin kultivovaných s léčivy. Při vystavení rostliny stresu hrají důležitou roli rostlinné proteasy, které odbourávají poškozené proteiny bránící účinnému fungování specifických metabolických drah.[32]

6.4.2 Stanovení aktivity celkových volných peroxidas



Graf 6: Procentuální stanovení aktivity celkových volných peroxidas v listech a kořenech kontrolních rostlin (bez přídavku léčiva) a rostlin kontaminovaných anastrozolem. Aktivita je vztažena ke kontrolním rostlinám.

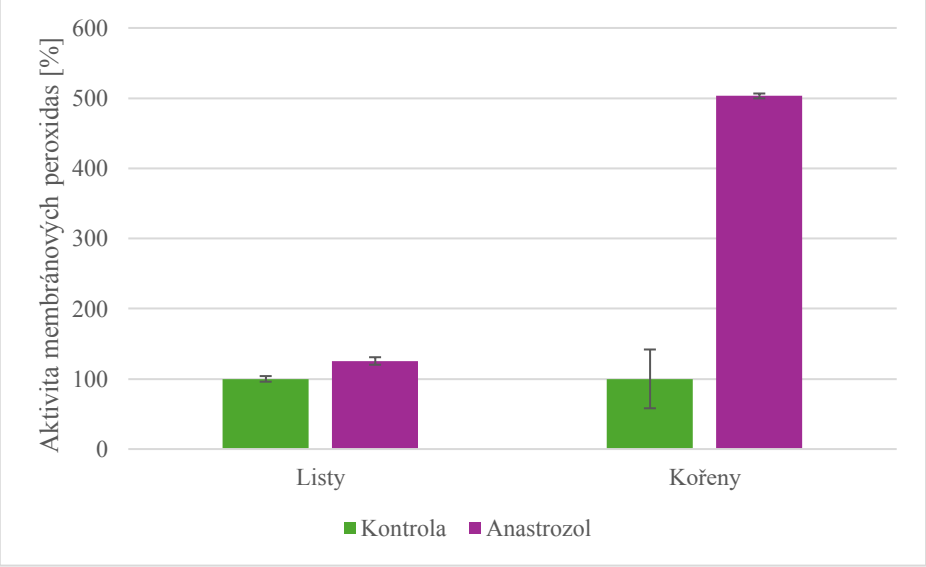
Z Grafu 6 je zřejmý pokles aktivity celkových volných peroxidas v listech i kořenech rostlin pěstovaných v přítomnosti anastrozolu oproti kontrolním rostlinám. Aktivita výrazněji poklesla v listech o 25 %, v kořenech byl pokles menší, a to o 11 %.



Graf 7: Procentuální stanovení aktivity celkových volných peroxidas v listech a kořenech kontrolních rostlin (bez přídavku léčiva) a rostlin kontaminovaných letrozolem. Aktivita je vztažena ke kontrolním rostlinám.

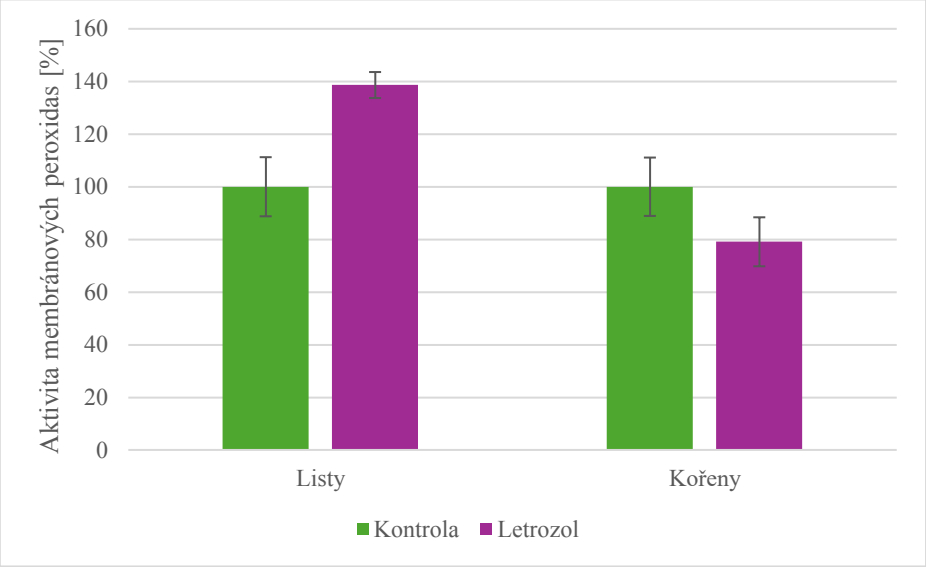
Aktivita celkových volných peroxidas vzrostla nejvýrazněji v listech rostlin kontaminovaných letrozolem, kde došlo k navýšení oproti kontrolním rostlinám průměrně o 56 %, jak je patrné z *Grafu 7*. V kořenech rostlin kontaminovaných letrozolem byl pozorován taktéž nárůst aktivity celkových volných peroxidas a to o 24 %. Aktivita tedy vzrostla v listech i kořenech kontaminovaných rostlin.

6.4.3 Stanovení aktivity membránově vázaných peroxidas



Graf 8: Procentuální stanovení aktivity membránově vázaných peroxidas v listech a kořenech kontrolních rostlin (bez přídavku léčiva) a rostlin kontaminovaných anastrozolem. Aktivita je vztažena ke kontrolním rostlinám.

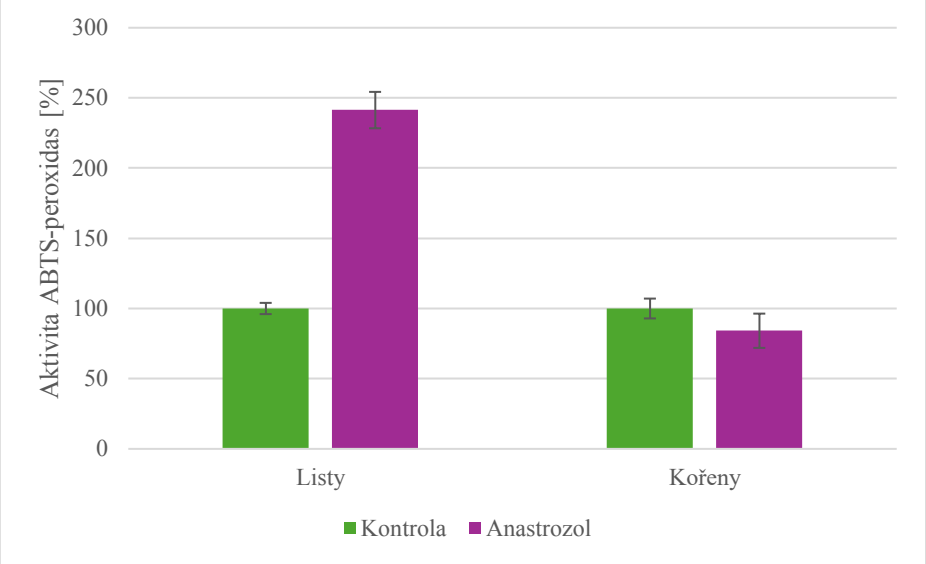
Graf 8 zobrazuje, že aktivita membránově vázaných peroxidas nejvíce vzrostla v kořenech rostlin kontaminovaných anastrozolem, kde naměřená aktivita dosahovala hodnot okolo 500 %, to znamená nárůst o 400 % oproti kontrolním rostlinám. V listech kontaminovaných rostlin byl pozorován také nárůst, ale pouze o 25 % oproti kontrolním rostlinám. Výrazný nárůst aktivity membránově vázaných peroxidas v kořenech rostlin kontaminovaných anastrozolem mohl být způsoben lignifikací xylémových cév (zesílením buněčné stěny), jejímž důsledkem je snížení příjmu léčiv.[31]



Graf 9: Procentuální stanovení aktivity membránově vázaných peroxidas v listech a kořenech kontrolních rostlin (bez přídavku léčiva) a rostlin kontaminovaných letrozolem. Aktivita je vztažena ke kontrolním rostlinám.

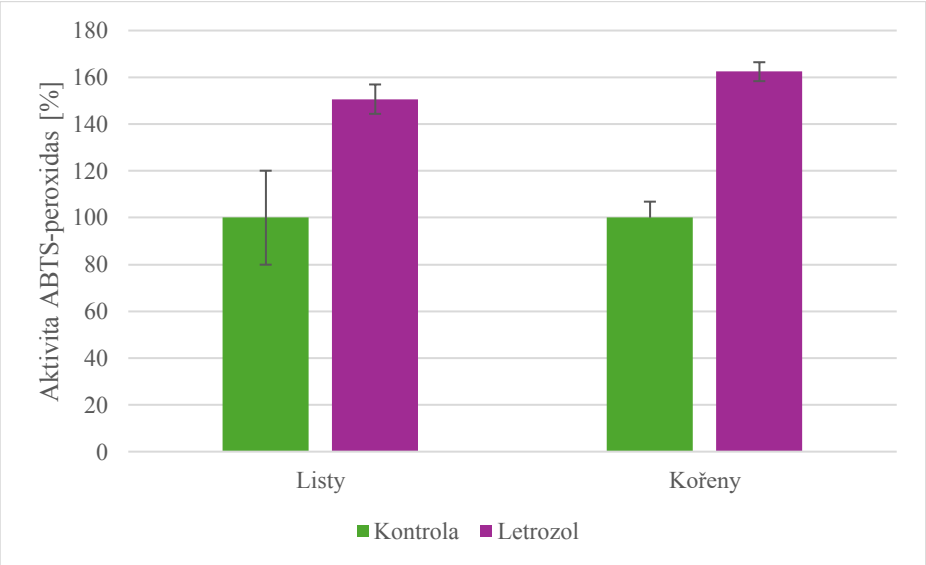
V *Grafu 9*, je zřejmý nárůst aktivity membránově vázaných peroxidas listech rostlin pěstovaných v prostředí letrozolu, kde došlo k navýšení o 39 % oproti kontrolním rostlinám. U kořenů byl zaznamenám pokles aktivity o 21 %.

6.4.4 Stanovení aktivity ABTS-peroxidas



Graf 10: Procentuální stanovení aktivity peroxidas přeměňujících substrát ABTS v listech a kořenech kontrolních rostlin (bez přídavku léčiva) a rostlin kontaminovaných anastrozolem. Aktivita je vztažena ke kontrolním rostlinám.

Nejvýraznější rozdíl hodnot v *Grafu 10* vykazují listy rostlin pěstovaných v prostředí anastrozolu, kde aktivita ABTS-peroxidas dosahuje hodnoty 241 %. Naopak aktivita v kořenech kontaminovaných rostlin klesla o 16 %.

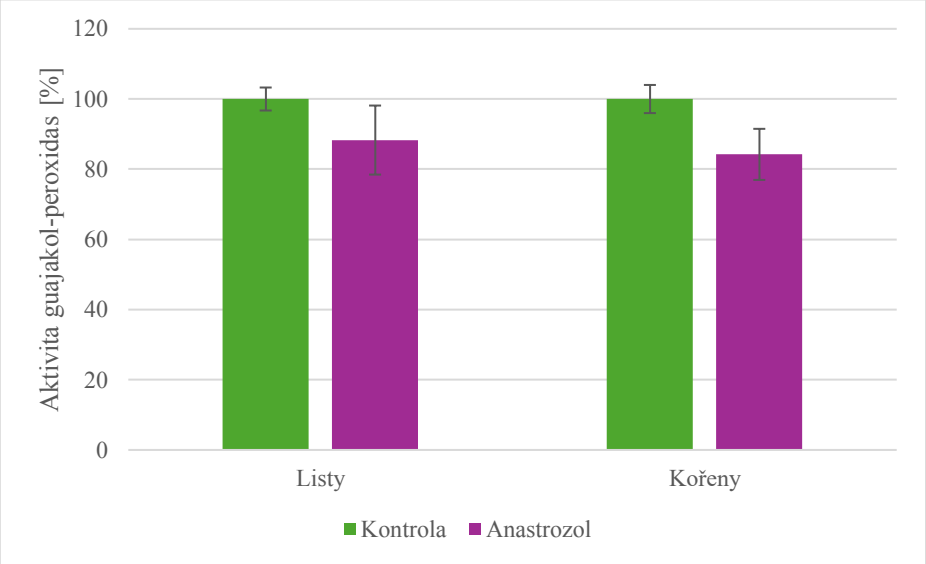


Graf 11: Procentuální stanovení aktivity peroxidas přeměňujících substrát ABTS v listech a kořenech kontrolních rostlin (bez přídavku léčiva) a rostlin kontaminovaných anastrozolem. Aktivita je vztažena ke kontrolním rostlinám.

U rostlin kontaminovaných letrozolem je v *Grafu 11* patrný nárůst aktivity ABTS-peroxidasy v kořenech i listech oproti kontrolním rostlinám, u listů hodnota vzrostla o 51 %, u kořenů o 62 %.

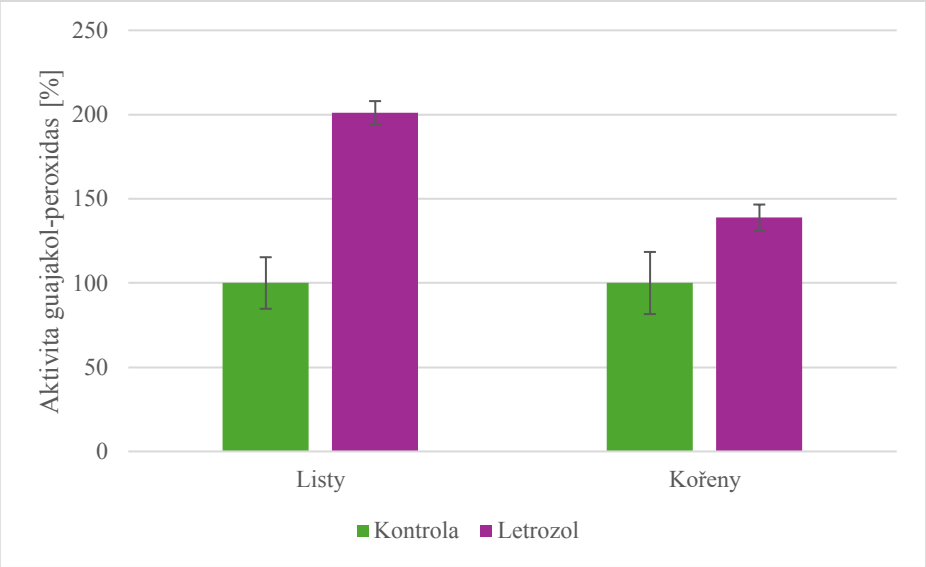
Obecně lze konstatovat, že dochází k nárůstu aktivity ABTS-peroxidasy v listech kontaminovaných rostlin.

6.4.5 Stanovení aktivity guajakolperoxidasy



Graf 12: Procentuální stanovení aktivity guajakolperoxidas v listech a kořenech kontrolních rostlin (bez přídavku léčiva) a rostlin kontaminovaných anastrozolem. Aktivita je vztažena ke kontrolním rostlinám.

V rostlinách vystaveným anastrozolu došlo k poklesu aktivity guajakolperoxidasy. Z *Grafu 12* vyplývá, že v listech se aktivita snížila o 12 % a v kořenech rostlin kontaminovaných anastrozolem o 16 % oproti kontrolním rostlinám.

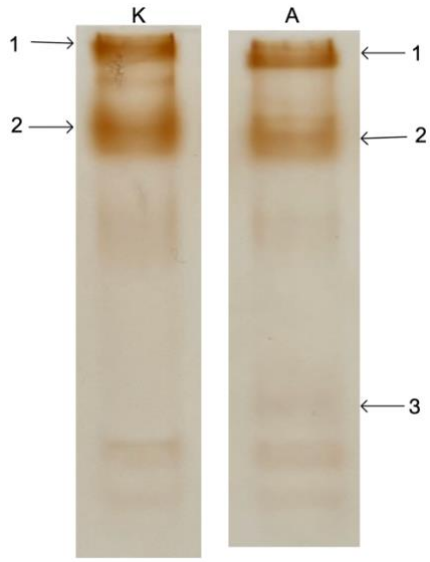


Graf 13: Procentuální stanovení guajakolperoxidas v listech a kořenech kontrolních rostlin (bez přídavku léčiva) a rostlin kontaminovaných letrozolem. Aktivita je vztažena ke kontrolním rostlinám.

Z *Grafu 13* je zřejmý nárůst aktivity guajakolperoxidasy v listech i kořenech rostlin kontaminovaných letrozolem oproti kontrolním rostlinám. Významně vyšší nárůst byl pozorován v listech, kde došlo k zvýšení aktivity na 201 %. Toto navýšení lze považovat jako projev stresu rostliny způsobený léčivem.

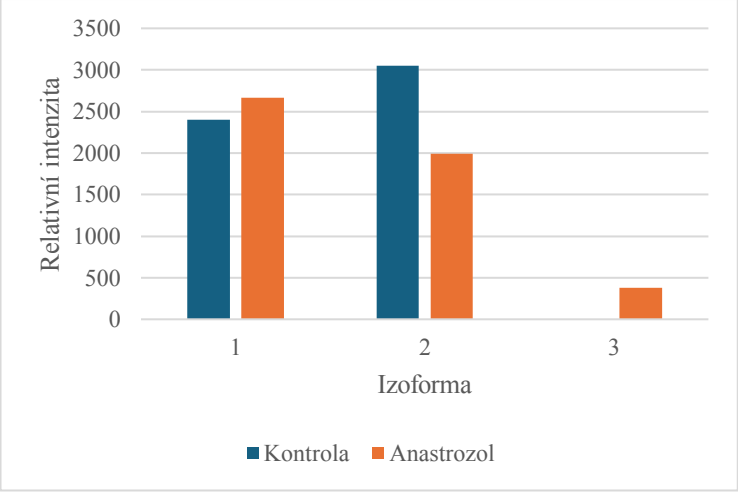
6.4.6 Detekce aktivity peroxidas v gelu

Detekce aktivity a izoenzymového složení peroxidas v rostlinách, zvlášť v kořenech a listech, byla provedena pomocí nativní elektroforetické separace a inkubací v detekčním roztoku. Intenzita zbarvení proužků zobrazuje aktivity jednotlivých izoforem peroxidas (čím vyšší intenzita zbarvení, tím vyšší aktivita), zároveň je počet proužků roven počtu detekovaných izoforem. Aktivita byla detekována pouze v kořenech. Peroxidasová aktivita v listech byla po nativní elektroforetické separaci pod limitem detekce.

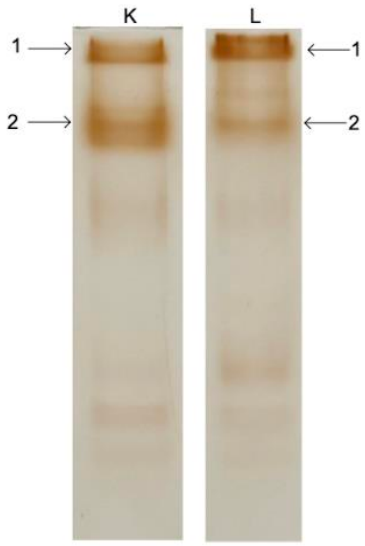


Obrázek 5: Detekce peroxidas v10% akrylamidovém gelu po nativní elektroforetické separaci extraktů kořenů. Do každé jamky bylo naneseno stejné množství proteinů. K – kontrolní rostlina bez přídavku léčiva, A – rostlina kontaminovaná anastrozolem. Čísla označují vybrané detekované izoformy.

Šipky v *Obrázku 5* znázorňují jednotlivé izoformy peroxidas, více izoforem byly detekováno v rostlině kontaminované anastrozolem. Aktivita první izoformy, ozn. 1, tedy izoformy s nejnižší pohyblivostí byla v kontaminovaných rostlinách lehce zvýšená, naopak izoforma 2 měla nižší aktivitu oproti kontrolní skupině. Izoforma 3 nebyla v kontrolní skupině přítomna. Relativní intenzity izoforem peroxidas vyhodnocené v programu *GelAnalyzer* zobrazuje *Graf 14*.

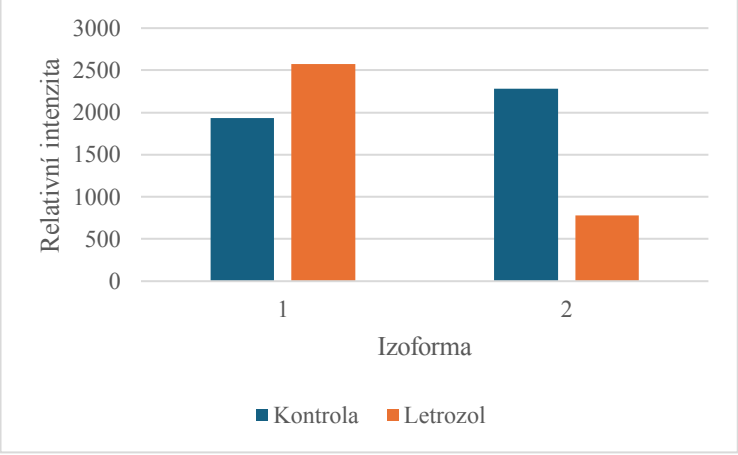


Graf 14: Relativní intenzity izoforem peroxidas detekovaných v kořenech kontrolní rostliny a rostliny kontaminované anastrozolem v 10 % gelu po nativní elektroforetické separaci. Jednotlivá čísla izoforem korespondují s pořadím uvedeném na daném gelu.



Obrázek 6: Detekce peroxidas v10% akrylamidovém gelu po nativní elektroforetické separaci extraktů kořenů. Do každé jamky bylo naneseno stejné množství proteinů. K – kontrolní rostlina bez přídavku léčiva, L – rostlina kontaminovaná letrozolem. Čísla označují vybrané detekované izoformy.

V případě rostlin kontaminovaných léčivem oproti kontrolním rostlinám bylo detekováno stejné množství izoforem, které se liší pouze v relativní intenzitě. Aktivita izoformy 1 byla zvýšená v gelu pro rostliny kontaminované letrozolem, naopak aktivita izoformy 2 byla nižší. Relativní intenzity těchto izoforem peroxidas vyhodnocené v programu *GelAnalyzer* zobrazuje *Graf 15*.

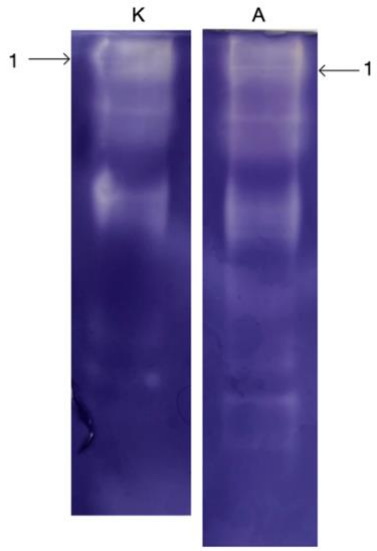


Graf 15: Relativní intenzity izoforem peroxidas detekovaných v kořenech kontrolní rostliny a rostliny kontaminované letrozolem v 10 % gelu po nativní elektroforetické separaci. Jednotlivá čísla izoforem korespondují s pořadím uvedeném na daném gelu.

V obou gelech rostlin kontaminovaných léčivy došlo ke zvýšení aktivity izoformy 1 a ke snížení aktivity izoformy 2. Peroxidasy hrají klíčovou roli v procesu lignifikace, při kterém se v buněčných stěnách některých rostlinných buněk ukládá lignin, složitý polymer, který poskytuje strukturální podporu a pomáhá při obranných mechanismech.[26]

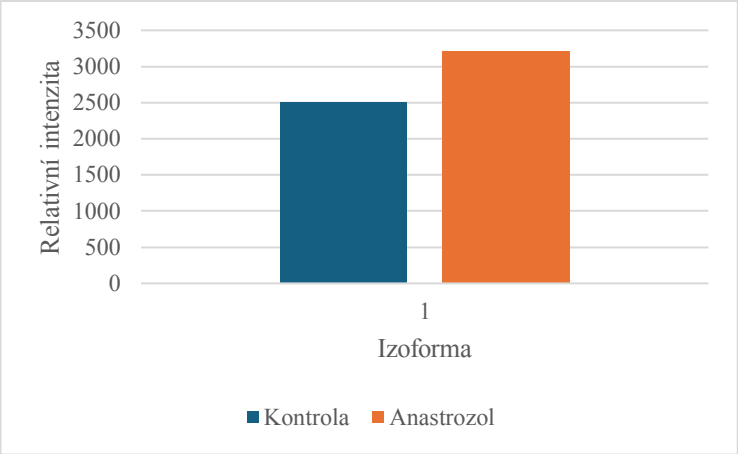
6.4.7 Detekce glutathion-S-transferasy v gelu

Aktivita glutathion-S-transferasy byla detekována v 10% akrylamidovém gelu po nativní elektroforetické separaci. Aktivita byla detekována v kořenech a listech kontrolních rostlin a kořenech a listech rostlin pěstovaných v prostředí anastrozolu a v prostředí letrozolu. Gely byly inkubovány detekčním roztoku a poté umístěny na fólii pro skenování a následné vyhodnocení v programu *GelAnalyzer.*

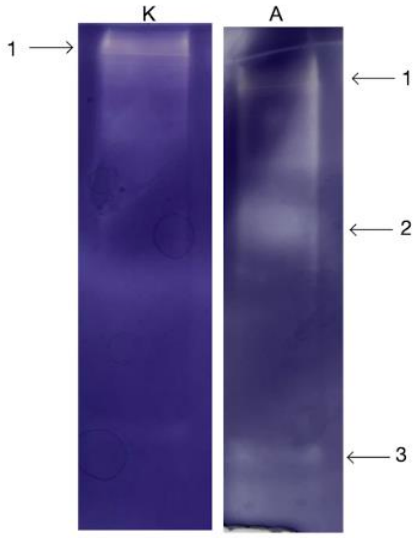


Obrázek 7: Detekce glutathion-S-transferasy v10% akrylamidovém gelu po nativní elektroforetické separaci extraktů kořenů. Do každé jamky bylo naneseno stejné množství proteinů. K – kontrolní rostlina bez přídavku léčiva, A – rostlina kontaminovaná anastrozolem. Čísla označují vybrané detekované izoformy.

V kořenech rostlin kontaminovaných anastrozolem bylo sedm izoforem, v kontrolní skupině pouze čtyři. Nejvýrazněji lišící se izoformy jsou označeny šipkami v *Obrázku 7*, relativní intenzity těchto izoforem byly vyneseny do *Grafu 16*. Vyšší intenzitu vykazovala izoforma s nejnižší pohyblivostí, označena šipkou číslo 1.

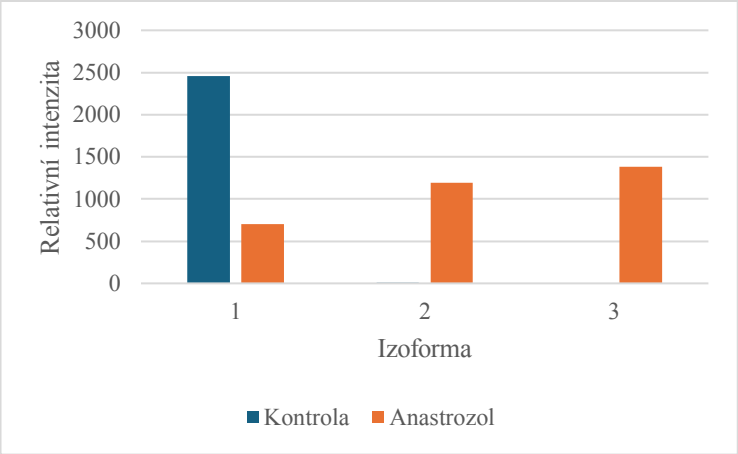


Graf 16: Relativní intenzita izoformy glutathion-S-transferasy detekované v kořenech kontrolní rostliny a rostliny kontaminované anastrozolem v 10 % gelu po nativní elektroforetické separaci. Jednotlivá čísla korespondují s pořadím uvedeném na daném gelu.



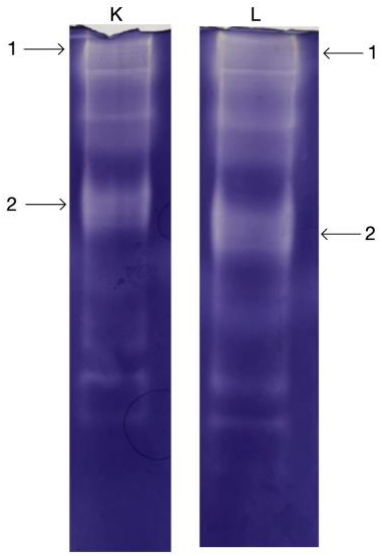
Obrázek 8: Detekce glutathion-S-transferasy v10% akrylamidovém gelu po nativní elektroforetické separaci extraktů listů. Do každé jamky bylo naneseno stejné množství proteinů. K – kontrolní rostlina bez přídavku léčiva, A – rostlina kontaminovaná anastrozolem. Čísla označují vybrané detekované izoformy.

V listech rostlin kontaminovaných anastrozolem bylo detekováno o dvě izoformy glutathion-S-tranferasy více oproti kontrolní skupině (viz *Obrázek 8*). Relativní intenzity některých výrazně odlišných izoforem byly vyneseny do *Grafu 17*. Izoforma s nejnižší pohyblivostí vykazovala nižší aktivitu v kontaminovaných rostlinách, naopak izoforma 1, se střední pohyblivostí, a izoforma 3 s nejvyšší pohyblivostí byly detekovány pouze v kontaminovaných rostlinách.



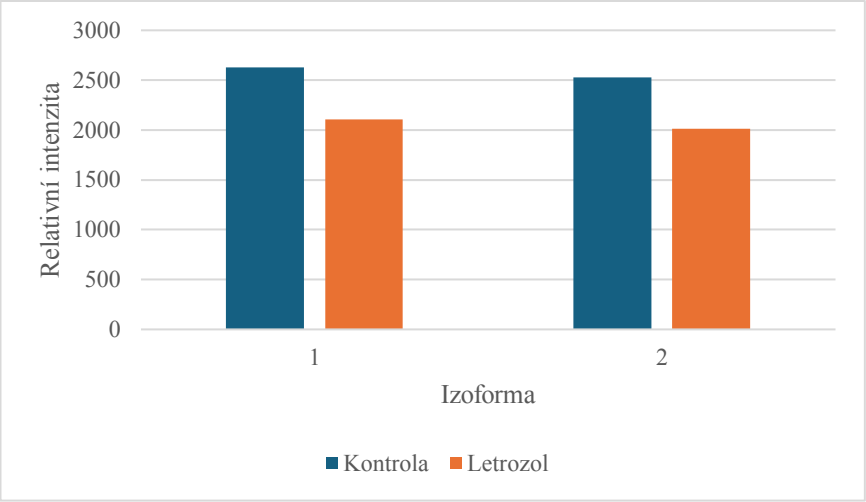
Graf 17: Relativní intenzity izoforem glutathion-S-transferasy detekovaných v listech kontrolní rostliny a rostliny kontaminované anastrozolem v 10 % gelu po nativní elektroforetické separaci. Jednotlivá čísla izoforem korespondují s pořadím uvedeném na daném gelu.

Glutathion-S-tranferasa byla dále detekována v kořenech i listech rostlin kontaminovaných letrozolem, které byly porovnávány s kontrolní rostlinou pěstovanou bez přídavku léčiva.



Obrázek 9: Detekce glutathion-S-transferasy v10% akrylamidovém gelu po nativní elektroforetické separaci extraktů kořenů. Do každé jamky bylo naneseno stejné množství proteinů. K – kontrolní rostlina bez přídavku léčiva, L – rostlina kontaminovaná letrozolem. Čísla označují vybrané detekované izoformy.

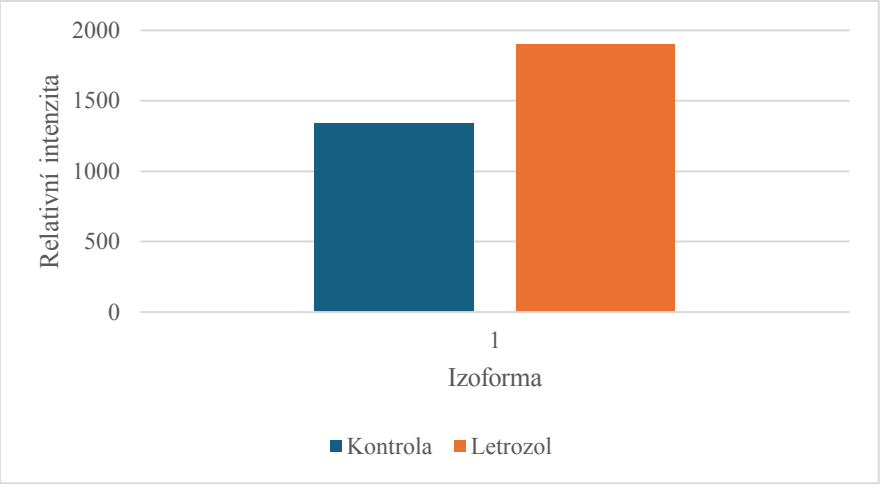
V kořenech kontrolních rostlin a rostlin kontaminovaných letrozolem po elektroforetické separaci bylo detekováno sedm izoforem glutathion-S-transferasy, nejvíce se svými intenzitami lišily izoforma 1, tj. izoforma s nejnižší pohyblivostí, a izoforma 2, se střední pohyblivostí. V obou byla snížená aktivita oproti kontrolní skupině, to je zobrazeno v *Grafu 18*, jako velikost relativních intenzit.



Graf 18: Relativní intenzity izoforem glutathion-S-transferasy detekovaných v kořenech kontrolní rostliny a rostliny kontaminované letrozolem v 10 % gelu po nativní elektroforetické separaci. Jednotlivá čísla izoforem korespondují s pořadím uvedeném na daném gelu.

Obrázek 10: Detekce glutathion-S-transferasy v10% akrylamidovém gelu po nativní elektroforetické separaci extraktů listů. Do každé jamky bylo naneseno stejné množství proteinů. K – kontrolní rostlina bez přídavku léčiva, L – rostlina kontaminovaná letrozolem. Čísla označují vybrané detekované izoformy.

V listech rostlin kontaminovaných letrozolem a kontrolních rostlin bylo detekováno stejné množství izoforem glutathion-S-tranferasy (viz *Obrázek 10*) Intenzita se nejvíce lišila u izoformy s nejnižší pohyblivostí, označené šipkou číslo 1, které byla u kontaminované skupiny zvýšená. Relativní intenzitu této izoformy zobrazuje *Graf 19*.



Graf 19: Relativní intenzita izoformy glutathion-S-transferasy detekované v listech kontrolní rostliny a rostliny kontaminované letrozolem v 10 % gelu po nativní elektroforetické separaci. Jednotlivá čísla izoforem korespondují s pořadím uvedeném na daném gelu.

Zvýšená aktivita glutathion-S-tranferasy může souviset se snahou rostliny ochránit se před ROS, jelikož tento enzym patří do rodiny GPx, které eliminují peroxidy jako potenciální substráty pro Fentonovu reakci.[29] Některá xenobiotika s halogenovými nebo nitroskupinami mohou být konjugována s GSH v reakci katalyzované enzymy glutathion-S-transferasami.[33]

Závěr

Byla provedena fytoextrakce anastrozolu a letrozolu na rostlinách kukuřice seté (*Zea mays* L.) kultivované *in vitro*. Z vzorků odebíraných v 24 hodinových intervalech po dobu 7 dní byla pomocí HPLC stanovena fytoextrakční účinnost obou léčiv. V porovnání účinnosti jednotlivých fytoextrakcí dosahovaly velmi podobných hodnot, avšak v přítomnosti letrozolu byla hodnota lehce vyšší. Dále byla stanovena extrahovatelná rezidua z kontaminovaných rostlin. Lze konstatovat, že byla prokázána schopnost kukuřice snížit obsah léčiva médiu a stopy testovaných látek byly nalezeny i v nadzemní části kultivovaných rostlin.

Rostliny vlivem abiotického stresu způsobeného přítomností léčiva mohou vykazovat odlišné aktivity peroxidas oproti rostlinám kontrolním. Biochemickou analýzou rostlin bylo zjištěno, že rostliny pěstované v prostředí anastrozolu vykazovaly nižší obsah proteinů v listech ve srovnání s kontrolními rostlinami, zatímco v kořenech byl pozorován opačný trend. Aktivita celkových volných peroxidas klesla u rostlin s anastrozolem, zatímco stoupla u rostlin s letrozolem. Aktivita membránově vázaných peroxidas se nejvíce zvýšila v kořenech s anastrozolem a ABTS-peroxidasa měla vyšší aktivitu v listech, ale nižší v kořenech s anastrozolem, zatímco u rostlin s letrozolem stoupla aktivita v obou částech. Aktivita guajakolperoxidasy klesla u anastrozolu a vzrostla u letrozolu. Počet a aktivita izoforem peroxidas a glutathion-S-transferasy byla stanovena po nativní elektroforetické separaci. Peroxidasová aktivita byla stanovena pouze v kořenech rostlin, v listech byla po nativní elektroforetické separaci pod limitem detekce. Zvýšená aktivita některých izoforem glutathion-S-transferasy může souviset s biotransformací léčiv v rostlinách.

Literatura

[1] Aromatase inhibitors. *National cancer institute* [online]. [cit. 2024-04-16]. Dostupné z: https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/aromatase-inhibitor

[2] HONG, YANYAN a SHIUAN CHEN. Aromatase Inhibitors. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2006, **1089**(1), 237-251 [cit. 2024-04-16]. ISSN 0077-8923. Dostupné z: doi:10.1196/annals.1386.022

[3] MILLER, William R., John BARTLETT, Angela M. H. BRODIE, et al. Aromatase Inhibitors: Are There Differences Between Steroidal and Nonsteroidal Aromatase Inhibitors and Do They Matter? *The Oncologist* [online]. 2008, 2008-08-01, **13**(8), 829-837 [cit. 2024-04-16]. ISSN 1083-7159. Dostupné z: doi:10.1634/theoncologist.2008-0055

[4] BRUEGGEMEIER, Robert W., John C. HACKETT a Edgar S. DIAZ-CRUZ. Aromatase Inhibitors in the Treatment of Breast Cancer. *Endocrine Reviews* [online]. 2005, 2005-05-01, **26**(3), 331-345 [cit. 2024-04-16]. ISSN 0163-769X. Dostupné z: doi:10.1210/er.2004-0015

[5] L√∏NNING, P E. Aromatase inhibitors in breast cancer. *Endocrine-related cancer* [online]. 2004, **11**(2), 179-189 [cit. 2024-04-16]. ISSN 1351-0088. Dostupné z: doi:10.1677/erc.0.0110179

[6] MIGLANI, Rashi, Nagma PARVEEN, Ankit KUMAR, et al. Degradation of Xenobiotic Pollutants: An Environmentally Sustainable Approach. *Metabolites* [online]. 2022, **12**(9) [cit. 2024-04-17]. ISSN 2218-1989. Dostupné z: doi:10.3390/metabo12090818

[7] EISSA, Manar A. a Eman Y. GOHAR. Aromatase enzyme: Paving the way for exploring aromatization for cardio-renal protection. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. 2023, **168** [cit. 2024-04-16]. ISSN 07533322. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2023.115832

[8] FUSI, Camilla, Serena MATERAZZI, Silvia BENEMEI, et al. Steroidal and non-steroidal third-generation aromatase inhibitors induce pain-like symptoms via TRPA1. Nature Communications [online]. 2014, 2014-12-23, 5(1) [cit. 2024-04-16]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms6736

[9] LONNING, P. Pharmacokinetics of third-generation aromatase inhibitors. *Seminars in Oncology* [online]. 2003, **30**, 23-32 [cit. 2024-04-16]. ISSN 00937754. Dostupné z: doi:10.1016/S0093-7754(03)00305-1

[10] BOTTONI, P., S. CAROLI a A.Barra CARACCIOLO. Pharmaceuticals as priority water contaminants. *Toxicological & Environmental Chemistry* [online]. 2010, **92**(3), 549-565 [cit. 2024-04-16]. ISSN 0277-2248. Dostupné z: doi:10.1080/02772241003614320

[11] FICK, Jerker, Hanna SÖDERSTRÖM, Richard H. LINDBERG, Chau PHAN, Mats TYSKLIND a D. G. Joakim LARSSON. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. 2009, **28**(12), 2522-2527 [cit. 2024-04-16]. ISSN 0730-7268. Dostupné z: doi:10.1897/09-073.1

[12] DUTTA, Udayan a Kartikeya PANT. Aromatase inhibitors: past, present and future in breast cancer therapy. *Medical Oncology*[online]. 2008, **25**(2), 113-124 [cit. 2024-04-16]. ISSN 1357-0560. Dostupné z: doi:10.1007/s12032-007-9019-x

[13] ARTHUR, Ellen L., Pamela J. RICE, Patricia J. RICE, Todd A. ANDERSON, Sadika M. BALADI, Keri L. D. HENDERSON a Joel R. COATS. Phytoremediation—An Overview. *Critical Reviews in Plant Sciences* [online]. 2005, **24**(2), 109-122 [cit. 2024-04-16]. ISSN 0735-2689. Dostupné z: doi:10.1080/07352680590952496

[14] SOUDEK, Petr, Šárka PETROVÁ, Dagmar BENEŠOVÁ, Jan KOTYZA a Tomáš VANĚK. FYTOREMEDIACE A MOŽNOSTI ZVÝŠENÍ JEJICH ÚČINNOSTI. *Chemické listy*. 2008, (102), 346−352.

[15] VANĚK, Tomáš, Petr SOUDEK, Radka PODLIPNÁ, Šárka PETROVÁ a Přemysl LANDA. *Fytoremediace a možnosti její aplikace*. [Praha]: Středisko společných činností AV ČR, 2017. Věda kolem nás. ISBN 978-80-270-2248-9.

[16] KOTYZA, Jan, Petr SOUDEK, Zdeněk KAFKA a Tomáš VANĚK. LÉČIVA – „NOVÝ“ ENVIROMENTÁLNÍ POLUTANT. *Chemické listy*. 2009, (103), 540–547.

[17] VÁŇA, Miroslav, Filip WANNER, Lenka MATOUŠOVÁ a Josef K. FUCHSA. MOŽNOSTI ODSTRAŇOVÁNÍ VYBRANÝCH SPECIFICKÝCH POLUTANTŮ V ČOV. *VTEI*. 2010, **52**.

[18] ANSARI, Abid Ali, Sarvajeet Singh GILL, Ritu GILL, Guy R. LANZA a Lee NEWMAN, ed. *Phytoremediation* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2015 [cit. 2024-04-17]. ISBN 978-3-319-10968-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-10969-5

[19] SANFORD, Mark a Greg L PLOSKER. Anastrozole. *Drugs* [online]. 2008, **68**(9), 1319-1340 [cit. 2024-04-17]. ISSN 0012-6667. Dostupné z: doi:10.2165/00003495-200868090-00007

[20] LØNNING, Per E., Jürgen GEISLER a Mitch DOWSETT. Pharmacological and clinical profile of anastrozole. *Breast Cancer Research and Treatment* [online]. 1998, **49**(S1), S53-S57 [cit. 2024-04-17]. ISSN 0167-6806. Dostupné z: doi:10.1023/A:1006000806630

[21] HIGA, Gerald M. a Nabiel KHOURI. Anastrozole: a selective aromatase inhibitor for the treatment of breast cancer. *American Journal of Health-System Pharmacy* [online]. 1998, 1998-03-01, **55**(5), 445-452 [cit. 2024-04-17]. ISSN 1079-2082. Dostupné z: doi:10.1093/ajhp/55.5.445

[22] MUKHERJEE, Anirban Goutam, Uddesh Ramesh WANJARI, Dhanushya NAGARAJAN, et al. Letrozole: Pharmacology, toxicity and potential therapeutic effects. *Life Sciences* [online]. 2022, **310** [cit. 2024-04-17]. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2022.121074

[23] LAMB, Harriet M. a Julie C. ADKINS. Letrozole. *Drugs* [online]. 1998, **56**(6), 1125-1140 [cit. 2024-04-17]. ISSN 0012-6667. Dostupné z: doi:10.2165/00003495-199856060-00020

[24] BHATNAGAR, Ajay S. The discovery and mechanism of action of letrozole. *Breast Cancer Research and Treatment* [online]. 2007, **105**(S1), 7-17 [cit. 2024-04-17]. ISSN 0167-6806. Dostupné z: doi:10.1007/s10549-007-9696-3

[25] ŠTEFANAC, Tea, Dijana GRGAS a Tibela LANDEKA DRAGIČEVIĆ. Xenobiotics—Division and Methods of Detection: A Review. *Journal of Xenobiotics* [online]. 2021, **11**(4), 130-141 [cit. 2024-04-17]. ISSN 2039-4713. Dostupné z: doi:10.3390/jox11040009

[26] KUVALEKAR, A.A. a K.R. GANDHE. Hydrogen peroxide generation and lignification by peroxidases from Acacia eburneainfected with Ravenelia esculenta. *Plant, Soil and Environment* [online]. 2010, 2010-9-30, **56**(9), 419-428 [cit. 2024-05-12]. ISSN 12141178. Dostupné z: doi:10.17221/120/2009-PSE

[27] PIWOWARSKA, Dominika a Edyta KIEDRZYŃSKA. Xenobiotics as a contemporary threat to surface waters. *Ecohydrology & Hydrobiology* [online]. 2022, **22**(2), 337-354 [cit. 2024-05-12]. ISSN 16423593. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecohyd.2021.09.003

[28] SINGH, Anita, Sheo Mohan PRASAD a Rajeev Pratap SINGH, ed. Plant Responses to Xenobiotics [online]. Singapore: Springer Singapore, 2016 [cit. 2024-04-17]. ISBN 978-981-10-2859-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-10-2860-1

[29] AHMAD, Parvaiz, Cheruth Abdul JALEEL, Mohamed A. SALEM, Gowher NABI a Satyawati SHARMA. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. 2010, 2010-03-09, **30**(3), 161-175 [cit. 2024-04-17]. ISSN 0738-8551. Dostupné z: doi:10.3109/07388550903524243

[30] HUCHZERMEYER, Bernhard, Ekta MENGHANI, Pooja KHARDIA a Ayushi SHILU. Metabolic Pathway of Natural Antioxidants, Antioxidant Enzymes and ROS Providence. *Antioxidants* [online]. 2022, **11**(4) [cit. 2024-04-17]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox11040761

[31] Ghamsari, L., Keyhani, E., & Golkhoo, S. Kinetics properties of guaiacol peroxidase activity in Crocus sativus L. corm during rooting. *Iranian biomedical journal* [online]. 2007, **11**(3), 137–146. Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18051773/

[32] LUCIŃSKI, Robert a Małgorzata ADAMIEC. The role of plant proteases in the response of plants to abiotic stress factors. *Frontiers in Plant Physiology* [online]. 2023, 2023-12-18, **1** [cit. 2024-05-12]. ISSN 2813-821X. Dostupné z: doi:10.3389/fphgy.2023.1330216

[33] DEL BUONO, Daniele, Roberto TERZANO, Ivan PANFILI a Maria Luce BARTUCCA. Phytoremediation and detoxification of xenobiotics in plants: herbicide-safeners as a tool to improve plant efficiency in the remediation of polluted environments. A mini-review. *International Journal of Phytoremediation* [online]. 2020, 2020-07-02, **22**(8), 789-803 [cit. 2024-05-12]. ISSN 1522-6514. Dostupné z: doi:10.1080/15226514.2019.1710817

[34] Phytoremediation: The future of environmental remediation. *Debating Science* [online]. 2013 [cit. 2024-05-15]. Dostupné z: https://websites.umass.edu/natsci397a-eross/phytoremediation-the-future-of-environmental-remediation/comment-page-2/

[35] Anastrozole. In: *ChemSpider* [online]. [cit. 2024-05-15]. Dostupné z: https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2102.html

[36] Letrozole. In: *ChemSpider* [online]. [cit. 2024-05-15]. Dostupné z: https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3765.html